Université de Montréal

Quantification neuronale de cerveaux fixés avec des solutions provenant des laboratoires d'anatomie humaine

Par

Amy Gérin-Lajoie

Programme de sciences biomédicales, Faculté de médecine

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

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)

en sciences biomédicales

Avril 2026

© Amy Gérin-Lajoie, 2026

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

Programme de sciences biomédicales, Faculté de médecine
en extension à l'Université du Québec à Trois-Rivières

Ce mémoire intitulé

Quantification neuronale de cerveaux fixés avec des solutions provenant des laboratoires d'anatomie humaine

Présenté par

Amy Gérin-Lajoie

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Syrina Al Aïn
Présidente-rapporteuse

Josefina Maranzano
Directrice de recherche

Denis Boire
Codirecteur

Gabriel Venne
Membre du jury

Résumé

Les banques de cerveaux fournissent aux chercheurs des petits blocs de cerveaux humains fixés par immersion dans une solution de formaldéhyde (SFA). Les laboratoires d'anatomie humaine pourraient offrir des cerveaux complets fixés par perfusion avec une solution saturée de sel (SSS) ou une solution d'alcools (SA). Cependant, elles contiennent d'autres produits chimiques et moins de formaldéhyde, ce qui pourrait affecter l'antigénicité, la morphologie et la taille des cellules du cerveau. Actuellement, il existe peu d'études ayant comparé la qualité de l'histologie réalisée sur les cerveaux fixés avec la SSS et la SA. Dans la présente étude, une analyse quantitative des effets de ces deux solutions sur les neurones a été accomplie sur les cerveaux de souris et humains. Un protocole d'immunohistochimie a été réalisé pour visualiser les neurones du cortex moteur primaire. Puis, les variables quantitatives suivantes ont été analysées : 1) la surface cellulaire totale, 2) la surface cellulaire individuelle, 3) le nombre de neurones marqués et 4) les diamètres neuronaux. Ces variables ont été comparées entre la SFA (solution contrôle), la SSS et la SA.

Chez la souris, il n'y avait aucune différence entre les groupes, sauf pour les grands diamètres, qui étaient plus petits chez les neurones fixés avec la SFA. Ceci reflète une différence potentielle dans la morphologie de ces cellules comparativement aux deux autres solutions. Chez l'humain, les spécimens fixés avec la SSS étaient de qualité histologique inférieure, mais la SA a produit des effets microscopiques similaires à ceux engendrés par la SFA.

Mots-clés : solutions de fixation, formaldéhyde, immunohistochimie, neurones, segmentation

Abstract

In neuroscientific research, brain banks can provide small blocks of human brains fixed by immersion in neutral-buffered formalin (NBF). Gross anatomy laboratories could instead provide full brains fixed by perfusion with a saturated salt solution (SSS) or an alcohol-formaldehyde solution (AFS). However, these solutions comprise other chemicals and less formaldehyde, which could affect the antigenicity, morphology and size of brain cells. There are currently few studies that have compared the histology quality of brains fixed with the SSS and AFS. In the present study, a quantitative assessment of the effects of these two anatomical solutions on neurons was performed on mouse and human brains. An immunohistochemistry protocol was used to stain neurons in the primary motor cortex. Then, the following quantitative variables were analyzed: 1) the total cell surface, 2) the individual cell surface, 3) the number of labeled neurons, and 4) the neuronal diameters. These variables were compared between the NBF (control solution), the SSS, and the AFS.

In mice, there was no difference between the groups except for the large diameters. They were smaller in neurons fixed with the NBF, which reflects a potential difference in the morphology of these cells compared with the two anatomical solutions. In humans, SSS-fixed specimens were of lower histology quality, but the AFS produced similar microscopic effects than those displayed by the control solution.

Keywords: fixative solutions, formaldehyde, immunohistochemistry, neurons, segmentation

Table des matières

RÉSUMÉ **5**

ABSTRACT **7**

TABLE DES MATIÈRES **9**

LISTE DES TABLEAUX **13**

LISTE DES FIGURES **15**

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS **19**

REMERCIEMENTS **23**

INTRODUCTION **25**

1. PROBLÉMATIQUE 25
2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES 25
2.1 Objectif spécifique 1 ..... *26*
2.2 Objectif spécifique 2 ..... *26*
2.3 Objectif spécifique 3 ..... *27*
3. STRUCTURE DU MÉMOIRE 27

CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE : FIXATION **29**

1. DÉCOUVERTE ET ÉVOLUTION 29
1.1 Cultures anciennes *30*
1.2 Période des anatomistes *32*
1.3 Période funéraire *33*
1.4 Préservation anatomique moderne *34*
2. SOLUTIONS DE FIXATION 34
2.1 Principes de la fixation *35*
2.1.1 Types de solutions 35
2.1.1.1 Solutions produisant une fixation dure 35
2.1.1.2 Solutions produisant une fixation souple 36
2.1.2 Mécanismes d'action 36
2.1.2.1 Fixateurs coagulants 36
2.1.2.2 Fixateurs non coagulants 37
2.2 Solutions utilisées *37*
2.2.1 Solution de formaldéhyde (SFA) 38
2.2.1.1 Mécanisme d'action 39
2.2.1.2 Avantages et inconvénients 40
2.2.2 Solution saturée de sel (SSS) 43
2.2.2.1 Mécanisme d'action 43
2.2.2.2 Avantages et inconvénients 45
2.2.3 Solution d'alcools (SA) 46
2.2.3.1 Mécanisme d'action 47
2.2.3.2 Avantages et inconvénients 48
3. ADMINISTRATION DU FIXATEUR 50
3.1 Immersion *51*
3.1.1 Avantages et inconvénients 51
3.1.2 Étendue d'utilisation 52
3.2 Perfusion *52*
3.2.1 Perfusion *in situ* 52
3.2.2 Perfusion *ex situ* 53

3.2.3 Avantages et inconvénients 54
3.2.4 Étendue d'utilisation 55

CHAPITRE 2 – MÉTHODOLOGIE 57

1. MODÈLES D'ÉTUDE 57
1.1 Souris 57
1.2 Humain 58
2. IMMUNOHISTOCHIMIE 59
2.1 Types de coupe 59
2.2 Technique de récupération des antigènes 61
2.3 Types de protocole immunohistochimique 63
2.4 Systèmes de détection immunologique 64
2.5 Antigène et anticorps d'intérêt 66
3. ANALYSE D'IMAGES 68
3.1 Photomicrographies chez la souris 68
3.2 Photomicrographies chez l'humain 69
3.3 Variables d'intérêt 71
3.3.1 Quantification de la surface cellulaire totale 75
3.3.2 Quantification de la surface cellulaire individuelle 76
3.3.3 Quantification du nombre total de neurones marqués 77
3.3.4 Quantification des diamètres cellulaires 78
3.3.5 Nombre de régions d'intérêt 79
3.4 Réseau neuronal convolutif 79

CHAPITRE 3 – NEURONAL QUANTIFICATION IN MOUSE BRAINS FIXED WITH SOLUTIONS FROM HUMAN GROSS ANATOMY LABORATORIES 83

1. ABSTRACT 84
2. INTRODUCTION 85
3. MATERIALS AND METHODS 87
3.1 Population 87
3.2 Fixation procedure 88
3.3 Immunohistochemistry processing 89
3.4 Microscopy 90
3.5 Image analyses 90
3.5.1 Total cell surface 90
3.5.1.1 Manual segmentation 90
3.5.1.2 Automatic segmentation 91
3.5.2 Individual cell surface 91
3.5.2.1 Manual segmentation 91
3.5.2.2 Automatic segmentation 92
3.5.3 Cell counts 92
3.5.4 Cell diameters 92
3.6 Statistical analyses 93
4. RESULTS 94
4.1 Total cell surface 94
4.2 Individual cell surface 95
4.3 Cell counts 96
4.3.1 Total cell count 96
4.3.2 In-focus and out-of-focus cell counts 97
4.4 Cell diameters 98
4.4.1 Large diameters 98
4.4.2 Small diameters 98
4.4.3 Cell circularity ratios 99
5. DISCUSSION 103
5.1 Quantitative variables 103

5.1.1 Cell surfaces and total cell count ... 103
5.1.2 In-focus and out-of-focus cell counts ... 104
5.1.3 Cell diameters and circularity ratios ... 106
5.2 Automatic software ... *106*
5.2.1 Total cell surface ... 106
5.2.2 Individual cell surface ... 108
5.2.3 Cell diameters ... 109
5.2.4 Circularity ratios ... 110
5.3 Study limits ... *110*
6. CONCLUSION ... 112

CHAPITRE 4 – RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES ... 113

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES ... 113
1.1 Population ... *113*
1.2 Fixation des corps ... *115*
1.3 Récupération des antigènes ... *115*
1.4 Immunohistochimie ... *116*
1.5 Variables d'intérêt ... *116*
1.6 Analyse statistique ... *116*
2. RÉSULTATS ... 116
2.1 Quantification de la surface cellulaire totale ... *118*
2.2 Quantification de la surface cellulaire individuelle ... *119*
2.3 Quantification du nombre de neurones marqués ... *119*
2.4 Quantification des diamètres cellulaires ... *121*
2.5 Nombre de régions d'intérêt ... *122*

CHAPITRE 5 – DISCUSSION GLOBALE ... 125

1. SOLUTIONS UTILISÉES ... 125
2. VARIABLES D'INTÉRÊT ... 126
2.1 Quantification de la surface cellulaire totale ... *126*
2.1.1 Volet souris ... 126
2.1.2 Volet humain ... 127
2.2 Quantification de la surface cellulaire individuelle ... *132*
2.2.1 Volet souris ... 132
2.2.2 Volet humain ... 134
2.3 Quantification du nombre de neurones marqués ... *134*
2.3.1 Nombre total de neurones marqués ... 134
2.3.1.1 Volet souris ... 134
2.3.1.2 Volet humain ... 135
2.3.2 Nombre de neurones au focus et hors-focus ... 135
2.3.2.1 Volet souris ... 135
2.3.2.2 Volet humain ... 136
2.4 Quantification des diamètres cellulaires ... *137*
2.4.1 Petits et grands diamètres ... 137
2.4.1.1 Volet souris ... 137
2.4.1.2 Volet humain ... 139
2.4.2 Ratios de circularité ... 139
2.4.2.1 Volet souris ... 139
2.4.2.2 Volet humain ... 140
2.5 Nombre de régions d'intérêt ... *140*
3. LIMITES DE L'ÉTUDE ... 140
4. DIRECTIONS FUTURES ... 141
4.1 Solution saturée de sel ... *141*
4.2 Solution d'alcools ... *142*

CONCLUSION ... 143

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 147

Liste des tableaux

Tableaux présentés dans les textes du mémoire

Tableau 1. – **Composition chimique des fixateurs**. SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; NaCl = chlorure de sodium 38

Tableau 2. – **Comparaison des avantages et inconvénients pour les trois solutions de fixation utilisées**. SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools 50

Tableau 3. – **Données relatives aux spécimens humains**. ID = identification du spécimen; IPM = intervalle post-mortem; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; M = homme; F = femme; MPOC = maladie pulmonaire obstructive chronique 114

Tableau 4. – **Comparaison des statistiques descriptives obtenues pour chaque variable quantitative entre les trois solutions de fixation**. SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; Ratio F/T = ratio cellules au focus/cellules totales; Ratio H-F/T = ratio cellules hors-focus/cellules totales; ROI = région d'intérêt 118

Tableaux présentés dans le manuscrit de l'article (chapitre 3)

Table 1. – **Mice data**. NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; F = female; M = male 87

Table 2. – **Chemical composition of the fixatives**. NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; PBS = phosphate-buffered saline; NaCl = sodium chloride 89

Table 3. – **Summary of the descriptive statistics for each fixative**. Surfaces are reported in square microns. Diameters are reported in microns. NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; SD = standard deviation; r = Pearson correlation coefficient; r_s = Spearman correlation coefficient 101

Liste des figures

Figures présentées dans les textes du mémoire

Figure 1. – **Réactions chimiques menant à la fixation par le formaldéhyde**. Formation de l'hydrate de méthyle (A). Formation des groupes réactifs d'hydroxyméthyle (B). Formation des ponts de méthylène entre les protéines du tissu (C). Figure créée sur BioRender. 40

Figure 2. – **Représentation schématique des systèmes de détection immunologique**. Structure d'un anticorps (A). Méthode de détection directe (B). Méthode de détection indirecte (C). Figure créée sur BioRender. 65

Figure 3. – **Représentation schématique des facteurs pouvant agir sur les variables quantitatives du tissu**. Les colonnes montrent l'effet du volume du neuropile. Les lignes montrent l'effet du volume des cellules. Les encadrés représentent la taille d'une région d'intérêt. Les cercles colorés représentent les cellules, chaque couleur étant associée à une cellule individuelle. 73

Figure 4. – **Modélisation des facteurs pouvant agir sur les variables quantitatives du tissu**. Les colonnes montrent l'effet du volume du neuropile. Les lignes montrent l'effet du volume des cellules. Les encadrés représentent la taille d'une région d'intérêt. Les carrés colorés représentent les cellules, chaque couleur étant associée à une cellule individuelle. Chaque petit carré de l'encadré représente une unité de surface. Les effets sur diverses variables quantitatives sont décrits en bas de chaque grille. 74

Figure 5. – **Représentation schématique des cellules au focus et hors-focus au travers de la coupe histologique**. Situation dans laquelle les cellules sont plus grosses (A). Situation dans laquelle les cellules sont plus petites (B). Les encadrés représentent l'épaisseur de la coupe histologique. Les lignes colorées représentent la hauteur à laquelle les photomicrographies ont été prises pour chaque ROI. 78

Figure 6. – **Quantification des diamètres cellulaires**. Cellule de morphologie circulaire (A). Cellule de morphologie allongée (B). 79

Figure 7. – **Types de fonctions de mise en commun**. Mise en commun maximale (A). Mise en commun moyenne (B). Chaque bloc coloré représente un bloc analysé par une fenêtre de mise en commun sur la carte de caractéristiques initiale et le score mis en commun sur la carte de caractéristiques réduite. 81

Figure 8. – **Organisation hiérarchique d'un réseau neuronal convolutif**. Figure inspirée de Alma Better (2024).....81
Figure 9. – **Représentation graphique de la surface cellulaire totale pour les trois solutions de fixation.** µm = microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 119
Figure 10. – **Représentation graphique de la surface cellulaire individuelle de 30 neurones par spécimen pour les trois solutions de fixation**. µm = microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 119
Figure 11. – **Représentation graphique du nombre de cellules marquées par ROI pour les trois solutions de fixation**. Nombre total de neurones par ROI (A). Nombre de neurones au focus par ROI (B). Nombre de neurones hors-focus par ROI (C). ROI = région d'intérêt; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 120
Figure 12. – **Représentation graphique des ratios de cellules au focus et hors-focus pour les trois solutions de fixation**. Ratio du nombre de cellules au focus sur le nombre total de cellules (A). Ratio du nombre de cellules hors-focus sur le nombre total de cellules (B). µm = microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 121
Figure 13. – **Représentation graphique des diamètres cellulaires et des ratios de circularité de 30 neurones par spécimen pour les trois solutions de fixation**. µm = microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 122
Figure 14. – **Représentation graphique du nombre de régions d'intérêt acquises pour les trois solutions de fixation.** ROI = région d'intérêt; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 123
Figure 15. – **Photomicrographies (60X) des régions d'intérêt dans les cerveaux humains fixés par les trois solutions de fixation**. Barre d'échelle = 25 microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools.....132

Figures présentées dans le manuscrit de l'article (chapitre 3)

Figure 1. – **Violin plots of the total cell surfaces in all three fixative solutions**. Manually-segmented total cell surfaces (A). Automatically-segmented total cell surfaces (B). μm = microns; NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 94

Figure 2. – **Violin plots of the individual cell surfaces in all three fixative solutions**. Manually-segmented individual cell surfaces (A). Automatically-segmented individual cell surfaces (B). μm = microns; NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 96

Figure 3. – **Violin plots of the cell counts in all three fixative solutions**. Total cell count (A). In-focus cell count (B). Out-of-focus cell count (C). μm = microns; NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 97

Figure 4. – **Violin plots of the cell diameters in all three fixative solutions**. Manually-measured large diameters (A). Manually-measured small diameters (B). Cell circularity ratios obtained from the manual diameters (C). Automatically-measured large diameters (D). Automatically-measured small diameters (E). Cell circularity ratios obtained from the automatic diameters (F). μm = microns; NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 100

Figure 5. – **Mounted sections of fixed mouse brains**. AFS-fixed section (A). NBF-fixed section (B). Scalebar = 500 μm 104

Figure 6. – **Segmentation errors of the automatic method for the total cell surface**. White arrowheads point to the regions affected by the segmentation errors in the root images and manual masks. Green and blue arrowheads respectively point to the oversegmentation and undersegmentation errors on the automatic masks. All specimens shown here are NBF-fixed. Scalebar = 10 μm 108

Liste des sigles et abréviations

Sigles

AFS : *Alcohol-formaldehyde solution* (équivalent de la SA)

CNN : Réseau neuronal convolutif (*convolutional neural network*)

Fc : Fragment cristallisable

ICC : Coefficient de corrélation intra-classe (*intraclass correlation coefficient*)

IHC : Immunohistochimie (*immunohistochemistry*)

LSD : Plus petite différence significative de Fischer (*Fischer's Least Significant Difference*)

MA : Maladie d'Alzheimer

MP : Maladie de Parkinson

MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique

NA : Non applicable (*not applicable*)

NBF : *Neutral-buffered formalin* (équivalent de la SFA)

NeuN : Anticorps *Neuronal nuclei*

PBS : Tampon phosphate salin (*phosphate-buffered saline*)

ROI : Région d'intérêt (*region of interest*)

SA : Solution d'alcools

SCÉLERA : Sous-comité d'éthique du laboratoire d'enseignement et de recherche en anatomie

SD : *Standard deviation*

SFA : Solution de formaldéhyde 4%

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SSS : Solution saturée de sel (*saturated salt solution*)

TBS : Tampon TRIS salin (*TRIS-buffered saline*)

UQTR : Université du Québec à Trois-Rivières

Abréviations

c.-à-d. : c'est-à-dire

p. ex. : *exempli gratia* ou par exemple

min : minimum

max : maximum

I am among those who think that science has great beauty.

– Marie Curie

Remerciements

Je n'aurais pas pu réaliser ce mémoire sans la contribution et l'appui de nombreuses personnes auxquelles je souhaite offrir ma gratitude.

Je tiens d'abord à remercier chaleureusement ma directrice de recherche, Dre Josefina Maranzano, pour sa confiance, sa disponibilité et sa précieuse aide lors de ces quatre dernières années à travailler dans son laboratoire. Son engagement et ses judicieux conseils ont contribué à enrichir mon parcours académique et scientifique. Un petit mot juste pour toi : *Gracias por todo, no estaría haciendo estudios de posgrado si no fuera por una supervisora tan maravillosa como tú*.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude envers mon codirecteur, Dr Denis Boire, qui m'a offert son temps, ses conseils et une aide précieuse tout au long de mon parcours de recherche. Ses contributions et sa précieuse expérience sont un atout indispensable pour assurer la qualité de nos projets de recherche.

Je souhaite aussi remercier toute l'équipe de l'animalerie et du Département d'anatomie de l'Université du Québec à Trois-Rivières, ainsi que Walter Adame-Gonzalez et Dre Mahsa Dadar de l'Université McGill pour leur implication dans le projet. Sans leur aide, mon mémoire ne serait pas le même.

Je tiens également à adresser ma reconnaissance envers tous mes collègues de laboratoire, notamment Guillaume Laliberté, Philippe Pharand, Ève-Marie Frigon et Victoria Perreault. Nous sommes un laboratoire qui s'entraide énormément et je ne le changerais pour rien au monde.

Je n'oublie pas d'accorder une mention spéciale à Ève-Marie Frigon, car je ne serais pas où j'en suis présentement sans elle. Un gros merci pour tout son temps, son dévouement et sa disponibilité lors de ma formation, la réalisation de ma maîtrise et les dernières années à travailler avec elle. Son mentorat et ses conseils m'ont été d'une grande aide, mais son amitié était un bonus bien apprécié.

Enfin, parce que tout a commencé avec leur soutien infaillible, merci à ma famille adorée.

Introduction

1. Problématique

Les banques de cerveaux constituent la principale source de tissu nerveux humain pour la recherche (Insausti et al., 2023). Elles ne fournissent cependant que de petits blocs de tissu, le plus souvent fixé par immersion dans une SFA similaire à celle utilisée en recherche animale (Carlos et al., 2019; Dadar et al., 2024; Hulette, 2003; McFadden et al., 2019; Vonsattel et al., 2008). Les laboratoires d'enseignement de l'anatomie, quant à eux, pourraient offrir des cerveaux complets, puisqu'ils reçoivent annuellement un grand nombre de corps complets (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Insausti et al., 2023). Cependant, ces cerveaux sont peu ou pas utilisés en recherche parce qu'ils sont fixés avec des solutions autres que la SFA, telles que la solution saturée de sel (SSS) et la solution d'alcools (SA). Ces solutions comportent un plus faible pourcentage de formaldéhyde ainsi que d'autres produits chimiques (p. ex., chlorure de sodium, éthanol, phénol, etc.). Ceux-ci permettent une préservation des corps mieux adaptée à la dissection et l'enseignement dans les laboratoires d'anatomie, mais pourraient par le fait même affecter la qualité des procédures d'analyse couramment utilisées dans les laboratoires de recherche. Ces formulations chimiques pourraient également affecter l'antigénicité, la morphologie et la taille des cellules du cerveau (Howat & Wilson, 2014) de manière différente de la SFA. Ainsi, l'utilisation des cerveaux fixés par la SSS et la SA en recherche comme source alternative de tissu requiert une compréhension et une validation de leurs effets microscopiques sur le tissu nerveux.

2. Objectifs et hypothèses

L'objectif général de ce projet de recherche est de comparer les effets des deux solutions utilisées par les laboratoires d'anatomie sur l'histologie du cerveau, soit la SSS et la SA, avec ceux de la SFA communément utilisée en recherche animale et par les banques de cerveaux. Pour atteindre cet objectif, nous comparerons la structure neuronale entre les trois groupes à l'aide de variables quantitatives, telles que 1) la surface cellulaire segmentée, 2) le nombre de cellules marquées par un protocole d'immunohistochimie ciblant les neurones et 3) les diamètres des neurones. Ces variables ont été choisies, car elles permettent d'évaluer à la fois l'effet de la fixation sur le nombre, la taille et la forme des neurones.

2.1 Objectif spécifique 1

Le premier objectif spécifique est de comparer les effets des trois solutions de fixation sur les cerveaux de souris à l'aide des variables quantitatives mentionnées précédemment. Ceci permettra d'étudier l'effet des solutions sur le tissu nerveux sans avoir à considérer les variables confondantes associées avec la recherche sur les humains, telles qu'elles seront présentées au chapitre 2.

Comme le formaldéhyde est connu pour causer la rigidité des corps et la déshydratation du tissu (Brenner, 2014; Hayashi et al., 2016; Lombardero et al., 2017), nous nous attendons à ce qu'il y ait également une réduction de la taille des neurones. En effet, la surface et les diamètres neuronaux devraient être plus petits dans les cerveaux fixés avec la SFA que dans ceux des deux autres solutions (SSS et SA). Ces solutions ont une concentration moindre en formaldéhyde que la SFA, ce qui nous laisse penser que les effets de rigidité et de déshydratation ne devraient pas y être aussi prononcés. En revanche, nous ne pensons pas qu'il y aura de différence dans le nombre total de neurones marqués par immunohistochimie entre les solutions. En effet, l'analyse qualitative de l'antigénicité de la population neuronale réalisée précédemment sur les cerveaux de souris (Frigon et al., 2022b) a montré une distribution homogène des neurones de cerveaux fixés avec les trois solutions. Cela nous laisse donc envisager qu'il n'y aura pas non plus de différence sur le nombre total de neurones marqués avec un protocole d'immunohistochimie.

2.2 Objectif spécifique 2

Le deuxième objectif spécifique consiste à comparer les effets des trois solutions de fixation sur les cerveaux humains à l'aide des mêmes variables quantitatives. Ceci permettra de déterminer l'exploitabilité des cerveaux fixés par la SSS et la SA des laboratoires d'anatomie pour la recherche neuroscientifique quantitative sur les neurones. De plus, cet objectif permettra de voir si les effets des solutions sur le tissu nerveux sont différents en présence des variables confondantes associées aux humains.

Nous émettons ici les mêmes hypothèses qu'à l'objectif spécifique 1, c'est-à-dire que les cerveaux humains fixés avec la SFA auront des neurones de taille plus petite que les cerveaux fixés avec la SSS et la SA, mais qu'il n'y aura pas de différence dans le nombre de neurones détectés par immunohistochimie.

2.3 Objectif spécifique 3

Le troisième objectif spécifique est complémentaire aux deux premiers et vise à développer un protocole de segmentation automatique des surfaces neuronales. Le but ultime est de comparer les résultats générés automatiquement avec ceux produits manuellement, qui constituent la méthode de référence ("gold standard") (Hoffmann et al., 2024). Ainsi, ceci permettra de déterminer la précision et la variabilité des deux approches quand elles sont appliquées sur des images de tissu fixé avec des solutions de fixation différentes.

Une étude antérieure de notre groupe de recherche a démontré la présence d'artéfacts histologiques et d'un contraste plus foncé entre les cellules et l'arrière-plan des cerveaux fixés par la SSS en comparaison avec les deux autres solutions (Frigon et al., 2022b). Pour cette raison, nous prévoyons une segmentation automatique moins précise et plus variable pour les spécimens fixés avec la SSS.

3. Structure du mémoire

Le chapitre 1 de ce mémoire consiste en une revue de la littérature sur la fixation. D'abord, un résumé de l'évolution de la fixation des corps sera introduit, car plusieurs produits historiquement utilisés pour la préservation se retrouvent dans les formulations des solutions anatomiques modernes. Ensuite, les mécanismes d'action, les avantages et les inconvénients des trois solutions de fixation utilisées dans ce projet de maîtrise seront comparés. Finalement, les différentes voies d'administration de ces solutions de fixation seront discutées afin de comparer les principales techniques utilisées en recherche animale, dans les banques de cerveaux et dans les laboratoires d'anatomie humaine.

Le chapitre 2 expose la méthodologie de ce projet de maîtrise. Les avantages et inconvénients de chaque méthode utilisée sur la souris et l'humain y seront discutés, afin de comprendre les raisons qui justifient le choix de chaque option.

Le chapitre 3 comprend un article scientifique qui traite des résultats obtenus sur les cerveaux de souris, qui répondent aux objectifs spécifiques 1 et 3. Cet article sera soumis sous peu au journal *Frontiers in Neuroanatomy*.

Le chapitre 4 porte sur nos résultats sur les cerveaux humains. Il répond spécifiquement aux objectifs 2 et 3. Seuls les résultats découlant de la méthode manuelle sont disponibles pour le

moment, donc ce chapitre est écrit en tant que résultats supplémentaires. L'article est actuellement en préparation et sera éventuellement soumis au même journal.

Finalement, la discussion globale des résultats, les limites de l'étude et les perspectives constituent le chapitre 5.

Chapitre 1 – Revue de littérature : Fixation

La fixation des tissus biologiques implique des procédés physiques ou chimiques qui ont pour effet de les préserver de la dégradation après la mort (Kasukurthi et al., 2009). Le but est de conserver l'architecture et la composition cellulaire des tissus et d'empêcher la décomposition, qui se fait par l'autolyse (digestion interne des cellules) et la putréfaction (décomposition bactérienne) (Arnold et al., 1996; Brenner, 2014; Musiał et al., 2016; Thavarajah et al., 2012). Les solutions de fixation comprennent généralement divers produits chimiques qui empêchent la croissance des microorganismes, mais qui peuvent également modifier les caractéristiques physico-chimiques des tissus (Holmes et al., 2017) ainsi que leur morphologie (Alkemade et al., 2023; Haga et al., 2019; Kotrotsou et al., 2014; Vasung et al., 2019). De plus, il existe une grande diversité dans la composition chimique des solutions de fixation. Ainsi, leurs effets sur les propriétés du tissu pourraient également varier d'une solution de fixation à l'autre (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Martins-Costa et al., 2022; Nicholson et al., 2005; Shetty et al., 2020; van Essen et al., 2010). La nature d'un protocole de recherche dictera de ce fait quel fixateur est le plus approprié selon l'application, que ce soit en imagerie médicale, en histologie ou autre.

La première partie de ce chapitre traite de l'évolution des procédures de fixation et de leurs applications au fil des années, de leur développement initial jusqu'à aujourd'hui. La deuxième partie traite plus précisément des solutions étudiées dans le présent mémoire. Finalement, la troisième partie aborde les techniques d'administration des fixateurs.

1. Découverte et évolution

La préservation des corps a une histoire riche et intéressante qui mérite d'être étudiée afin de comprendre les usages et procédés actuels. Tant pour la momification des corps humains en Égypte antique il y a plus de 3000 ans (Balta et al., 2015; Weiglein, 2002) que pour les embaumements funéraires et scientifiques modernes, le but principal de la fixation est de freiner la décomposition des tissus après le décès (Balta et al., 2015; Weiglein, 2002). En ce sens, Brenner (2014) identifie quatre grandes périodes dans l'application des solutions de fixation des tissus : les cultures anciennes, la période des anatomistes, la période funéraire et la préservation anatomique moderne.

1.1 Cultures anciennes

Cette période s'étend sur plusieurs siècles, approximativement de 7000 ans avant J.-C. jusqu'à 1400. Au cours de celle-ci, les croyances religieuses et spirituelles motivent le développement de méthodes de préservation des corps. Plusieurs cultures anciennes croyaient en la vie après la mort, qui n'était possible que pour les corps maintenus en bon état de conservation (Brenner, 2014; de Paula et al., 2018; Ezugworie et al., 2008; Weiglein, 2002). Cela a mené à plusieurs essais afin d'optimiser les processus de préservation. Ces essais varient non seulement d'une culture à l'autre, mais aussi en complexité.

La préservation naturelle des corps ne requiert pas d'intervention humaine (Brenner, 2014; Lynnerup, 2007). Au contraire, le développement des méthodes artificielles se base sur l'imitation des conditions environnementales propices à la préservation adéquate des corps (Lynnerup, 2007). Que ce soit une préservation accidentelle ou volontaire par les cultures anciennes, la compréhension des effets observés de la préservation dans ces corps retrouvés est primordiale.

Parmi les moyens naturels de préservation utilisés à l'époque des cultures anciennes, on recense entre autres les températures extrêmes pour sécher ou congeler les corps ainsi que les propriétés physico-chimiques des sols dans lesquels les corps sont entreposés. Ces propriétés peuvent inclure la température, le pH ainsi que la présence de matières minérales et organiques (Brenner, 2014; Johnson et al., 2012). Dans tous les cas, les divers facteurs impliqués doivent freiner l'autolyse et la putréfaction, qui se font via l'action des enzymes et des bactéries.

Au fil des années, plusieurs corps datant de cette période ont été retrouvés. Par exemple, la culture chinchorro provenant du nord du Chili (approximativement de 7000 à 1500 ans avant J.-C.) maximisait les conditions de leur milieu dans le désert d'Atacama pour procéder à la momification spontanée de leurs défunts (Aufderheide et al., 1993; Brenner, 2014; Marquet et al., 2012). Le climat aride et chaud du désert fournissait les conditions optimales pour la dessiccation des corps, qui se traduit par le retrait de l'eau des tissus. Or, l'eau est primordiale pour la progression des deux procédés de décomposition des corps, soit l'autolyse des cellules et la décomposition bactérienne. Ainsi, la dessiccation devient une méthode de préservation (Lynnerup, 2007). D'autres exemples de momification naturelle par dessiccation ont été retrouvés dans des climats chauds d’autres régions : en Nubie (ancienne région de l'Afrique du Nord-Est), aux îles Canaries et sur le vaste

territoire des tribus autochtones au sud-ouest de l'Amérique (géographiquement au sud des États-Unis et au nord du Mexique) (Cockburn & Cockburn, 1980; Lynnerup, 2007). En présence d'un climat froid et aride, la congélation contribuait à la momification naturelle, plus spécifiquement par la lyophilisation. Dans ces cas, il y a un effet d'inhibition du climat froid sur l'activité des enzymes et des bactéries responsables de la décomposition ainsi qu'une déshydratation engendrée par le climat aride (Lynnerup, 2007). Par exemple, des corps momifiés naturellement par la congélation ont été retrouvés en Arctique, aux îles Aléoutiennes (Alaska), au Canada, en Sibérie et dans les régions en haute altitude, telles que les Alpes, les montagnes Rocheuses et la cordillère des Andes (Lynnerup, 2007). Dans ces cas, la préservation des corps n'était souvent pas volontaire, mais plutôt le résultat des conditions dans lesquelles le corps est mis à la suite de sacrifices humains (p. ex., les Incas dans les Andes) (Ceruti, 2015). Finalement, la découverte de momies de tourbière ("bog bodies") a permis de comprendre un autre aspect de la préservation naturelle. Ces corps, retrouvés principalement en Scandinavie, au Royaume-Uni et en Irlande (Balta et al., 2015; Dell'Amore, 2014), ont été conservés grâce à la composition du microenvironnement des tourbières (Lynnerup, 2007). Les eaux froides acides et anaérobiques de celles-ci, dans lesquelles les corps sont immergés, permettent l'inhibition de la décomposition (Lynnerup, 2007). Comme dans la dessiccation ou la congélation, l'activité des microorganismes est bloquée par ces conditions environnantes et permet ainsi la préservation des tissus mous.

Au fil des années, les cultures anciennes ont développé des méthodes artificielles des plus simples aux plus complexes qui ont servi à établir les bases de celles d'aujourd'hui. Ces méthodes artificielles incluent toutes les interventions humaines employées dans le but de préserver les corps (Brenner, 2014). Par exemple, en plus d'exploiter les conditions propices à la dessiccation des corps de leurs défunts, la culture chinchorro a développé des méthodes de momification artificielle qui précèdent celles rapportées par les Égyptiens (Aufderheide et al., 1993; Brenner, 2014). Ils utilisaient des végétaux ou de la fourrure de camélidés qu'ils retrouvaient dans leur environnement pour conserver leurs défunts de façon esthétique (Aufderheide et al., 1993). De plus, les Chinchorros ont utilisé des interventions plus complexes, telles que l'éviscération (action de retirer les viscères), le retrait du tissu mou des extrémités, la restauration esthétique, la reconstruction synthétique de l'extérieur des corps et l'enrobage en argile (Aufderheide et al., 1993). Les anciens Égyptiens jumelaient la dessiccation naturelle des corps par le Soleil ou le feu à des interventions plus complexes, telles que l'éviscération (de Paula et al., 2018) et le remplissage des cavités par de

la myrrhe (gomme-résine aromatique), des alcools, des épices, des parfums ou des sels (Udoaka et al., 2009). Les anciens Babyloniens, les Perses et les Syriens utilisaient l'immersion dans du miel ou de la cire pour la préservation des corps lors de leur transport (Brenner, 2014; de Paula et al., 2018; Udoaka et al., 2009). Les Ogonis qui habitaient le territoire du Nigéria utilisaient plutôt de larges volumes d'alcools, de potasse (groupe de sels minéraux et chimiques), de substances végétales et d'huiles (Brenner, 2014; Udoaka et al., 2009).

Plusieurs autres exemples pourraient être nommés pour illustrer la diversité des méthodes artificielles employées par les cultures anciennes variées. Or, le but est de mettre l'accent sur les techniques et produits utilisés historiquement qui ont survécu les époques jusqu'à aujourd'hui. Par exemple, la congélation est toujours utilisée par les laboratoires d'anatomie pour congeler les corps entre les périodes de dissection sur du tissu frais (Song & Jo, 2022). Elle est aussi utilisée par les banques de cerveaux, qui congèlent souvent un des deux hémisphères pour des études basées sur l'extraction d'ADN et ARN (Hade et al., 2024; Hulette, 2003; Shepherd et al., 2019; Waldvogel et al., 2008). Par ailleurs, l'ajout de différents types d'alcools et de sels dans les formulations anatomiques modernes est souvent employé (Benet et al., 2014; Coleman & Kogan, 1998). Certains composants chimiques sont également ajoutés à ces solutions de fixation modernes pour imiter l'effet de dessiccation décrit précédemment.

1.2 Période des anatomistes

La période des anatomistes marque une transition progressive des buts religieux et spirituels de la préservation vers les objectifs scientifiques des anatomistes. Les découvertes scientifiques en médecine pendant la Renaissance (environ 1400-1600) (de Paula et al., 2018; Toledo-Pereyra, 2015) ont incité à la recherche de solutions pour la préservation de cadavres pour la dissection et l'avancement des connaissances anatomiques (Brenner, 2014; Ezugworie et al., 2008). Plusieurs nouvelles techniques d'embaumement ont vu le jour durant cette période, dont l'injection des solutions de préservation dans les vaisseaux sanguins (de Paula et al., 2018). Cette technique a été développée et améliorée au fil du temps par les travaux de plusieurs scientifiques, dont da Vinci (1452-1519), Harvey (1578-1657), Ruysch (1638-1731) et Hunter (1718-1783) (Brenner, 2014; Ezugworie et al., 2008). Ces derniers ont injecté une panoplie de produits chimiques et de substances naturelles différentes, telles que des solutions colorées qui durcissent dans les vaisseaux, de la cire, de l'eau chaude, du mercure, de la térébenthine, des alcools et des sels

(Brenner, 2014). Ruysch était connu pour injecter une solution de *liquor balsamicum*, dont les ingrédients étaient secrets. Il est cru que celle-ci contenait du sang de cochon coagulé, du bleu de Berlin (maintenant appelé bleu de Prusse) et de l'oxyde de mercure (Brenner, 2014). Tout cela a ouvert la porte au domaine de la chimie afin de trouver une solution de fixation idéale pour une bonne préservation des corps (Brenner, 2014; de Paula et al., 2018; Trompette & Lemonnier, 2009).

Les avancées majeures de cette période ont eu des répercussions importantes sur l'évolution des processus de préservation. Certaines des méthodes employées lors de cette période sont encore en application aujourd'hui. Bien que les formulations des solutions de fixation aient été optimisées depuis la période des anatomistes, l'idée de base de mélanger des produits fixateurs et de les injecter dans les vaisseaux sanguins demeure la méthode la plus employée par les laboratoires d'anatomie modernes (Benninger et al., 2014; Feigl & Sammer, 2022; Mohebimoushaei et al., 2025).

1.3 Période funéraire

Cette période aurait commencé aux alentours de la guerre de Sécession américaine en 1861 (Brenner, 2014). Cette fois-ci guidées par des raisons sentimentales, la préservation et la conservation des corps de façon esthétique étaient nécessaires pour les garder intacts jusqu'au déroulement des cérémonies funéraires (Balta et al., 2015; Beard & Burger, 2017; Brenner, 2014; de Paula et al., 2018). En effet, les corps des soldats décédés sur le champ de bataille devaient parfois être transportés sur des centaines à des milliers de kilomètres. Afin d'éviter les dommages aux corps causés par l'environnement et les risques d'infection, les corps étaient entreposés dans des cercueils de métal développés pendant la Révolution industrielle (Beard & Burger, 2017). Cependant, cela n'empêchait pas la dégradation des corps lors du transport. Pour ce faire, les méthodes d'embaumement incluaient le retrait des liquides et gaz corporels, l'ajout d'un désinfectant et l'éviscération suivie de la fixation des organes, qui étaient ensuite remis dans les cavités (Brenner, 2014).

Cette période est souvent considérée comme la naissance de l'embaumement moderne (Ezugworie et al., 2008), car elle promeut l'importance d'une fixation qui préserve tant l'extérieur (apparence esthétique pour les cérémonies funéraires) que l'intérieur du corps (frein de la décomposition des tissus). Ces deux caractéristiques sont importantes à considérer dans le contexte actuel des laboratoires d'anatomie, car le tissu doit être manipulable et sécuritaire pour une dissection réaliste

par les utilisateurs. De plus, l'intégrité du tissu à l'échelle microscopique doit être conservée pour son utilisation en recherche. Les méthodes qui permettront de maintenir ces deux caractéristiques seront optimisées dans la période historique qui suit.

1.4 Préservation anatomique moderne

Cette période commence vers la fin du 19^{e} siècle et s'étend jusqu'à aujourd'hui. Au fil des années, les fonctions de plusieurs produits chimiques dans la fixation des corps ont été découvertes. Par exemple, l'alcool ou le chlorure de sodium, tous deux utilisés depuis les cultures anciennes, ont des effets de dessiccation qui éliminent l'eau des tissus et ralentissent par conséquent les procédés de décomposition du corps (Lynnerup, 2007). Le phénol, introduit au milieu du 19^{e} siècle, a des propriétés préservatrices ainsi que des propriétés fongicides et bactéricides puissantes qui bloquent la croissance de microorganismes et leurs effets de putréfaction (Brenner, 2014; Tomalty et al., 2019). Le formaldéhyde, découvert à la fin du 19^{e} siècle, empêche l'entrée des microorganismes et freine la décomposition. Ses propriétés préservatrices puissantes ont fondamentalement remodelé le domaine de l'embaumement (Bedino, 2003; Brenner, 2014). Le glycérol a un effet humectant qui contrôle l'humidité des tissus humains, afin d'assurer une bonne pénétration des fixateurs (Brenner, 2014). Toutes ces fonctions ont été jumelées afin de créer des solutions de fixation optimisées et maintenant utilisées dans la préservation anatomique moderne. Elles seront d'ailleurs revues dans la section sur les mécanismes d'action des solutions utilisées pour ce mémoire.

Malgré cela, les solutions de fixation qui sont encore utilisées de nos jours pour préserver les corps humains ne sont pas parfaites. Les produits chimiques qui les composent peuvent avoir des effets délétères sur la santé humaine ou sur les caractéristiques macroscopiques ou microscopiques des tissus (voir section 2). Ainsi, en dépit de toutes les découvertes qui ont été faites, la formulation de la solution de fixation idéale pour tout type d'application nous élude toujours (Doyle & O'Leary, 1992; Hayashi et al., 2016; Hobro & Smith, 2017; Moelans et al., 2011; Thavarajah et al., 2012).

2. Solutions de fixation

Une solution de fixation idéale devrait : 1) prévenir le rétrécissement du tissu, 2) conserver l'intégrité des cellules et de la matrice extracellulaire et 3) conserver les liens chimiques originaux entre les molécules (Doyle & O'Leary, 1992). En plus de ces caractéristiques de base, le fixateur idéal devrait être bien adapté selon l'usage souhaité des corps. À cet égard, plusieurs facteurs

devraient être considérés lors du choix d'un fixateur adapté à l'application qu'on en fait (Balta et al., 2015) : 1) la capacité de prévenir la croissance de microorganismes qui pourraient décomposer le tissu ou causer des infections chez les personnes entrant en contact avec le cadavre (p. ex., étudiants, enseignants, anatomistes, chercheurs, employés de maisons funéraires, etc.), 2) la toxicité des produits chimiques composant la solution, 3) la qualité macroscopique du tissu (p. ex., couleur, rigidité des articulations, déshydratation du tissu, texture, etc.) et 4) la durée de la période durant laquelle le corps peut être utilisé avant le début de la décomposition (Bradbury & Hoshino, 1978; Brenner, 2014; Coleman & Kogan, 1998; Fox et al., 1985; Hayashi et al., 2014; Musiał et al., 2016; Shoja et al., 2013; Thavarajah et al., 2012; Woodburne & Lawrence, 1952).

2.1 Principes de la fixation

2.1.1 Types de solutions

La recherche d'une solution idéale a mené au développement de plusieurs solutions de fixation contenant les produits chimiques présentés brièvement dans la section 1. Bien que ces solutions ne soient pas "idéales", elles peuvent répondre à plusieurs des critères mentionnés précédemment et être bien adaptées pour l'usage qu'on en fait. Dans cette perspective, on regroupe habituellement ces solutions en deux grands types selon leurs caractéristiques macroscopiques générales : les solutions produisant une fixation dite "dure" et les solutions produisant une fixation dite "souple".

2.1.1.1 Solutions produisant une fixation dure

Les solutions produisant une fixation dure ("hard-fixed") produisent des cadavres rigides avec des organes internes durs au toucher et dont la flexibilité des articulations est moindre qu'un corps frais (non fixé) (Balta et al., 2017). Bien que ce type de fixation produise des corps bien fixés sur une longue période, ce ne sont pas des modèles idéaux pour l'enseignement. La couleur, la texture et la flexibilité des corps sont altérées par la fixation dure et ne représentent pas fidèlement les conditions naturelles retrouvées chez le vivant. Cela peut donc nuire au réalisme des simulations chirurgicales pratiquées sur des cadavres et à l'application de ces compétences sur un patient vivant (Balta et al., 2017; Kaliappan et al., 2023). Il est à noter que toutes les solutions de ce type contiennent du formaldéhyde (Balta et al., 2015), qui est le composant chimique principal déterminant la rigidité de la fixation.

2.1.1.2 Solutions produisant une fixation souple

Les solutions produisant une fixation souple ("soft-fixed") produisent des cadavres dont les organes internes sont plus souples au toucher et dont la flexibilité des articulations est égale ou supérieure à un corps frais (Balta et al., 2017; Tomalty et al., 2019). Ces solutions peuvent contenir une faible concentration de formaldéhyde ou en être exemptes (généralement moins de 1%) (Kaliappan et al., 2023). Les caractéristiques macroscopiques d'une fixation souple (couleur, texture et flexibilité) sont plus semblables à celles des vivants que celles de la fixation dure (Barton et al., 2009; Giger et al., 2008; Hunter et al., 2014; Rahman et al., 2021; Tomalty et al., 2019). De ce fait, ces cadavres sont plus appropriés dans le cadre de simulations réalistes de diverses techniques chirurgicales (Balta et al., 2015; Kaliappan et al., 2023).

2.1.2 Mécanismes d'action

En plus de classifier les solutions de fixation selon leurs effets sur les caractéristiques macroscopiques des cadavres (fixation dure vs fixation souple), on peut aussi les distinguer à l'échelle microscopique selon leur mécanisme d'action. Il en existe deux principaux, à savoir les fixateurs coagulants et les fixateurs non coagulants (Eltoum et al., 2001).

2.1.2.1 Fixateurs coagulants

Les protéines sont organisées en quatre niveaux de structure : primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire (Khan Academy, 2026a). Les structures primaire et secondaire réfèrent respectivement à la séquence d'acides aminés et aux liaisons locales qui forment les polypeptides (hélices α et feuillets β) (LaPelusa & Kaushik, 2026). La structure tertiaire réfère aux liaisons générales contribuant à la tridimensionnalité de la protéine (ponts hydrogène, liens ioniques, interactions hydrophobes, ponts disulfure, etc.) (LaPelusa & Kaushik, 2026). Ces liaisons sont normalement des interactions avec les chaînes latérales des acides aminés. La structure quaternaire n'est pas présente chez toutes les protéines, car certaines sont simplement constituées d'une chaîne de polypeptide. Dans les cas où une protéine est composée de plusieurs polypeptides (p. ex., hémoglobine), la structure quaternaire réfère aux interactions qui lient ces sous-unités ensemble pour donner la forme finale de la protéine (LaPelusa & Kaushik, 2026).

Les fixateurs coagulants sont des solutions qui entraînent la précipitation des protéines (Cabrera et al., 2017; Eltoum et al., 2001). Cette précipitation cause une perturbation des conformations

tertiaires ou quaternaires des protéines qui maintiennent l'architecture du tissu, notamment les lipoprotéines et les protéines fibreuses, et entraîne leur agglomération en un réseau stable et "fixé" (Eltoum et al., 2001). Ce processus de perturbation des conformations protéiques peut être engendré par la déshydratation provoquée par des alcools ou par le changement de charges électriques par des acides (Eltoum et al., 2001).

2.1.2.2 Fixateurs non coagulants

Les fixateurs non coagulants sont des solutions qui produisent un pontage biochimique, créant ainsi des liens moléculaires dans les protéines, dans les acides nucléiques et entre les protéines et les acides nucléiques du tissu (Cabrera et al., 2017; Eltoum et al., 2001). Le tissu est dit "fixé", car ces pontages entre les molécules du tissu créent un réseau de protéines stable et rigide. La plupart de ces réactions sont engendrées par les groupes aldéhydes du fixateur, qui sont chimiquement et biologiquement très réactifs (Eltoum et al., 2001).

2.2 Solutions utilisées

Ce mémoire traitera plus particulièrement de trois solutions de fixation utilisées à l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) : 1) la solution de formaldéhyde (SFA), 2) la solution saturée de sel (SSS) et 3) la solution d'alcools (SA). La composition chimique de ces trois solutions est rapportée au Tableau 1. Le contexte historique, les mécanismes d'action, les avantages et inconvénients ainsi que les applications de chacune des trois solutions seront discutées dans cette section.

La SFA et la SA sont classifiées comme des solutions engendrant une fixation dure, car elles produisent des cadavres plus rigides et contiennent plus de 1% de formaldéhyde (seuil généralement observé). La SSS est classifiée comme une solution engendrant une fixation souple, car les cadavres produits sont flexibles et sa composition chimique contient moins de 1% de formaldéhyde.

Fixateurs	SFA	SSS (Coleman & Kogan, 1998; UQTR, 1993)	SA (souris) (Benet et al., 2014)	SA (humains) (UQTR, 1993)
Produits chimiques	Formaldéhyde 4%	Formaldéhyde 0.8%	Formaldéhyde 2.3%	Formaldéhyde 1.4%
	Tampon phosphate salin 0.1M	NaCl 36%	Éthanol 62.4%	Éthanol 69%
		Phénol 0.72%	Phénol 10.2%	Phénol 1.9%
		Glycérol 2%	Glycérol 17%	Glycérol 20.9%
		Alcool isopropylique 16%		Sodium acétate 0.006%
		Dettol 2.5%		Dettol 2.8%

Tableau 1. – **Composition chimique des fixateurs**. SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; NaCl = chlorure de sodium

2.2.1 Solution de formaldéhyde (SFA)

La forme polymérisée du formaldéhyde (paraformaldéhyde) a été synthétisée pour la première fois en 1859 par le chimiste russe Alexander Butlerov (1828-1886) (de Paula et al., 2018; Donczo & Guttman, 2018; Musiał et al., 2016; Omran et al., 2020). Sa formule exacte a été élucidée en 1868 par August Wilhelm Hofmann (1818-1892), un chimiste allemand qui a découvert un protocole simplifié de synthèse du formaldéhyde à partir de méthanol (Boon & Kok, 2008; Hayashi et al., 2016; Martins-Costa et al., 2022; Musiał et al., 2016; Puchtler & Meloan, 1985). Les propriétés chimiques de ce composé ont été découvertes dans les années subséquentes, facilitant ainsi sa production industrielle. Ce n'est qu'au milieu des années 1890 que Ferdinand Blum expose ses propriétés de fixation des tissus (Boon & Kok, 2008; de Paula et al., 2018; Donczo & Guttman, 2018; Musiał et al., 2016; Puchtler & Meloan, 1985; Weiglein, 2002).

Plus d'un siècle après sa découverte, le formaldéhyde demeure le fixateur le plus utilisé pour préserver tant les corps d'humains et d'animaux (Balta et al., 2015; Bedino, 2003; Brenner, 2014; Cabrera et al., 2017; de Paula et al., 2018; Donczo & Guttman, 2018; Fox et al., 1985; Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Grigorev & Korzhevskii, 2018; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al.,

2016; Lombardero et al., 2017; Martins-Costa et al., 2022; McLachlan & Patten, 2006; Moelans et al., 2011; Musiał et al., 2016; Rahman et al., 2021; Shetty et al., 2020; Thavarajah et al., 2012; Tomalty et al., 2019). C'est d'ailleurs le fixateur le plus couramment utilisé par les banques de cerveaux fournissant du tissu pour la recherche (Carlos et al., 2019; Dadar et al., 2024; Hulette, 2003; McFadden et al., 2019; Sheedy et al., 2008; Vonsattel et al., 2008).

2.2.1.1 Mécanisme d'action

La SFA est un fixateur non coagulant contenant du formaldéhyde. La fixation des tissus découle de la formation de ponts biochimiques entre les molécules du tissu (Eltoum et al., 2001; Hobro & Smith, 2017; Thavarajah et al., 2012). Le formaldéhyde est un gaz dont les petites molécules (HCHO) sont très solubles dans l'eau (Kiernan, 2000). En solution aqueuse, ses groupes aldéhydes (-CHO) réagissent avec les molécules d'eau (H_2O) pour former de l'hydrate de méthyle ($HOCH_2OH$) (Figure 1A), plus communément désigné comme la forme hydratée du formaldéhyde (Boon & Kok, 2008; Eltoum et al., 2001; Fox et al., 1985; Kiernan, 2000; Thavarajah et al., 2012). Ensuite, les molécules d'hydrate de méthyle réagissent avec plusieurs chaînes latérales des acides aminés des protéines pour former des groupes réactifs d'hydroxyméthyle ($-CH_2OH$) (Figure 1B) (Boon & Kok, 2008; Eltoum et al., 2001). Les acides aminés les plus compatibles à cette réaction avec le formaldéhyde sont la cystéine, la lysine, l'histidine et la tyrosine, puisque leurs chaînes latérales sont hautement réactives avec l'hydrate de méthyle (Eltoum et al., 2001). Puis, l'hydroxyméthyle, qui est en fait un pont de méthylène ($-CH_2-$) avec un groupe hydroxyle (-OH), peut réagir avec d'autres protéines pour former des ponts de méthylène ($-CH_2-$) entre les protéines (Figure 1C) (de Paula et al., 2018; Eltoum et al., 2001; Kiernan, 2000; Thavarajah et al., 2012). Cela modifie les structures tertiaires et quaternaires des protéines, c'est-à-dire qu'elles se plient de façon différente qu'on les retrouve *in vivo* (Evers et al., 1998; Grigorev & Korzhevskii, 2018). Finalement, c'est la répétition de cette réaction qui forme un réseau de ponts de méthylène entre les protéines du tissu, ce qui crée un réseau stable et rigide qui empêche l'entrée des microorganismes et fixe le tissu. La réaction décrite dans ce paragraphe peut s'appliquer aussi pour les acides nucléiques et certains lipides, mais pas pour les glucides (Boon & Kok, 2008; Eltoum et al., 2001). Ces derniers sont fixés indirectement, en étant confinés dans le réseau de ponts biochimiques des autres macromolécules.

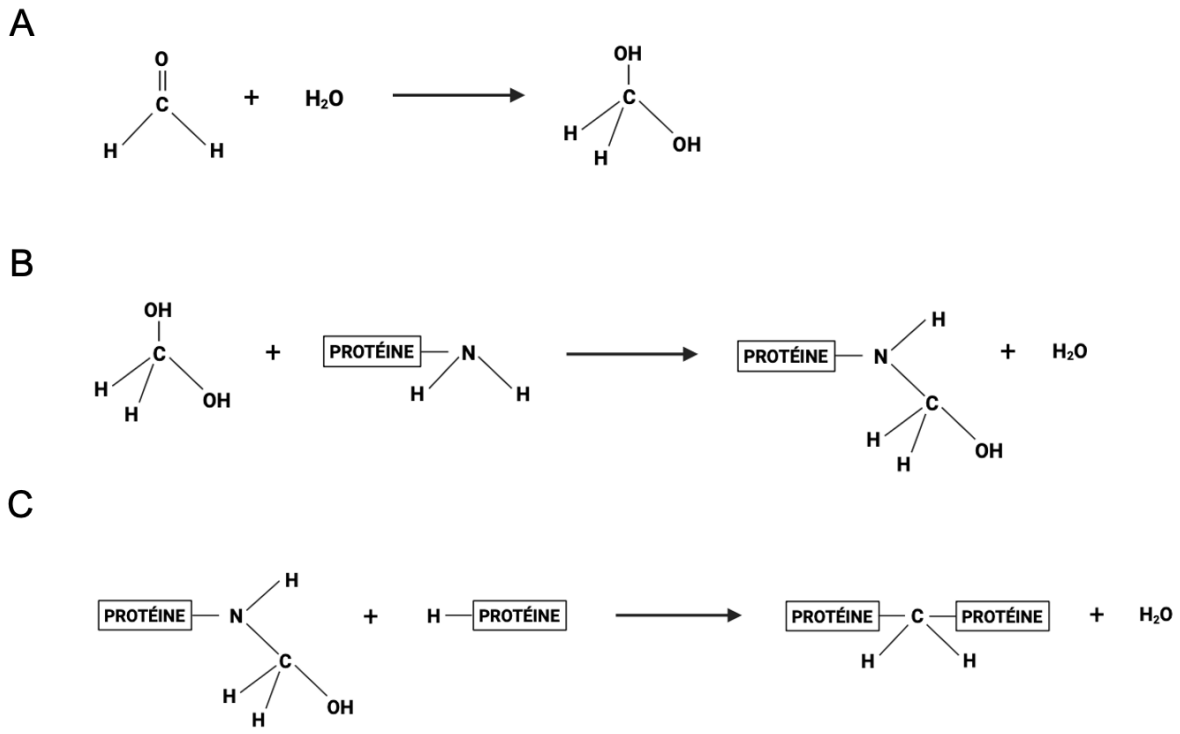


Figure 1. – **Réactions chimiques menant à la fixation par le formaldéhyde**. Formation de l'hydrate de méthyle (A). Formation des groupes réactifs d'hydroxyméthyle (B). Formation des ponts de méthylène entre les protéines du tissu (C). Figure créée sur BioRender.

Le formaldéhyde, sous sa forme monomérique d'hydrate de méthyle, peut former des polymères (Thavarajah et al., 2012). Cependant, l'hydrolyse de ces polymères est nécessaire pour l'activation de ses propriétés de fixation des tissus biologiques (Kiernan, 2000). Cette réaction d'hydrolyse est accélérée par la dilution du formaldéhyde dans un tampon à pH physiologique (pH optimal dans les systèmes biologiques, entre 7.35 et 7.45) (Hopkins et al., 2026), comme le tampon phosphate (Kiernan, 2000; Pearse, 1980). C'est la présence des ions hydroxyles du tampon qui augmente la vitesse de la réaction (Kiernan, 2000). Lorsque le formaldéhyde est dilué dans un tampon neutre ou légèrement alcalin, on parle de formol tamponné à pH neutre ("neutral-buffered formalin") (Eltoum et al., 2001). Les fabricants y ajoutent fréquemment une concentration de 10% de méthanol, car cet alcool ralentit la polymérisation (Kiernan, 2000).

2.2.1.2 Avantages et inconvénients

La SFA est peu coûteuse et aisément accessible, en plus de posséder d'excellentes propriétés bactéricides, fongicides et insecticides (Balta et al., 2015; Brenner, 2014; Hayashi et al., 2014;

Hayashi et al., 2016; Janczyk et al., 2011; Musiał et al., 2016; Otsuka et al., 2022; Thavarajah et al., 2012; Tomalty et al., 2019). Comme mentionné précédemment, le formaldéhyde agit en créant des ponts biochimiques entre les protéines et les acides nucléiques des cellules (Blum, 1896; de Paula et al., 2018; Grigorev & Korzhevskii, 2018; Helander, 1994; Hobro & Smith, 2017; Ma et al., 2024; O'Rourke & Padula, 2016; Puchtler & Meloan, 1985; Wu et al., 2022). Cela permet ainsi la fixation du tissu et le blocage de l'entrée de microorganismes qui pourraient y croître (Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016). Bien que ce pontage biochimique lui procure ses excellentes propriétés antiseptiques et de fixation des tissus, il nuit par le fait même à l'immunoréactivité du tissu lors de protocoles de colorations immunohistologiques (p. ex., immunofluorescence et immunohistochimie) (Arnold et al., 1996; Boon & Kok, 2008; de Paula et al., 2018; Eltoum et al., 2001; Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Hobro & Smith, 2017; Moelans et al., 2011; Puchtler & Meloan, 1985; Stumptner et al., 2019; Suthipintawong et al., 1996; Wu et al., 2022). En effet, les ponts créés par la fixation modifient les structures tertiaires et quaternaires des protéines (Evers et al., 1998; Grigorev & Korzhevskii, 2018). Cela peut masquer les épitopes ciblés par les anticorps en créant une barrière stérique qui les empêche de se lier à leur antigène cible et nuit ainsi au marquage histologique (Azumi & Battifora, 1987; Battifora & Kopinski, 1986; Boon & Kok, 2008; Boon et al., 1992; de Paula et al., 2018; Leong & Gilham, 1989; Moelans et al., 2011; Unhale et al., 2012; Wu et al., 2022). De plus, la petite taille des molécules du formaldéhyde facilite sa diffusion rapide dans le tissu (Kiernan, 2000; Thavarajah et al., 2012). En revanche, l'établissement des ponts de méthylène est progressif et se poursuit sur une longue période. Ainsi, leur densité augmente avec le temps d'exposition à la solution de fixation (Kiernan, 2000). Conséquemment, la qualité du marquage histologique est compromise dans les cerveaux longtemps immergés dans la SFA, tels que ceux conservés dans les banques de cerveaux. Dans ces cas, des traitements de récupération des antigènes du tissu peuvent être requis pour permettre leur utilisation dans des protocoles immunohistologiques.

D'un point de vue macroscopique, le réseau fixe et rigide de ponts biochimiques entre les macromolécules, qui est engendré par le formaldéhyde, cause la rigidité des cadavres. Cela aboutit à une diminution du volume ainsi qu'à une altération de la couleur et de la texture des tissus biologiques (Balta et al., 2015; Barton et al., 2009; Brenner, 2014; Eisma et al., 2013; Eisma et al., 2011; Frigon et al., 2022b; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016; Jaung et al., 2011; Mayer, 2006; Regelsberger et al., 2015; Richins et al., 1963; Tomalty et al., 2019; Venne et al., 2020;

Weisbecker, 2012). La durée de fixation complète des corps peut également prendre jusqu'à six mois, ce qui est plus long que la SSS, mais moins long que la SA (UQTR, 1993). Les indicateurs macroscopiques d'une fixation complète d'un corps entier comprennent généralement le changement de couleur de la peau au fur et à mesure que le sang est remplacé par le fixateur, la texture moins souple et plus rigide du tissu et l'absence de la croissance de moisissures (UQTR, 1993).

De plus, les vapeurs de formaldéhyde sont carcinogènes et peuvent compromettre la santé des usagers des laboratoires d'anatomie. Parmi les effets rapportés, on retrouve une augmentation de l'incidence des tumeurs malignes attaquant les systèmes hématopoïétique et lymphatique (Hammer et al., 2012; Hayes et al., 1990; O'Sullivan & Mitchell, 1993; Shetty et al., 2020), des cancers du nasopharynx (Brenner, 2014; Lombardero et al., 2017; Shetty et al., 2020), des cancers naso-sinusiens (Brenner, 2014), une irritation des yeux, de la peau et du système respiratoire (Akbar-Khanzadeh et al., 1994; Brenner, 2014; Chia et al., 1992; de Paula et al., 2018; Hammer et al., 2012; Hayashi et al., 2016; Kim et al., 1999; Kriebel et al., 2001; Lakchayapakorn & Watchalayarn, 2010; Lombardero et al., 2017; Martins-Costa et al., 2022; Mizuki & Tsuda, 2001; Muzi et al., 2004; Otsuka et al., 2022; Pabst, 1987; Puchtler & Meloan, 1985; Shetty et al., 2020; Suruda, 2003; Tanaka et al., 2003; Viegas et al., 2010; Wolkoff & Nielsen, 2010), une diminution de l'odorat (Ahmed, 2011; Brenner, 2014; Khaliq & Tripathi, 2009; Lakchayapakorn & Watchalayarn, 2010; Mirabelli et al., 2011; Ohmichi et al., 2006; Raja & Sultana, 2012; Takahashi et al., 2007; Vohra, 2011) et des effets neuropsychologiques (Hammer et al., 2012; Marceaux et al., 2008). Le formaldéhyde peut aussi causer des mutations artificielles de l'ADN (Boon & Kok, 2008; Williams et al., 1999) et des altérations chromosomiales (Shetty et al., 2020) dans tous types de tissus.

La toxicité du formaldéhyde (Brenner, 2014; Coleman & Kogan, 1998; de Paula et al., 2018; Hayashi et al., 2016; Lombardero et al., 2017; Moelans et al., 2011; Musiał et al., 2016; Otsuka et al., 2022) ainsi que ses propriétés macroscopiques et microscopiques moins avantageuses, comme mentionné aux deux derniers paragraphes, ont mené à la recherche d'alternatives plus sécuritaires et mieux adaptées pour diverses applications. En ce sens, les anatomistes ont développé de nouvelles solutions pour fixer les cadavres utilisés pour la dissection. Une solution idéale devrait être peu coûteuse, germicide, non toxique après une longue exposition des usagers, conserver les corps sur une longue période et maintenir la couleur, la texture et la flexibilité d'une grande variété

de tissus, tout en contenant peu (ou pas) de formaldéhyde (Balta et al., 2015; Brenner, 2014; Coleman & Kogan, 1998; Eltoum et al., 2001; Souchon, 1908). Afin de répondre à ces critères, les laboratoires d'anatomie humaine, tels que celui à l'UQTR, utilisent la solution saturée de sel (SSS) et la solution d'alcools (SA). Par conséquent, le présent projet consiste à comparer ces deux solutions avec la solution de fixation en usage courant par les banques de cerveaux, soit la solution de formaldéhyde 4% (SFA).

2.2.2 Solution saturée de sel (SSS)

Le chlorure de sodium est en usage depuis l'Égypte antique pour préserver des corps (Coleman & Kogan, 1998; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016; Martins-Costa et al., 2022). Pourtant, son utilisation pour des embaumements modernes est assez récente et moins courante. La formulation actuelle de la SSS est attribuée à Coleman et Kogan (1998), qui ont légèrement modifié la composition chimique de la solution proposée par Logan (1983). En effet, les auteurs ajoutent une grande quantité de sel de table à la solution faible en formaldéhyde de Logan, en plus de substituer l'alcool éthylique par de l'alcool isopropylique (Brenner, 2014; Coleman & Kogan, 1998; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016).

Par la suite, peu d'études sur la SSS et son utilisation en enseignement de l'anatomie humaine ont été réalisées. Une décennie s’est écoulée avant que la pertinence de la SSS soit étudiée de nouveau pour les simulations de procédures chirurgicales offertes pour la formation des médecins et autres professionnels de la santé (Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016). Cette solution est d’ailleurs en usage dans plusieurs laboratoires afin d'offrir des formations chirurgicales qui nécessitent une préservation de la flexibilité et de la couleur des tissus (Burns et al., 2018; Homma et al., 2019; Shirai et al., 2022; Watanabe et al., 2020). De plus, d'autres laboratoires mènent des études afin de déterminer l'exploitabilité de la SSS pour diverses applications, telles que la médecine vétérinaire (Lombardero et al., 2017), la préservation anatomique de cerveaux de rats (Martins-Costa et al., 2022) et l'histologie de cerveaux de souris (Frigon et al., 2022b) et de cerveaux humains (Frigon et al., 2024; Maranzano et al., 2020).

2.2.2.1 Mécanisme d'action

La SSS est composée d'une grande quantité de chlorure de sodium (Brenner, 2014; Coleman & Kogan, 1998; Hayashi et al., 2014), ainsi que d'alcool isopropylique, de phénol, de glycérol et d'un faible pourcentage de formaldéhyde (Coleman & Kogan, 1998). La formulation du laboratoire

d'anatomie de l'UQTR comporte également du Dettol, un produit antiseptique et désinfectant à base de chloroxylénol qui n'est ajouté qu'au moment de l'embaumement. Comme la SSS ne contient qu'une faible concentration de formaldéhyde dans sa formulation (0.8%), son mécanisme d'action principal n'est pas le même que pour la SFA. Bien qu'il y ait un pontage biochimique minoritaire engendré par la faible concentration en formaldéhyde, le mécanisme d'action principal de la SSS est la coagulation des protéines, dictée par sa concentration élevée en alcools (Brenner, 2014; Hobro & Smith, 2017; Rahman et al., 2021; Thavarajah et al., 2012). De ce fait, la SSS est considérée comme un fixateur coagulant de type déshydratant.

En solution aqueuse, les molécules ou parties de molécules non polaires ont tendance à s'agréger et à créer des liens hydrophobes (Sun, 2022). Cela veut dire que les chaînes latérales non polaires des acides aminés se cachent à l'intérieur des protéines et empêchent le contact avec l'eau dans leur environnement (Durell & Ben-Naim, 2017; Nick Pace et al., 2014). Lorsque les tissus biologiques sont exposés à la SSS, l'alcool isopropylique (16%) et le phénol (0.72%) agissent en remplaçant l'eau libre du tissu (Eltoum et al., 2001). Cela diminue l'effet repoussant de l'eau sur les molécules hydrophobes, ce qui affaiblit les liens hydrophobes qui les unissent. L'intérieur des protéines, qui est normalement compact et largement occupé par les molécules hydrophobes fortement liées (Nick Pace et al., 2014), prend alors de l'expansion (Eltoum et al., 2001). En parallèle à ces effets sur les parties hydrophobes des protéines du tissu, la déshydratation engendrée par les alcools de la SSS a également un effet sur les molécules hydrophiles. Les ponts hydrogène entre les parties hydrophiles de la protéine et l'eau environnante sont détruits (Eltoum et al., 2001). Ensemble, ces deux effets sur les parties hydrophobes et hydrophiles provoquent une déstabilisation et une dénaturation partielles de la structure tertiaire des protéines (Brenner, 2014; Hammer et al., 2012), médiées par le bris des liens biochimiques entre les acides aminés. Il se produit alors une inversion partielle de la structure de la protéine pour s'adapter à son nouvel environnement. Ainsi, lorsque l'alcool remplace l'eau d'un environnement, les parties hydrophobes des acides aminés sont tirées de l'intérieur vers l'extérieur de la protéine, afin d'être en contact avec l'environnement nouvellement anhydre (Boon & Kok, 2008; Eltoum et al., 2001). De façon plus globale, l'exposition à la SSS engendre donc la déshydratation des tissus et le remodelage des structures de leurs protéines, qui coagulent pour former un réseau architectural et morphologique solide et fixe (Eltoum et al., 2001).

Le formaldéhyde, l'alcool isopropylique et le phénol présents dans la SSS expliquent ses propriétés de fixation des tissus biologiques telles qu'elles ont été décrites précédemment. Outre ses agents préservatifs, la SSS possède également des agents désinfectants pour empêcher la croissance de microorganismes et la transmission d'infections. Le formaldéhyde, l'alcool isopropylique, le phénol et le Dettol remplissent tous cette fonction (Brenner, 2014; Tomalty et al., 2019). Le glycérol, bien qu'il n'ait pas de fonction désinfectante en soi, améliore l'efficacité de désinfection du formaldéhyde en prolongeant sa durée d'action (Bradbury & Hoshino, 1978; Brenner, 2014; Trujillo & Lindell, 1973). De plus, il agit comme un agent humectant, c'est-à-dire qu'il aide à contrôler l'humidité des tissus humains fixés par la SSS grâce à ses propriétés d'attraction et de rétention de l'eau (Crowther, 2021). Quant au chlorure de sodium, il agit en tant qu'agent hygroscopique pour attirer et absorber l'humidité des tissus (Brenner, 2014), ce qui aide au mécanisme de coagulation des protéines et au blocage des microorganismes (Lynnerup, 2007; Martins-Costa et al., 2022).

2.2.2.2 Avantages et inconvénients

La SSS produit une fixation souple, ce qui signifie que les cadavres fixés par la SSS ont des caractéristiques macroscopiques bien adaptées pour la dissection et les simulations réalistes de procédures chirurgicales (Hayashi et al., 2014). En effet, la couleur et la texture des tissus ainsi que la flexibilité des articulations sont mieux préservées chez les cadavres fixés avec cette solution que par la SFA (Brenner, 2014; Coleman & Kogan, 1998; Frigon et al., 2022b; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016; Lombardero et al., 2017; Martins-Costa et al., 2022). De plus, la faible concentration de formaldéhyde de cette solution, comparativement à la SFA, amoindrit les enjeux pour la santé des usagers qui découlent de sa toxicité (Brenner, 2014).

D'un point de vue logistique, la fixation avec la SSS est aussi avantageuse pour obtenir des cadavres complètement fixés en moins de temps que pour la SFA ou la SA. La période nécessaire pour atteindre cette fixation complète avec la SSS est de six semaines, alors que la SFA peut prendre jusqu'à six mois et la SA, huit mois (UQTR, 1993). Cela peut s'expliquer par la présence de trois agents de fixation dans la formulation de la SSS (formaldéhyde, alcool isopropylique et phénol), alors que la SFA n'en contient qu'un (formaldéhyde). En revanche, les corps fixés par la SSS sont moins durables dans le temps, car des signes d'oxydation et de détérioration sont observés à l'intérieur de deux ans (Balta et al., 2015; Frigon, 2025). Ces signes peuvent inclure entre autres du

tissu noirci par un processus d'oxydation ou le développement d'une odeur déplaisante par la putréfaction (Anderson, 2006; Balta et al., 2015; Messmer et al., 2010).

De plus, les études menées sur la SSS se limitent principalement à ses effets sur l'anatomie macroscopique (c.-à-d., flexibilité, couleur du tissu, etc.), alors que ses effets sur la qualité histologique du tissu cérébral (c.-à-d., morphologie cellulaire et antigénicité des populations cellulaires principales du cerveau) sont peu connus (Benet et al., 2014; Frigon et al., 2022b; Lyck et al., 2008). Récemment, deux études de notre groupe de recherche concernant les propriétés microscopiques de la SSS ont été réalisées. Les résultats ont démontré la conservation de l'antigénicité du tissu cérébral pour les quatre populations cellulaires principales du cerveau (neurones, astrocytes, microglies et myéline d'oligodendrocytes) chez les souris (Frigon et al., 2022b) et les humains (Frigon et al., 2024). En revanche, bien que l'antigénicité du tissu humain fixé par la SSS était conservée, la qualité histologique était généralement inférieure à celle observée chez les cerveaux fixés avec la SFA et la SA (Frigon et al., 2024). Le tissu fixé avec la SSS était plus difficile à manipuler que celui fixé par la SFA et la SA. Le tissu avait également un neuropile fissuré avec des contours cellulaires irréguliers. De plus, la distribution des cellules marquées n'était pas homogène dans la coupe. Cependant, l'application d'un procédé de récupération des antigènes a permis de retrouver une distribution homogène des antigènes testés (Frigon et al., 2024). Ces deux études antérieures ont permis de clarifier les caractéristiques qualitatives du tissu fixé par la SSS, mais n'ont pas abordé les propriétés quantitatives comme le fait le présent mémoire.

2.2.3 Solution d'alcools (SA)

L'utilisation de l'alcool dans les procédés de préservation des corps peut être retracée jusqu'à l'Égypte antique (Udoaka et al., 2009). Son usage était même fréquent par les forces navales britanniques (Ezugworie et al., 2008), qui entreposaient leurs défunts dans des barils de vieux spiritueux lors des longs trajets en mer (MacIntyre, 2018). Plus précisément, l'éthanol, ou alcool éthylique, est un composant chimique qui a été utilisé par les anatomistes dans plusieurs formulations de solutions de fixation au fil des siècles (Benet et al., 2014; Boon & Kok, 2008; Brenner, 2014; Cabrera et al., 2017; Hammer et al., 2012; Martins-Costa et al., 2022; O'Sullivan & Mitchell, 1993). Par exemple, la collection de pièces anatomiques de Gerard Vrolik (1775-1859) et son fils Willem (1801-1863) à Amsterdam (de Rooy, 2023) comprend plusieurs spécimens qui ont été adéquatement préservés dans l'éthanol pendant plus de 200 ans (Boon & Kok, 2008). En

revanche, il a été observé qu'une fixation de plus de 24 heures dans de l'éthanol à 70% rendait les pièces trop rigides (Boon & Kok, 2008). Pour cette raison, les effets négatifs de l'éthanol sur la rigidité et la distorsion du tissu sont souvent équilibrés par l'ajout de divers produits chimiques qui vont limiter ces effets (Cabrera et al., 2017; Perry et al., 2016).

En ce sens, la SA est une solution d'alcools contenant une grande concentration en éthanol et une faible concentration en formaldéhyde, qui a été optimisée par l'ajout d'autres produits chimiques pour offrir des conditions de dissection plus appropriées. Sa composition chimique varie grandement selon les laboratoires (Barton et al., 2009; Benet et al., 2014; Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Hammer et al., 2012). Dans le cadre du présent projet, la SA utilisée est celle qui est en usage dans le laboratoire d'anatomie de l'UQTR (voir Tableau 1). Sa formulation chimique s'approche de celle décrite par Benet et al. (2014), une variante de la SA qui a été créée afin d'optimiser les caractéristiques du tissu nerveux pour des simulations neurochirurgicales réalistes et sécuritaires.

2.2.3.1 Mécanisme d'action

La SA est une solution composée d'éthanol, de glycérol, de phénol, de Dettol, d'une faible quantité de formaldéhyde et d'acétate de sodium. Bien que la composition diffère d'un laboratoire à l'autre, l'éthanol en reste toujours l'ingrédient principal. Cependant, la fixation engendrée peut être plus dure (comme la SFA) ou plus souple (comme la SSS), tout dépendant de la concentration finale de formaldéhyde qui est utilisée. Ainsi, le type de la fixation qui est engendrée dépend des spécificités de la formulation utilisée. Dans le cas de la SA de l'UQTR, la concentration en formaldéhyde est légèrement supérieure à 1% (1.4%), ce qui en fait une solution à fixation théoriquement "dure".

La grande quantité d'éthanol dans la formulation chimique de la SA agit en tant que fixateur déshydratant et précipitant (Boon & Kok, 2008; Brenner, 2014; Eltoum et al., 2001; Hobro & Smith, 2017; Moelans et al., 2011; Thavarajah et al., 2012; Troiano et al., 2009; Vielkind & Swierenga, 1989). La SA agit donc principalement via un mécanisme de coagulation des protéines, tel que décrit pour la SSS. Les étapes précises de la coagulation des protéines ont été présentées à la section 2.2.2.1. Brièvement, l'éthanol est un solvant alcoolique qui remplace l'eau libre dans les tissus et déstabilise la conformation des protéines (Cabrera et al., 2017). Ainsi, l'éthanol et le phénol de la SA s'attaquent à la couche hydratée des structures tertiaires des protéines, ce qui détruit les liens hydrophobes et hydrophiles et cause la précipitation des protéines en un réseau aggloméré et

rigide (Boon & Kok, 2008; Brenner, 2014; Hammer et al., 2012). Cet effet de dénaturation des protéines causé par le remplacement de l'eau par l'alcool peut être plus ou moins exacerbé selon plusieurs facteurs : le type d'alcool utilisé et sa concentration, la présence de substances organiques et inorganiques, le pH et la température de la solution (Eltoum et al., 2001). Comme la formulation de la SA peut changer d'un laboratoire à l'autre (Barton et al., 2009; Benet et al., 2014; Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Hammer et al., 2012), les effets du mécanisme de coagulation des protéines peuvent être plus ou moins intenses. Il est donc important de noter que les effets microscopiques de ce type de mécanisme d'action sur l'antigénicité du tissu ne sont pas généralisables à toutes les formulations de la SA.

L'éthanol, le formaldéhyde et le phénol assurent la fixation des tissus par la SA, en plus de posséder des propriétés désinfectantes qui bloquent la croissance des microorganismes (Brenner, 2014). En plus de l'action de ces produits, le Dettol et l'acétate de sodium ont également un rôle à jouer en tant qu'agents désinfectants de la SA. L'acétate de sodium, qui est un sel de sodium de l'acide acétique, a un effet déshydratant similaire à celui déjà décrit pour le chlorure de sodium. Le glycérol occupe aussi le même rôle que dans la SSS.

2.2.3.2 Avantages et inconvénients

Les agents fixateurs qui composent la SA (éthanol, phénol et formaldéhyde) lui confèrent une grande durabilité. Les corps fixés par cette solution peuvent ainsi être conservés pendant des dizaines d'années à la suite de huit mois de fixation (Gérin-Lajoie et al., 2026; UQTR, 1993). Sa concentration moindre en formaldéhyde lui confère des avantages par rapport à la SFA. La couleur et la texture des tissus du corps sont adéquates pour l'enseignement ou la dissection (Benet et al., 2014) et les risques pour la santé des utilisateurs sont réduits (Benet et al., 2014; Gérin-Lajoie et al., 2026). En revanche, l'éthanol a un effet déshydratant important qui pourrait causer la diminution du volume de certains organes, tels que le cerveau (Boon & Kok, 2008). Cet effet peut être plus ou moins compensé par la présence du glycérol (agent humectant) (Brenner, 2014), dont la concentration peut varier d'un laboratoire à l'autre.

D'un point de vue microscopique, le tissu fixé par la SA peut être affecté différemment selon sa formulation chimique exacte. Il peut ainsi être difficile de généraliser à partir d’études de différentes provenances. Concernant la SA utilisée pour fixer les cerveaux de souris dans ce projet (Benet et al., 2014), ses effets histologiques qualitatifs ont été étudiés précédemment par notre

groupe de recherche (Frigon et al., 2022b). Les résultats de l'étude ont mis en lumière que l'antigénicité des quatre populations cellulaires principales du cerveau était bel et bien préservée dans les cerveaux de souris fixés avec la SA. La pénétration des antigènes testés était même meilleure dans les coupes de tissu fixées avec la SA que pour celles fixées avec la SFA et la SSS. En revanche, la qualité de perfusion était moins bonne chez les souris fixées avec la SA. La grande concentration de glycérol dans sa composition (17%) entraîne une plus grande densité et viscosité de la solution, ce qui cause la déchirure du septum interventriculaire du cœur, qui est fragile chez la souris. Ceci n'affectait cependant pas la facilité de manipulation des coupes histologiques, qui a été évaluée comme étant supérieure à la SSS, bien que pas aussi bonne que la SFA. Finalement, les résultats de cette étude ont démontré que les cerveaux de souris fixés par la SA n'avaient pas les corps neuronaux irréguliers observés pour la SSS, mais que la fréquence d'un neuropile fissuré y était plus grande que dans les deux autres solutions (Frigon et al., 2022b). Aucune variable quantitative n'a été évaluée par cette étude, d'où l'apport spécifique du projet présenté ici.

Concernant la SA utilisée pour fixer les cerveaux humains dans le présent projet, une deuxième étude de notre groupe de recherche a permis d'étudier les effets histologiques qualitatifs de la SA de l'UQTR (Frigon et al., 2024). Les résultats ont à nouveau montré que les coupes histologiques fixées avec la SA étaient aisément manipulées. Cependant, l'intégrité du neuropile était compromise par une multitude de fissures dans le tissu. Les contours cellulaires des cerveaux fixés par la SA étaient également irréguliers, ce qui avait été observé pour les cerveaux fixés par la SSS, mais pas pour la SFA. Malgré cela, l'antigénicité était généralement mieux conservée dans les cerveaux fixés par la SA (Frigon et al., 2024). Dans le même ordre d'idées, il a été avancé par une autre étude que les résultats obtenus à la suite de protocoles d'histologie sur des cerveaux fixés par la SA seraient suffisamment semblables à ceux de la SFA pour analyser les images de la même façon (Boon & Kok, 2008). Finalement, ce sont des résultats prometteurs pour l'utilisation des cerveaux fixés par la SA dans des protocoles immunohistologiques. En revanche, des données quantitatives telles qu'amassées dans le présent mémoire permettront d'appuyer l'exploitabilité des cerveaux fixés avec les solutions des laboratoires d'anatomie.

Fixateur	Avantages	Inconvénients
SFA	- Peu coûteuse et aisément accessible - Excellentes propriétés désinfectantes - Excellentes propriétés de fixation - Bonne qualité histologique (après traitement de récupération des antigènes chez l'humain)	- Toxique - Cadavres rigides (fixation dure) - Couleur et texture des tissus altérées - Fixation complète des cadavres plus longue (environ six mois) - Pontage biochimique nuisible à l'immunoréactivité du tissu
SSS	- Faible concentration en formaldéhyde (moins toxique) - Bien adaptée pour la dissection - Cadavres flexibles (fixation souple) - Couleur et texture des tissus plus proches d'un corps frais - Fixation complète des cadavres plus rapide (environ six semaines)	- Cadavres moins durables (utilisation limitée à deux ans) - Qualité histologique inférieure (antigénicité plus ou moins conservée chez l'humain, neuropile fissuré et contours cellulaires irréguliers)
SA	- Faible concentration en formaldéhyde (moins toxique) - Bien adaptée pour la dissection - Couleur et texture des tissus plus proches d'un corps frais - Cadavres très durables (utilisation pendant plusieurs années) - Bonne qualité histologique (antigénicité conservée)	- Grande concentration en éthanol (effet déshydratant) - Fixation complète des cadavres plus longue (environ huit mois)

Tableau 2. – **Comparaison des avantages et inconvénients pour les trois solutions de fixation utilisées**. SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools

3. Administration du fixateur

Il existe deux voies d'administration pour la fixation chimique : par l'immersion et par la perfusion vasculaire. L'immersion est la méthode la plus employée par les banques de cerveaux (McKenzie et al., 2022), alors que la perfusion est davantage utilisée pour les études sur les animaux (Kasukurthi et al., 2009; McKenzie et al., 2022) et dans les laboratoires d'enseignement de l'anatomie humaine (Maranzano et al., 2020).

3.1 Immersion

La fixation par immersion consiste à extraire et déposer le cerveau frais dans la solution de fixation désirée (McFadden et al., 2019). La solution peut ainsi diffuser de l'extérieur vers l'intérieur du cerveau de sorte à fixer le tissu sur une longue période. Le rapport standard entre le volume du tissu à préserver et le volume nécessaire de la solution de fixation est de 1:10 (Benet et al., 2014; Cabrera et al., 2017). Ainsi, un hémisphère de cerveau humain est généralement mis en immersion dans quatre à six litres de solution (Dadar et al., 2024; Frigon et al., 2024).

3.1.1 Avantages et inconvénients

La méthode d'immersion est grandement utilisée parce qu'elle ne nécessite pas de matériel ou d'un montage spécialisé ou coûteux (Beach et al., 1987). Cependant, cette méthode crée un gradient hétérogène de la qualité de la fixation, car les couches superficielles exposées à la solution deviennent surfixées ("overfixed") alors que les couches profondes peuvent se décomposer avant qu'elles ne soient atteintes par le fixateur (Adickes et al., 1997; Beach et al., 1987; Brenner, 2014; Dawe et al., 2009; Gage et al., 2012; Hade et al., 2024; Howat & Wilson, 2014; McFadden et al., 2019; McKenzie et al., 2022; Nicholson et al., 2005). Ceci peut être causé par une diffusion plus lente du fixateur à travers la profondeur de l'organe par rapport au tissu de surface ou par une pénétration hétérogène du fixateur dans les différents types de tissus et de structures du cerveau (Adickes et al., 1997; Maranzano et al., 2020). Bien que l'immunohistochimie des cerveaux fixés par immersion puisse donner des résultats de qualité satisfaisante, les résultats peuvent être grandement affectés par la qualité de la fixation du tissu (Insausti et al., 2023). En effet, l'intensité du marquage immunohistochimique de certains antigènes est variable dans les cas de sous- ou surfixation du tissu (Beach et al., 1987). Ces cas sont fréquents dans les tissus profonds des cerveaux fixés par immersion à cause de leur gradient de fixation hétérogène. Les propriétés de plusieurs colorations histochimiques de routine sont également variables entre les couches superficielles et profondes du cerveau fixé par immersion (Beach et al., 1987; Fox et al., 1985). De plus, la méthode par immersion peut engendrer plusieurs déformations structurelles corticales et sous-corticales, entre autres par la manipulation du cerveau frais lors de l'extraction et par le changement de forme du cerveau associé avec l'effet de la gravité lors du stockage dans le contenant rempli de fixateur (Insausti et al., 2023; Maranzano et al., 2020).

3.1.2 Étendue d'utilisation

Chez les animaux, l'immersion est moins souvent utilisée en neuroscience, sauf pour la post-fixation (de Guzman et al., 2016). En effet, la méthode favorisée est plutôt celle de la perfusion transcardiaque (Kasukurthi et al., 2009), car elle offre du tissu fixé de qualité supérieure (Beach et al., 1987).

Chez les humains, c'est la méthode la plus utilisée par les banques de cerveaux (McKenzie et al., 2022), qui suivent un protocole standard de sagittalisation des cerveaux pour congeler le premier hémisphère et fixer par immersion le deuxième (Hade et al., 2024; Hulette, 2003; Shepherd et al., 2019; Waldvogel et al., 2008). En revanche, c'est une méthode moins utilisée par les laboratoires d'enseignement en anatomie humaine, qui ont généralement besoin de fixer tout le corps par perfusion pour l'enseignement et la dissection. Toutefois, les laboratoires d'anatomie peuvent parfois fixer le corps avec une solution idéale pour la dissection, mais qui ne préserve pas adéquatement le tissu du cerveau. Dans ces cas, il est possible de procéder à l'extraction du cerveau frais pour le fixer par immersion avec une autre solution (UQTR, 1993).

3.2 Perfusion

La fixation par perfusion consiste à injecter la solution de fixation dans le système artériel pour assurer une plus grande surface de contact avec le tissu et une distribution homogène du fixateur (Hade et al., 2024; Insausti et al., 2023; McKenzie et al., 2022). Cette injection peut se faire de façon *in situ*, c'est-à-dire que le cerveau reste à l'intérieur de la boîte crânienne, ou *ex situ*, c'est-à-dire que l'extraction du cerveau doit se faire au préalable en prenant soin de ne pas endommager les artères qui serviront à l’injection (Hade et al., 2024; Maranzano et al., 2020; McFadden et al., 2019; McKenzie et al., 2022).

3.2.1 Perfusion *in situ*

Pour la perfusion *in situ* chez les animaux, par exemple chez la souris, le fixateur est injecté de façon intrathoracique. Ce procédé est plus communément appelé la perfusion transcardiaque et constitue la méthode privilégiée pour les études sur le tissu nerveux, comme mentionné précédemment (Kasukurthi et al., 2009). Brièvement, la méthode consiste à faire l'ouverture thoracique de l'animal anesthésié, puis à insérer une canule dans le ventricule gauche et l’aorte pour y injecter le fixateur (Gage et al., 2012; Kasukurthi et al., 2009; Paul et al., 2008). Avant de

commencer l'injection du fixateur, il est possible d'expulser et de rincer le sang des animaux avec une solution tampon ou d'injecter un anticoagulant (héparine). Cependant, la perfusion transcardiaque nécessite une grande quantité de fixateur et prend davantage de temps que l'immersion chez les petits animaux (Eichenbaum et al., 2005; Kasukurthi et al., 2009). Comme ces derniers ont le cerveau beaucoup plus petit que l'humain, la diffusion du fixateur lors de l'immersion se fait beaucoup plus rapidement. De plus, il a été rapporté que l'arrêt du cœur et de la circulation sanguine lors de la perfusion mène à une perte rapide du volume d'espace extracellulaire du tissu (Korogod et al., 2015). Néanmoins, c'est aussi le procédé qui fournit aux chercheurs du tissu de qualité supérieure (Beach et al., 1987), d'où la raison pour laquelle c'est la méthode privilégiée pour la recherche sur les animaux.

Pour la perfusion *in situ* chez les humains, il est courant d'injecter le fixateur dans l'artère fémorale (Coleman & Kogan, 1998) ou l'artère carotide commune (Insausti et al., 2023; Maranzano et al., 2020; McKenzie et al., 2022). Cela requiert un accès chirurgical aux régions inguinale ou cervicale. Cette méthode est particulièrement utile pour les laboratoires d'anatomie, car elle permet de fixer adéquatement le cerveau tout en préservant le corps pour l'enseignement (Hade et al., 2024). Étant donné que la fixation est censée rendre le cerveau plus rigide et moins friable, la résistance observée lors du toucher est un bon indicateur pour évaluer le taux de progression de la fixation (McFadden et al., 2019). Cependant, cet état de progression est plus difficile à évaluer dans les cerveaux fixés *in situ*, puisqu'on n'a pas accès au tissu du cerveau (McFadden et al., 2019). Dans ces cas, nos propres observations ont montré que la texture ferme des yeux est un bon indice pour évaluer l'état de la fixation du cerveau.

3.2.2 Perfusion *ex situ*

Chez les humains, la perfusion *ex situ* peut remplacer la perfusion *in situ*. Elle peut être utile, par exemple, dans les cas où seul le cerveau est disponible (Beach et al., 2015; McKenzie et al., 2022). Dans ce cas, le fixateur est injecté à la fois dans les artères carotides internes et les artères vertébrales (McKenzie et al., 2022; Waldvogel et al., 2008). Cela permet la circulation à travers toute la vascularisation des territoires antérieur et postérieur du cercle de Willis. Comme pour la fixation par immersion, cette méthode requiert la manipulation du cerveau frais, ce qui peut engendrer des déformations mécaniques du tissu et des artères lors de l'extraction (McFadden et al., 2019). Elle est également associée avec la présence de bulles d'air dans les sillons, les

ventricules et le sang, ce qui peut nuire à la distribution du fixateur dans le circuit de perfusion (McKenzie et al., 2022).

3.2.3 Avantages et inconvénients

Le temps total de distribution de la solution à travers le tissu pour la méthode par perfusion est moins long et plus uniforme que celui de la méthode par immersion (Hade et al., 2024; McKenzie et al., 2022), ce qui entraîne une meilleure préservation de la structure tissulaire (Hade et al., 2024). Ainsi, le tissu fixé par perfusion donne des résultats histologiques équivalents ou supérieurs à ceux obtenus avec le tissu fixé par immersion (Hade et al., 2024; McFadden et al., 2019). De plus, la fixation par perfusion est considérée comme supérieure à l'immersion pour évaluer le cerveau et les lésions du système nerveux central avec la microscopie optique (Garman, 1990). Malgré cela, ce ne sont pas tous les laboratoires qui peuvent se permettre les installations nécessaires et le personnel spécialisé pour appliquer la méthode de perfusion, car les systèmes sont généralement coûteux et complexes (Beach et al., 1987; Hade et al., 2024; Insausti et al., 2023; McFadden et al., 2019). Le contrôle de la pression dans le circuit de perfusion est également un obstacle important, car une pression trop basse produit une fixation incomplète du tissu et une pression trop élevée pourrait causer le bris des vaisseaux sanguins (McKenzie et al., 2022; Schwarzmaier et al., 2022). De plus, la qualité de la perfusion dépend de l'intégrité du circuit vasculaire du cerveau. Plusieurs variables confondantes affectent l'état post-mortem de la vascularisation et limitent l'efficacité de la perfusion en dégradant l'état des vaisseaux sanguins ou en augmentant la formation de caillots sanguins post-mortem (McFadden et al., 2019). Ces variables peuvent inclure : 1) la présence de comorbidités s'attaquant à l'intégrité des parois vasculaires ou à la coagulation sanguine (p. ex., contrainte de cisaillement, infection bactérienne, pH, etc.) (Klaubert et al., 1988), 2) l'intervalle post-mortem (Insausti et al., 2023; McKenzie et al., 2022) et 3) les caractéristiques démographiques (p. ex., l'âge et le sexe peuvent affecter l'élasticité et la calcification) (Hyodoh et al., 2012) ainsi que 4) l'historique médical du donneur (p. ex., comorbidités, pathologies vasculaires, médicaments, etc.). Il a également été démontré que la qualité de fixation par perfusion pouvait différer d'une région à l'autre du cerveau selon la complexité de la vascularisation. Par exemple, un lit capillaire complexe comme celui du plexus choroïde entraîne une qualité inférieure de fixation après une perfusion (Rodríguez, 1969). Cette qualité peut aussi être affectée par la perméabilité des parois vasculaires (Lamberts & Goldsmith, 1986).

3.2.4 Étendue d'utilisation

La perfusion est grandement utilisée en recherche animale (Kasukurthi et al., 2009; McFadden et al., 2019) ainsi que dans les laboratoires d'anatomie humaine en milieu universitaire. Ces derniers perfusent le corps au complet afin de le préserver adéquatement pour l'enseignement, la dissection, la pratique de techniques chirurgicales et accessoirement pour la recherche (Benninger et al., 2014; Feigl & Sammer, 2022; Mohebimoushaei et al., 2025). Même si l'immersion est la méthode privilégiée des banques de cerveaux (McFadden et al., 2019; McKenzie et al., 2022), certaines banques utilisent la perfusion *ex situ* pour fixer un hémisphère ou le cerveau complet, puis les couper en blocs. Par exemple, c'est le cas de la banque de cerveaux de la Nouvelle-Zélande (Waldvogel et al., 2008).

Chapitre 2 – Méthodologie

1. Modèles d'étude

1.1 Souris

Plusieurs aspects de la recherche neuroscientifique dépendent de l'utilisation de modèles animaux de maladies humaines. Ces études permettent de comprendre le fonctionnement du cerveau normal et pathologique, ainsi que de tester divers traitements (Beauchamp et al., 2022). Pour ce faire, les souris sont un modèle animal largement utilisé, que ce soit *in vivo* dans le cadre d'études éthologiques ou physiologiques, ou *ex vivo* dans le cadre d'études histologiques du cerveau. Les souris sont faciles à reproduire, se développent rapidement et permettent des modifications génétiques qui constituent des modèles de maladies humaines (Beauchamp et al., 2022; Engber, 2011). Malgré les différences entre leur cerveau et celui de l'humain, les découvertes faites chez la souris permettent tout de même de mieux comprendre le système nerveux humain (Beauchamp et al., 2022; Potts et al., 2020). De plus, les souris permettent la réalisation d'expérimentations invasives qui ne sont pas possibles chez l'humain. Elles permettent également de réaliser certains protocoles (p. ex., l'histologie) dans des conditions optimales, sans toutes les variables confondantes associées au tissu humain (Frigon et al., 2022b). Dans le cadre du présent projet, nous étudierons l'effet des trois solutions de fixation sur le tissu nerveux de la souris. Cela nous permettra d'évaluer leurs propriétés indépendamment des variables confondantes (décrites à la section 1.2), qui sont inévitables lors de l'utilisation du tissu humain.

Les souris de la souche C57BL/6J utilisées ici sont d'usage courant en recherche (Newton et al., 2025). Ce sont des souris consanguines avec des capacités reproductives favorables et une grande quantité de lignes mutantes disponibles pour la recherche (Engber, 2011). Leur pelage noir est avantageux, car il permet de détecter facilement le succès d'une mutation génétique avec une autre lignée de souris (Engber, 2011; Newton et al., 2025). En effet, la présence de chimères (souris avec le pelage de deux couleurs) dans leur portée indique que les cellules embryonnaires modifiées y ont été incluses.

Toutes les données relatives aux spécimens murins seront rapportées à la *Table 1* (chapitre 3).

1.2 Humain

Les études sur le tissu nerveux humain sont depuis longtemps utilisées pour en apprendre davantage sur le système nerveux (Balta et al., 2015; Balta et al., 2022). Pourtant, ce n'est pas idéal pour plusieurs raisons. Toutes les variables confondantes associées avec l'utilisation de cerveaux humains ne peuvent pas être contrôlées. Ces variables incluent généralement l'âge avancé des donneurs, le dossier médical souvent incomplet, les traitements pharmacologiques suivis, l'intervalle post-mortem et la présence de pathologies vasculaires (Alkemade et al., 2023; Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024). Il est à noter que certaines banques de cerveaux sont capables d'obtenir des donneurs plus jeunes, par exemple dans le cas de suicides (Douglas-Bell Canada Brain Bank, 2026). Ce n'est souvent pas le cas dans les laboratoires d'anatomie, qui obtiennent des cerveaux de donneurs souvent avancés en âge. Par conséquent, les échantillons de convenance accessibles aux chercheurs par l'intermédiaire des laboratoires d'anatomie humaine ne sont pas représentatifs de la population entière, mais d'une population âgée (Andrade, 2021).

Toutefois, il est possible d'imposer des critères d'inclusion ou d'exclusion afin de limiter les biais imputables à certaines de ces variables confondantes. D'un côté, il est possible de rassembler des échantillons provenant de cas avec des caractéristiques plus contrôlées. Il existe des biobanques spécialisées en une maladie ou condition spécifique. Par exemple, la Douglas-Bell Canada Brain Bank fournit des cerveaux atteints de diverses neuropathologies ou neuropsychopathologies (Douglas-Bell Canada Brain Bank, 2026). D'un autre côté, il existe aussi des cohortes de personnes âgées suivies pendant la vie, par exemple le Brain and Body Donation Program mis en place par Banner Health (Brain and Body Donation Program, 2026). Ce genre de programme permet le recrutement de volontaires qui s'engagent à des examens cliniques avant le décès et au don de leur corps ou de leur cerveau après leur décès. Ceci permet l'accès au dossier médical complet et à des données ante-mortem des patients suivis, ce qui est un atout indéniable en recherche *ex vivo*. Cela permet de connaître les pathologies diagnostiquées et les traitements pharmacologiques suivis. Cependant, ce genre de cohorte nécessite une organisation complexe et coûteuse qui n'est pas accessible pour les petits laboratoires souhaitant travailler avec du tissu *ex vivo*.

De plus, les résultats obtenus sur du tissu humain *ex vivo* sont toujours influencés, dans une mesure plus ou moins grande, par le délai qui s'écoule entre le décès et la fixation des tissus. Ce n'est pas le cas pour les résultats obtenus sur les souris, dont le cerveau est fixé au moment où elles sont

sacrifiées pour l'expérience. Aussi, les résultats sur les cerveaux humains peuvent être influencés par les traitements qu'ils subissent, dont la fixation chimique et les traitements histologiques du spécimen, et sont généralement de qualité plus variable que chez les souris. En effet, contrairement aux études sur les humains, les variables confondantes dans les études sur les animaux peuvent être majoritairement contrôlées, permettant ainsi l'obtention d'une qualité histologique optimale (Waldvogel et al., 2006). Cependant, la méthode *ex vivo* reste la méthodologie privilégiée en recherche, car il est très rare d'avoir accès à du tissu provenant de biopsies du cerveau *in vivo* pour la recherche (Frigon et al., 2024). En effet, ce sont des procédures invasives et risquées pouvant mener à des complications sérieuses, comme des catastrophes anesthésiques, des hémorragies, des infections, des convulsions et même la mort (Warren et al., 2005).

Les informations concernant les spécimens utilisés pour ce projet seront rapportées au Tableau 3 (chapitre 4).

2. Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est une technique servant à détecter des antigènes d'intérêt d'un tissu à l'aide d'anticorps spécifiques (Potts et al., 2020; Ramos-Vara, 2005; Schacht & Kern, 2015; Smart et al., 2023; Waldvogel et al., 2006). C'est une technique fiable (Hussaini et al., 2023; Ozawa, 2019) et utilisée comme outil de diagnostic en médecine vétérinaire (Ramos-Vara, 2005), en pathologie humaine (Bellizzi, 2020; Cecchini et al., 2019; Liu et al., 2013; Rangan et al., 2022; Tan et al., 2020) et animale (Ward & Rehg, 2014) ainsi qu'en recherche (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Frigon et al., 2026; Potts et al., 2020).

Il existe plusieurs types de protocoles d'IHC, qui diffèrent selon le type de coupe, l'application ou non d'un protocole de récupération des antigènes, le type de protocole, le système de détection immunologique ainsi que les anticorps choisis. Chacun de ces aspects et les raisons expliquant leurs choix dans le présent mémoire seront développés dans les prochaines sections.

2.1 Types de coupe

Les blocs de tissu peuvent être coupés de trois façons principales : 1) avec un vibratome, 2) avec un microtome à la suite de leur infiltration de paraffine, ou 3) avec un cryostat. La coupe avec un vibratome est la méthode privilégiée pour le tissu frais (Mattei et al., 2015). La coupe de blocs de

tissu infiltrés de paraffine est largement employée en histopathologie (Frigon et al., 2022b), que ce soit en contexte clinique ou de recherche (Sadeghipour & Babaheidarian, 2019). La coupe au cryostat est quant à elle grandement utilisée en recherche (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Paletzki & Gerfen, 2019). Considérant les objectifs du projet ainsi que les avantages et inconvénients de chacune des trois méthodes, nous avons choisi de couper les blocs au cryostat.

Premièrement, il n'existe pas de consensus pour un protocole standard avec les coupes au vibratome. Les paramètres de coupe vont dépendre du type de tissu avec lequel on travaille et de l'utilisation que l'on veut en faire (Mattei et al., 2015; Zimmermann et al., 2009). L'épaisseur des coupes est aussi inconstante d'une coupe à l'autre en fonction de la forme et de la texture des tissus. Or, le présent projet comporte du tissu de souris et du tissu humain, ainsi que du tissu fixé par trois solutions de fixation différentes. Cela impliquerait une différence au niveau de leur comportement lors de la coupe au vibratome et donc, un ajustement des paramètres en conséquence. Par exemple, le tissu fixé avec la SSS est plus mou que celui fixé par les deux autres solutions (Frigon et al., 2024). Comme le tissu n'est ni paraffiné ni congelé pendant la coupe au vibratome, la texture du tissu pourrait avoir un impact sur la reproductibilité de l'épaisseur des coupes produites. Il pourrait également y avoir plus de déchirures et de tissu perdu. Ce n'est pas idéal dans ce cas-ci, car le tissu doit être traité de façon uniforme dans les trois solutions de fixation. De plus, le vibratome est mieux adapté à produire des coupes plus épaisses, alors que ce projet requiert des coupes d'une épaisseur de 40 à 50 microns. Selon l'expérience de notre groupe, bien que ce soit faisable avec un vibratome, les coupes de cette épaisseur sont généralement plus inégales et déchirées que celles coupées au microtome et au cryostat.

Deuxièmement, la coupe des blocs à l'aide d'un microtome à paraffine est une option qui a été envisagée pour ce projet. L'enrobage en paraffine permet une longue durée de conservation des blocs de tissu à température ambiante et permet de couper à une épaisseur de quatre à dix microns (Sadeghipour & Babaheidarian, 2019). Toutefois, la préparation de l'enrobage en paraffine peut être longue, en particulier pour des blocs de grande taille, en plus d'être complexe et peu pratique sans des équipements automatisés (Gray, 1958; Ino, 2003). De plus, cette méthode implique des procédures supplémentaires pour enrober les blocs en paraffine avant leur coupe, ainsi que pour déparaffiner et réhydrater les coupes produites avant l'application des procédures immunohistochimiques. Cela impose des altérations supplémentaires au tissu, par l'exposition des

coupes à la chaleur et à des solvants organiques (Yamashita & Okada, 2005). Les coupes sont également exposées à l'alcool lors des bains successifs de déshydratation et de réhydratation qui sont associés avec l'enrobage en paraffine. Ces procédures peuvent endommager le tissu et les antigènes ciblés. Comme le but de ce projet est de comparer les effets de diverses solutions de fixation sur les neurones, il est préférable de ne pas choisir des méthodes qui affectent davantage l'intégrité du tissu, même si cet effet s'appliquait aux trois fixateurs.

Finalement, la coupe au cryostat a été choisie parce qu'elle permet un traitement uniforme de tous les tissus, que ce soit du tissu murin ou humain, ou du tissu fixé par différentes solutions. Elle permet aussi d'éviter les altérations supplémentaires du tissu reliées avec l'infiltration de la paraffine. Les blocs de tissu sont plutôt mis en immersion dans une solution de sucrose jusqu'à ce que la pénétration du sucrose dans le bloc soit complétée. Cela assure leur cryoprotection lorsque les blocs sont mis au congélateur à -80°C avant leur coupe au cryostat (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024). Les coupes produites sont normalement d'une épaisseur de 40-50 microns et plus, ce qui n'est pas aussi mince que l'épaisseur atteinte avec la paraffine. En revanche, de nombreux tests de notre laboratoire ont montré une bonne pénétration des anticorps avec des coupes d'une épaisseur de 40 microns (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024). Ainsi, la coupe au cryostat est la plus appropriée pour répondre aux objectifs de ce mémoire.

2.2 Technique de récupération des antigènes

La récupération des antigènes ("antigen retrieval") est un procédé servant à modifier les effets de la fixation sur la structure tertiaire des protéines, de manière à exposer les épitopes et à faciliter leur détection par IHC (Gown, 2004; Grigorev & Korzhevskii, 2018; Schacht & Kern, 2015). Comme il a été mentionné dans le chapitre 1, la fixation altère grandement la structure tridimensionnelle des protéines (Evers et al., 1998; Grigorev & Korzhevskii, 2018). Les techniques de récupération des antigènes peuvent alors être utilisées pour renverser ces modifications structurelles (Boon & Kok, 2008; Waldvogel et al., 2006). Ces techniques dénaturent les protéines avec des enzymes ou par la chaleur afin de briser les structures tertiaires et quaternaires induites par la fixation et ainsi exposer les épitopes des antigènes d'intérêt (Shi et al., 2001; Yamashita & Okada, 2005).

Il existe deux techniques principales de récupération des antigènes : l'usage de protéases ("protease-induced epitope retrieval") ou de la chaleur ("heat-induced epitope retrieval"). Ces techniques seront brièvement abordées dans les deux prochains paragraphes.

L'usage de protéases (Im et al., 2019; Ramos-Vara, 2005) permet la digestion partielle des protéines et brise les liens chimiques soutenant les structures tridimensionnelles. Cependant, cette digestion est non spécifique et peut causer des dommages qui nuisent à la détection de certains antigènes (Ramos-Vara, 2005). D'ailleurs, il a été démontré que cette méthode enzymatique n'améliorait pas la détection de plusieurs antigènes (Shi et al., 2001). Ainsi, ce n'est pas la technique idéale à employer pour le type de projet du présent mémoire, car elle pourrait causer une baisse de l'immunoréactivité du tissu.

La méthode de récupération des épitopes par la chaleur a été privilégiée dans la présente étude (Ino, 2003; Ramos-Vara, 2005; Schacht & Kern, 2015; Shi et al., 1991; Yamashita & Okada, 2005). Les tissus sont chauffés pour dénaturer les protéines par l'hydrolyse des ponts biochimiques (Boon & Kok, 2008; Im et al., 2019; Shi et al., 2001). Cette méthode est moins coûteuse que la méthode enzymatique. Elle ne nécessite que deux éléments, soit 1) une source de chaleur (four traditionnel, four à micro-ondes, plaque chauffante, autoclave, autocuiseur, bain d'eau, etc.) (Evers et al., 1998; Gown, 2004; Ino, 2003) et 2) les produits d'une solution tamponnée (tampon citrate, solution saline tamponnée au Tris, etc.). Cependant, ces protocoles sont généralement conçus pour des coupes enrobées de paraffine, alors que les coupes congelées sont plus susceptibles d'être abîmées durant le chauffage (Ino, 2003; Yamashita & Okada, 2005). Néanmoins, il a été démontré que des coupes congelées de cerveaux fixés par une solution de formaldéhyde ont pu être utilisées après le traitement par la chaleur (Ino, 2003). Les observations précédentes de notre groupe de recherche ont appuyé ce résultat sur la SFA. Nous avons aussi montré que cette méthode permettait de récupérer l'antigénicité du tissu humain tout en maintenant une qualité suffisante de tissu pour les trois solutions de fixation (Frigon et al., 2024; Frigon et al., 2026). Pour le choix du tampon, le tampon citrate 0.01M à pH 6 a été choisi sur la base des résultats prometteurs de l'étude de Cattoretti et al. (1993) pour une grande variété d'anticorps ainsi que sur nos propres observations.

Le protocole exact de récupération des antigènes, tel qu'il a été utilisé pour le tissu humain de ce mémoire, est décrit au chapitre 4. Cette procédure est réalisée avant le protocole d'IHC pour démasquer les épitopes avant l'exposition aux anticorps. Il est à noter que ce protocole n'est pas

nécessaire pour le tissu de souris, car l'antigénicité y est suffisamment bien préservée pour les anticorps sélectionnés (Frigon et al., 2024). La différence entre les traitements du tissu des deux espèces ne constitue pas un biais pour l'interprétation des résultats, car le but n'est pas de les comparer entre elles. Le protocole sur les souris sert simplement à évaluer les effets sur le tissu sans la présence des variables confondantes associées au tissu humain.

2.3 Types de protocole immunohistochimique

L'IHC comprend deux types de protocoles principaux : l'IHC avec des coupes flottantes ou l'IHC avec des coupes montées sur lame. Les étapes du protocole et les produits utilisés sont les mêmes dans les deux cas (Potts et al., 2020). Ces deux types ainsi que leurs rôles dans le présent projet seront décrits dans les prochains paragraphes.

Dans l'IHC avec des coupes flottantes, les deux faces de la coupe sont exposées aux solutions et aux anticorps. Ceci entraîne une meilleure pénétration à travers l'épaisseur de la coupe. Cela permet à la fois d'optimiser les rinçages des coupes, diminuant ainsi le marquage non spécifique de l'arrière-plan, et d'utiliser des coupes plus épaisses (40-50 microns) (Potts et al., 2020). En revanche, le protocole d'IHC avec des coupes flottantes comprend plusieurs manipulations des coupes, ce qui peut les abîmer davantage. C'est aussi pour cette raison que ce protocole est moins recommandé si les coupes sont plus minces (moins de 20 microns) (Potts et al., 2020) ou si le tissu est plus fragile ou difficile à manipuler (p. ex., le tissu fixé avec la SSS). De plus, notre laboratoire a un protocole validé depuis plusieurs années (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024). Pour toutes ces raisons, ce protocole a été utilisé pour les coupes de cerveaux de souris.

Au contraire, lorsque les coupes sont montées sur des lames avant le protocole d'IHC, une seule des deux faces de la coupe est exposée aux solutions et aux anticorps. Ceci peut imposer des limites quant à la pénétration des anticorps à travers l'épaisseur de la coupe, ce qui peut à son tour limiter l'épaisseur des coupes avec lesquelles nous pouvons travailler (Potts et al., 2020). Ce type de protocole est mieux adapté pour les coupes minces (moins de 20 microns) (Potts et al., 2020) ou le tissu plus difficile à manipuler (p. ex., tissu frais non fixé ou tissu fixé avec la SSS), car les coupes sont placées directement sur la lame après la coupe. De plus, un moins grand volume de chaque solution est nécessaire pour recouvrir les coupes sur les lames, ce qui en fait une alternative plus économique.

Puisque les cerveaux de souris ont été marqués dans un protocole avec des coupes flottantes, il aurait été idéal de répéter le protocole pour les cerveaux humains. Cependant, les coupes provenant des blocs de tissu humain sont plus grandes que celles des cerveaux de souris. Ceci cause une superposition des coupes dans les puits des plaques lors de la procédure immunohistochimique. Il en résulte une pénétration inégale des anticorps au travers des coupes, causant ainsi un marquage hétérogène. Il serait possible d'éviter ce problème en utilisant des puits plus grands ou en réduisant le nombre de coupes par puits. En revanche, cela réduirait la quantité de spécimens pouvant être traités en même temps et augmenterait les coûts. Les coupes humaines doivent également être traitées avec un protocole de récupération des antigènes avant le protocole d'IHC. Cela rend les coupes plus fragiles à cause de la chaleur et plus difficilement manipulables (Frigon et al., 2024; Ino, 2003). Pour éviter ces obstacles, l'IHC sur lame a été favorisée pour les cerveaux humains de ce mémoire. Des tests préliminaires ont montré que cette méthode permettait un marquage homogène sur toute la surface des coupes humaines et une pénétration similaire des anticorps couramment utilisés dans les projets de notre laboratoire (Frigon et al., 2026). Ces choix de l'IHC sur lame et du traitement de récupération des antigènes constituent les deux seules différences entre les protocoles d'IHC des souris et des humains. Comme l'objectif n'est pas de comparer les deux espèces, ces différence méthodologiques ne sont pas problématiques pour l'interprétation des résultats.

2.4 Systèmes de détection immunologique

L'IHC peut se faire de manière directe ou indirecte, tout dépendant de la sensibilité souhaitée. Ces deux méthodes sont illustrées à la Figure 2.

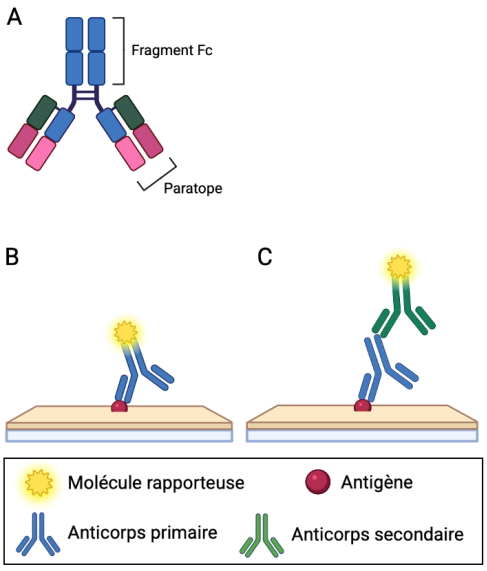


Figure 2. – **Représentation schématique des systèmes de détection immunologique**. Structure d'un anticorps (A). Méthode de détection directe (B). Méthode de détection indirecte (C). Figure créée sur BioRender.

La méthode directe (Figure 2B) ne requiert qu'un anticorps primaire pour se lier à l'antigène spécifique du tissu et pour le visualiser au microscope (Im et al., 2019; Schacht & Kern, 2015). Le paratope est la portion de l'anticorps qui reconnaît spécifiquement l'épitope de l'antigène (Ramos-Vara, 2005). La molécule rapporteuse, conjuguée au fragment cristallisable (fragment Fc) du même anticorps, permet sa visualisation au microscope. Cette méthode est plus rapide que la méthode indirecte, puisqu'elle comporte moins d'étapes. En revanche, la sensibilité y est également plus faible, car il n'y a qu'une seule molécule rapporteuse par antigène détecté (Ramos-Vara, 2005).

La méthode indirecte (Figure 2C) fait appel à deux anticorps pour lier et visualiser l'antigène spécifique (Im et al., 2019; Schacht & Kern, 2015). Le paratope d'un anticorps primaire reconnaît spécifiquement l'épitope de l'antigène désiré, puis un anticorps secondaire se lie au fragment Fc de l'anticorps primaire (Waldvogel et al., 2006). Dans ce cas, la molécule rapporteuse est jumelée au fragment Fc de l'anticorps secondaire. Cette méthode est plus longue à réaliser que la méthode directe, mais la sensibilité est également supérieure (Im et al., 2019; Ramos-Vara, 2005; Schacht & Kern, 2015). En effet, cette méthode peut détecter de plus petites quantités d'antigènes, car plusieurs anticorps secondaires peuvent s'attacher à l'anticorps primaire, amplifiant ainsi le signal (Im et al., 2019; Ramos-Vara, 2005; Smart et al., 2023). Outre les avantages reliés à la sensibilité, la méthode indirecte est aussi plus pratique en matière de l'acquisition de matériel. Le même type

d'anticorps secondaire peut être utilisé dans plusieurs protocoles différents pour détecter divers anticorps primaires provenant de la même espèce (Ramos-Vara, 2005; Schacht & Kern, 2015). Pour toutes ces raisons, c'est la méthode qui a été favorisée dans ce projet.

La molécule rapporteuse permet de visualiser au microscope les antigènes marqués. Il existe plusieurs types de molécules pouvant remplir cette fonction, telles qu'un fluorophore, une enzyme ou de la biotine (Ramos-Vara, 2005). L'immunohistochimie utilise des molécules chromogènes, c'est-à-dire que des enzymes et des substrats colorés sont responsables de la visualisation des antigènes (Hussaini et al., 2023; Ramos-Vara, 2005; Schacht & Kern, 2015). L'immunofluorescence utilise plutôt des molécules fluorescentes, qui doivent être excitées par une longueur d'onde spécifique pour émettre un signal lumineux (Hussaini et al., 2023; Im et al., 2019). Dans le cadre de ce projet, nous avons favorisé l'immunohistochimie plutôt que l'immunofluorescence, car ces lames se conservent plus longtemps. En effet, les fluorophores pâlissent rapidement quand ils sont exposés à la lumière (National Society for Histotechnology, 2021). Au contraire, les lames traitées par immunohistochimie peuvent se garder longtemps sans que la coloration ne soit compromise. Cela permet de prendre plusieurs photos au microscope afin de procéder à des analyses d'images subséquentes, et ce, sans diminuer l'intensité du marquage. De plus, la visualisation de l'immunofluorescence au microscope confocal est limitée par la présence d'autofluorescence (Oliveira et al., 2010; Waldvogel et al., 2006), particulièrement prévalente sur les coupes de tissu humain. Le signal des fluorophores attachés spécifiquement aux antigènes d'intérêt est ainsi masqué par la fluorescence non spécifique de l'arrière-plan (Oliveira et al., 2010). Comme le présent projet cherche à analyser plusieurs variables quantitatives sur les neurones marqués, il serait difficile de procéder à ces analyses sur du tissu avec une grande intensité d'autofluorescence.

2.5 Antigène et anticorps d'intérêt

Le choix de marquer les neurones plutôt que d'autres cellules du cerveau a été motivé principalement par leur importance en recherche sur le vieillissement normal et pathologique. D'une part, le vieillissement entraîne un processus d'atrophie du cerveau, accompagné d'une perte de neurones (Blinkouskaya et al., 2021; Pini et al., 2016). D'autre part, de nombreuses maladies neurodégénératives comportent une perte progressive de neurones, dont la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP), la maladie de Huntington et la sclérose latérale

amyotrophique (SLA) (Agnello & Ciaccio, 2022; Gadhave et al., 2024; Mann et al., 1983; Vogels et al., 1990). Il peut y avoir une perte de neurones de certains types (p. ex., perte des neurones dopaminergiques dans la MP ou des neurones moteurs dans la SLA) (Chinta & Andersen, 2005; Grad et al., 2017). Il peut aussi avoir une diminution du nombre et de la taille des neurones de certaines régions (p. ex., locus coeruleus et noyau basal de Meynert dans la MA) (Rinne et al., 1987; Vogels et al., 1990). Ainsi, le marquage histologique des neurones post-mortem est essentiel pour l'étude du vieillissement normal ainsi que pour le diagnostic et l'évaluation de la progression de nombreuses pathologies (Fischer et al., 2025).

Toutefois, certains tests doivent être réalisés avant de pouvoir utiliser les cerveaux des laboratoires d'anatomie pour la recherche sur ces maladies. Il faut d'abord s'assurer que la solution de fixation elle-même n'est pas en cause pour des changements microscopiques du tissu. Par exemple, il se pourrait que la diminution du nombre de neurones ou de leur taille soit causée par la solution de fixation plutôt que la pathologie à l'étude. Nous tenterons de répondre à cette question dans le cadre de ce mémoire.

Pour réaliser un marquage histologique des neurones chez les souris et les humains, il existe une grande variété d'anticorps qui ciblent différents épitopes. Par exemple, il existe des anticorps qui ciblent les progéniteurs intermédiaires ou les neurones immatures, ainsi que des anticorps qui marquent divers composants cellulaires des neurones matures. Ces antigènes peuvent être distribués à des endroits différents dans le neurone, marquant l'axone, les dendrites ou les corps cellulaires. À titre d'exemple, anti-NEFH, -NEFM et -NEFL ciblent les neurofilaments principaux, qui se concentrent dans l'axone. Anti-SYP cible une protéine impliquée dans l'endocytose de vésicules synaptiques des neurones, donc elle marque les arborisations de l'axone. Anti-TUBB3 cible la tubuline le long de l'axone. Anti-GAP43 cible une protéine associée aux cônes de croissance durant le développement des neurones. De façon encore plus précise, certains anticorps ciblent des types spécifiques de neurones selon les neurotransmetteurs qu'ils libèrent ou des protéines spécifiques à leur population. Par exemple, il est possible de marquer les neurones glutamatergiques, GABAergiques, dopaminergiques, cholinergiques, moteurs, épineux, etc. (ThermoFisher).

Dans le cadre de ce projet, le but était de marquer la population neuronale générale, sans cibler un type de neurone précis ou son état normal ou pathologique. C'est pour cette raison que les neurones

des deux volets du projet, soit sur les cerveaux de souris (chapitre 3) et humains (chapitre 4), ont été marqués avec un anticorps anti-*Neuronal nuclei* (anti-NeuN). C'est un marqueur grandement utilisé dans les domaines des neurosciences, de la biologie développementale, de la recherche sur les cellules souches et de l'histopathologie (Kim et al., 2009). L'anticorps en question s'attache à la protéine RBFOX3 ("RNA binding protein fox-1 homolog 3"), qui est exprimée dans le noyau et le cytoplasme des neurones des systèmes nerveux central et périphérique (Mullen et al., 1992). Cette protéine agit dans le processus de régulation de l'épissage des ARN prémessagers (Abcam, 2026; Kim et al., 2009). Ces informations seront importantes pour l'évaluation de la qualité de l'IHC, car cela signifie que les anticorps doivent se lier avec une protéine normalement intracellulaire.

Dans cette étude, l'anticorps monoclonal anti-NeuN a été choisi. D'abord, les anticorps monoclonaux ont une plus grande spécificité que les anticorps polyclonaux, puisqu'ils s'attachent à un seul épitope plutôt que plusieurs (Ramos-Vara, 2005). Ensuite, les protocoles qui font usage de ces anticorps secondaires sont validés et optimisés depuis plusieurs années dans notre laboratoire (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Frigon et al., 2026).

Les étapes du protocole d'IHC utilisé pour ce projet ainsi que les produits chimiques sont décrits en détail dans la section des méthodes de l'article sur les cerveaux de souris (chapitre 3). Ce même protocole est appliqué sur les cerveaux humains (chapitre 4), après avoir préalablement traité les coupes avec le protocole de récupération des antigènes. Ce traitement n'était pas nécessaire chez la souris.

3. Analyse d'images

3.1 Photomicrographies chez la souris

Les lames des cerveaux de souris ont été analysées sous un microscope en fond clair (Olympus, Tokyo, Japan, BX51W1) contrôlé par le logiciel Neurolucida (MBF Bioscience, Williston, VT, USA). Les photomicrographies ont été prises avec un objectif de 100X (UPlanSApo 100x/1.40 Oil∞/0.17/FN26.5) et une caméra à haute résolution DV-HR-CLR Lumina (capteur 1"CCS).

Le cortex moteur primaire a été délimité en utilisant les repères anatomiques tels que donnés par l'atlas de Paxinos and Franklin (2001). À partir de ces délimitations, la troisième couche du cortex moteur primaire a été ciblée. Ce choix repose principalement sur la facilité de délimitation de la

couche 3, ce qui permet de s'assurer d'être au même endroit dans toutes les coupes. Les couches 1 et 2 ne contiennent pas beaucoup de cellules, car ce sont des couches superficielles homogènes (Donoghue & Wise, 1982). La couche 4 n'est pas habituellement présente dans les aires corticales agranulaires, y compris le cortex moteur primaire (Bopp et al., 2017; Lee et al., 2022). Cette information est toutefois remise en doute dans certaines publications sur les rats et les primates (Bopp et al., 2017; García-Cabezas & Barbas, 2014; Krieg, 1946; Skoglund et al., 1997). Dans ces cas, les chercheurs avancent qu'il y a bel et bien une couche 4 dans le cortex moteur primaire, mais qu'elle contient essentiellement une mince couche de cellules pyramidales. L'incertitude quant à sa présence ainsi que sa petite épaisseur en font un mauvais choix pour prendre des photomicrographies dans le cadre de ce projet. La couche 5 est caractérisée par de larges cellules pyramidales (Welniarz et al., 2017). Dû à leur forte taille comparativement aux autres neurones de cette couche, il serait inapproprié de les inclure dans une analyse de taille cellulaire. Leur inclusion aboutirait à une étendue de valeurs trop large qui viendrait jouer sur la courbe normale et créer une distribution étalée à droite. Cela aurait un impact direct sur la détection des valeurs aberrantes et la normalité de la distribution, ce qui nous forcerait à utiliser des tests statistiques non paramétriques, qui sont généralement moins puissants que les tests paramétriques. Ainsi, la couche 3 est le choix judicieux, car les neurones sont facilement distinguables des couches adjacentes et de taille plus homogène.

Ensuite, trois régions d'intérêt (ROIs) de 125 x 100 microns (2 752 x 2 192 pixels) ont été sélectionnées et photographiées à 100X dans la couche délimitée du cortex moteur primaire de la souris pour procéder à des analyses subséquentes. Trois épaisseurs différentes de la coupe histologique ont été prises pour chaque ROI (haut de la coupe, milieu de la coupe et bas de la coupe). Les détails se retrouvent dans l'article sur les cerveaux de souris au chapitre 3.

3.2 Photomicrographies chez l'humain

Les lames des cerveaux humains ont été analysées avec le même microscope et la même caméra à un objectif de 60X (UPlanSApo 60x/1.35 Oil∞/0.17/FN26.5). Comme les cellules humaines sont plus grosses que les cellules de souris, ce grossissement était nécessaire pour inclure dans une même ROI un nombre suffisant de cellules pour procéder aux analyses quantitatives subséquentes. Cependant, le but de l'étude n'était pas de comparer les résultats entre ces deux volets du projet (c.-à-d., entre espèces), mais bien de comparer les effets des trois solutions de fixation séparément sur

les cerveaux de chaque espèce. La différence de grossissement des images entre les deux volets du projet n'est donc pas un problème.

Chez l'humain, le cortex moteur primaire s'étend sur une grande surface. Ce dernier est situé sur le gyrus précentral, qui est directement antérieur au sillon central séparant les lobes frontal et pariétal (Banker & Tadi, 2025; Meyer, 1987; Meyer et al., 2014). Pour cette raison, nous avons prélevé des blocs d'environ 1 cm^3 dans la portion supérieure du gyrus précentral, ce qui correspond au niveau approximatif du tronc sur l'homunculus moteur. Afin de confirmer que le néocortex visualisé était bien le cortex moteur primaire, nous avons sélectionné les coupes sur lesquelles les cellules de Betz étaient observables. Ces dernières sont des cellules pyramidales géantes connues pour être situées exclusivement dans la couche 5 du cortex moteur primaire (Lindenbach & Bishop, 2013; Meyer, 1987; Meyer et al., 2014; Nolan et al., 2024; Rivara et al., 2003). Ceci sert de confirmation pour une bonne localisation, bien que la couche 5 soit elle-même écartée lors des analyses.

À partir des coupes du gyrus précentral, la troisième couche du cortex moteur primaire a été ciblée de façon similaire au volet sur les souris, c'est-à-dire en se fiant à la cytoarchitecture. Les couches 1 et 2 sont similaires à ce qu'on observe chez la souris, dans la mesure où il y a peu de cellules ou de petites cellules (Banker & Tadi, 2025). Chez l'humain, le cortex moteur primaire envoie beaucoup de projections au tronc cérébral, à la moelle épinière et aux autres aires corticales impliquées dans le mouvement volontaire. Ceci fait en sorte que les couches 3 et 5 sont plus larges (Banker & Tadi, 2025). Une couche 3 plus large est avantageuse dans le cadre du présent projet parce que cela offre une plus grande surface d’échantillonnage. La couche 5 ne serait pas bien adaptée pour réaliser l'analyse quantitative de la taille neuronale, car elle contient les cellules de Betz. Ces dernières sont d'une hauteur pouvant aller jusqu'à 120 µm et d'une largeur 20 fois plus grande que les cellules pyramidales des autres couches (Meyer et al., 2014). En raison de leur forte taille comparativement aux autres neurones de cette couche, il serait inapproprié de les inclure dans une analyse de taille cellulaire, et ce, pour la même raison que les cellules pyramidales de la couche 5 chez la souris.

Ensuite, cinq ROIs ont été sélectionnées et photographiées à 60X dans la couche délimitée du cortex moteur primaire humain pour procéder à des analyses subséquentes. Chaque ROI a une dimension de 2 752 x 2 192 pixels, ce qui équivaut à une largeur de 208 x 166 microns pour

l'objectif de 60X. Trois épaisseurs différentes de la coupe histologique ont été prises par ROI (haut de la coupe, milieu de la coupe et bas de la coupe). Dans certains spécimens fixés avec la SSS (quatre cas sur six), des ROIs supplémentaires ont été nécessaires afin de pouvoir analyser suffisamment de cellules dans les étapes suivantes. Les détails se retrouvent dans les résultats supplémentaires sur les cerveaux humains au chapitre 4.

3.3 Variables d'intérêt

À partir des photomicrographies récoltées chez les souris et les humains, plusieurs variables d'intérêt ont été analysées.

Le but de ce projet était de comparer ces variables quantitatives entre les tissus fixés avec les trois solutions de fixation. Pour ce faire, nous avons analysé les variables à partir de photomicrographies de ROIs du tissu nerveux. Les ROIs analysées ont été acquises au même endroit dans le tissu, ce qui signifie que nous comparons des régions homologues avec des cellules de taille similaire provenant de la même population. Il n'y a ainsi pas de biais de sélection de la région anatomique. De plus, nous ne voulons pas estimer la véritable valeur de chaque variable dans le cortex moteur primaire entier, mais plutôt faire une étude comparative de plusieurs caractéristiques cellulaires entre les trois solutions de fixation. En ce sens, la méthode des ROIs est une méthode rapide et facile à appliquer qui répond aux objectifs du projet.

La stéréologie est une méthode grandement utilisée pour estimer le nombre d'objets dans un volume de référence. Contrairement à notre méthode de ROIs, c'est une méthode validée et exempte de biais (Glaser et al., 2007). Le principe de la stéréologie repose sur une combinaison d'échantillonnage statistique et de géométrie stochastique. Le but est d'estimer une quantité d'un objet quelconque sur une image en deux dimensions dans un espace en trois dimensions bien défini (Kristiansen & Nyengaard, 2012; Mehrabi et al., 2018). Cependant, cette estimation requiert une relation statistique connue entre la quantité estimée de l'objet d'intérêt et la vraie valeur dans l'espace complet (Kristiansen & Nyengaard, 2012). Il faudrait alors estimer une quantité dans un espace biologique complet, ce qui impliquerait d'avoir une série de coupes équidistantes sur l'ensemble du cortex moteur primaire. Cela n'est pas envisageable pour les cerveaux de souris fixés avec la SSS, car plusieurs coupes sont perdues à cause de leur difficulté de manipulation. Ce n'est également pas envisageable pour les cerveaux humains, dans lesquels le cortex moteur primaire

s'étend sur une trop grande surface. Cela produirait un nombre si élevé de coupes histologiques qu'il serait impossible de procéder à toutes les analyses dans un délai et un coût tous les deux raisonnables. Donc, la stéréologie ne convient tout simplement pas afin de répondre aux objectifs du présent projet, ce qui justifie d'autant plus l'utilisation de la méthode des ROIs.

Les variables quantitatives de ce mémoire servent à évaluer les effets des solutions de fixation sur le tissu nerveux. Concernant les effets sur le volume du tissu, plusieurs situations peuvent survenir. Parmi celles-ci, voici les plus plausibles : 1) les volumes du neuropile et des cellules diminuent ou augmentent de façon proportionnelle, 2) le volume d'un des deux compartiments diminue ou augmente, alors que l'autre ne change pas, 3) les volumes du neuropile et des cellules diminuent ou augmentent de façon inverse ou 4) aucun des deux compartiments n'est affecté. Ces neuf situations sont illustrées à la Figure 3. Chacune de ces situations peut avoir un impact différent sur diverses variables quantitatives, d'où la raison d'évaluer et de jumeler plusieurs variables pour interpréter les effets des solutions sur le tissu nerveux de façon complète. Les effets de ces neuf situations sur trois variables quantitatives considérées dans ce mémoire sont modélisés à la Figure 4. Les variables seront décrites dans les prochains paragraphes.

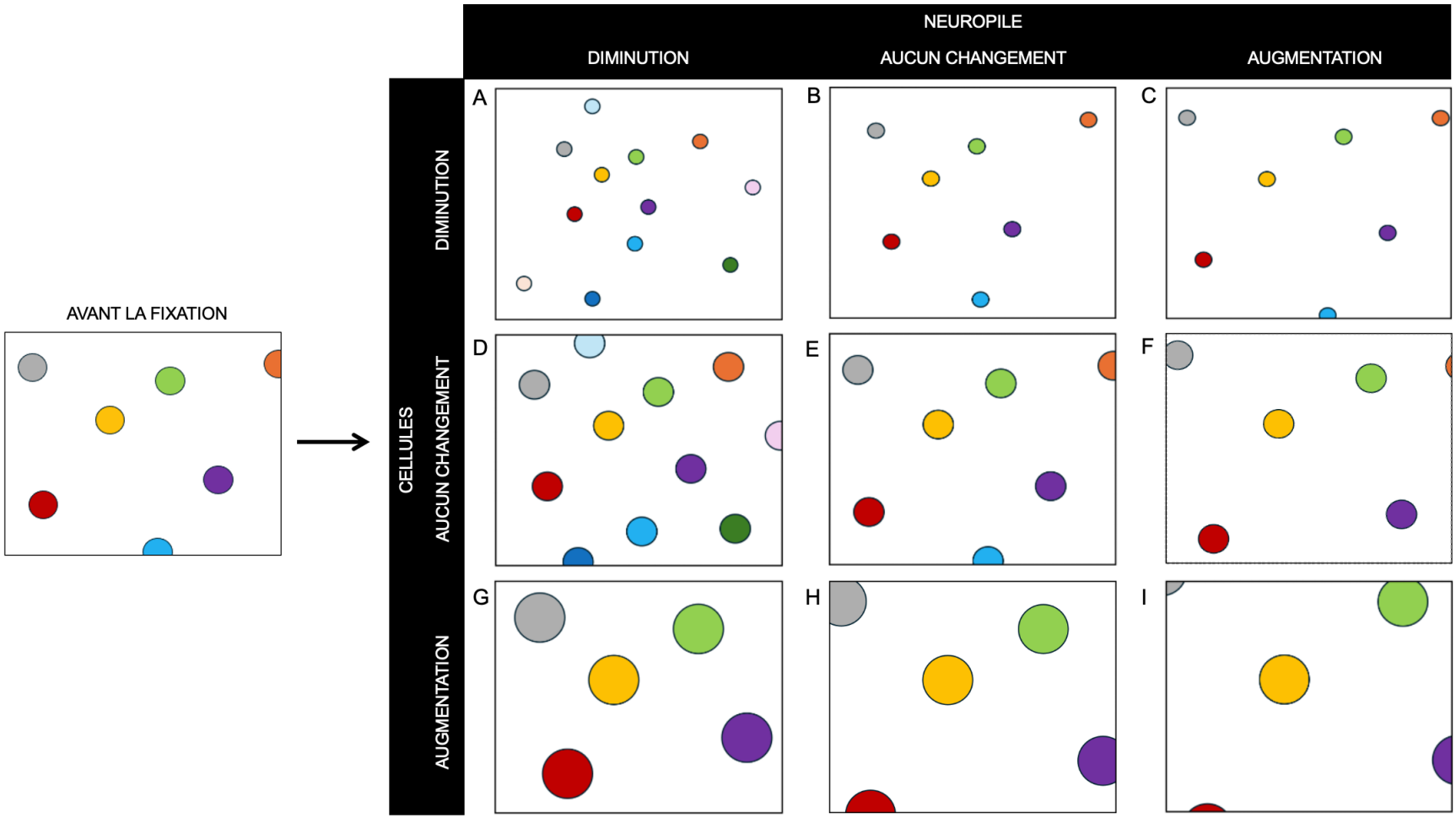


Figure 3. – **Représentation schématique des facteurs pouvant agir sur les variables quantitatives du tissu**. Les colonnes montrent l'effet du volume du neuropile. Les lignes montrent l'effet du volume des cellules. Les encadrés représentent la taille d'une région d'intérêt. Les cercles colorés représentent les cellules, chaque couleur étant associée à une cellule individuelle.

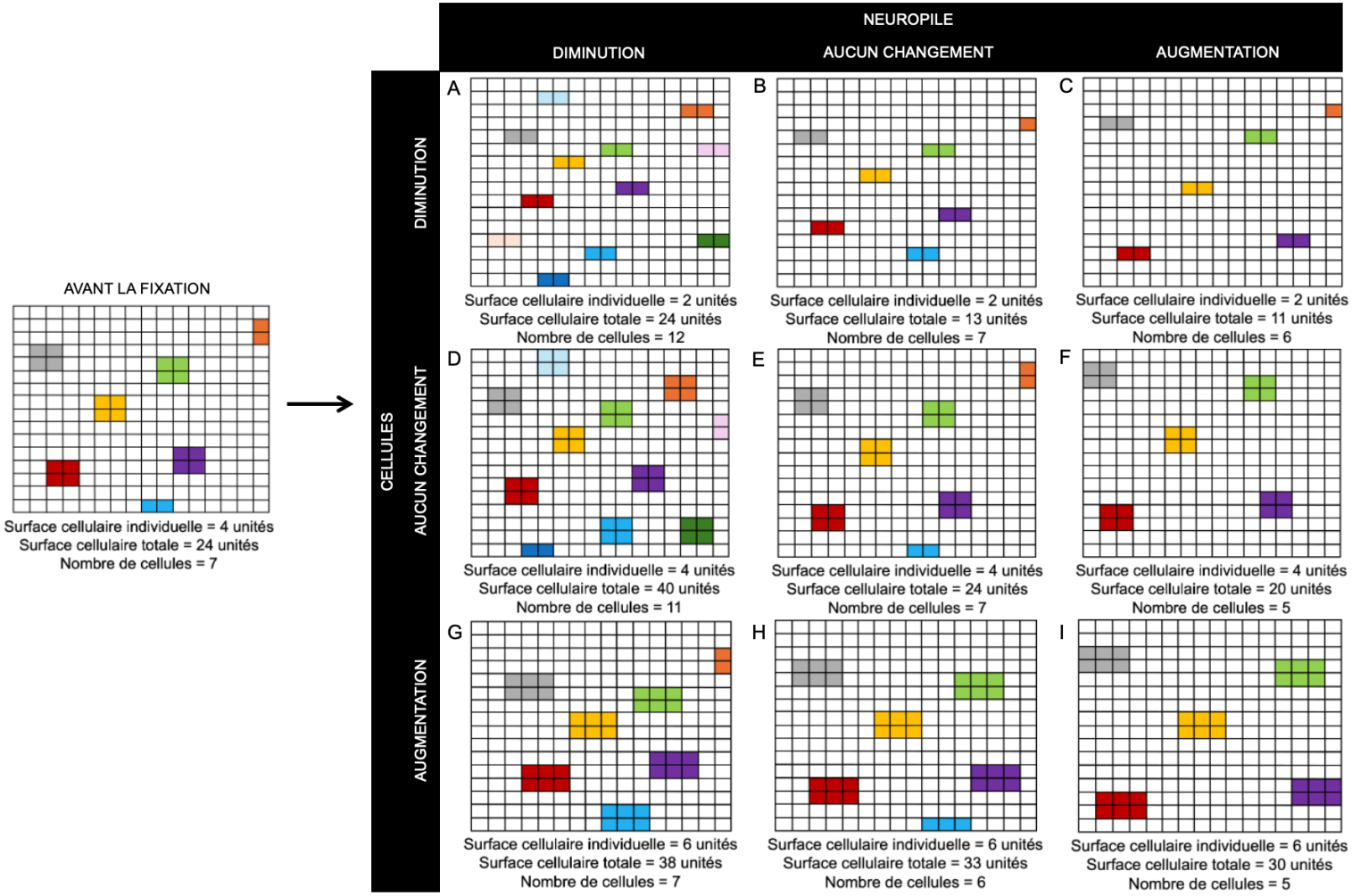


Figure 4. – **Modélisation des facteurs pouvant agir sur les variables quantitatives du tissu**. Les colonnes montrent l'effet du volume du neuropile. Les lignes montrent l'effet du volume des cellules. Les encadrés représentent la taille d'une région d'intérêt. Les carrés colorés représentent les cellules, chaque couleur étant associée à une cellule individuelle. Chaque petit carré de l'encadré représente une unité de surface. Les effets sur diverses variables quantitatives sont décrits en bas de chaque grille.

3.3.1 Quantification de la surface cellulaire totale

Individuellement, la quantification de la surface cellulaire totale permet d'évaluer la proportion de la surface occupée par les neurones marqués dans chaque ROI. Cependant, elle ne nous informe pas quant à la raison de cette surface plus grande ou plus petite par rapport à la solution. Comme cela a été modélisé à la Figure 4, la surface cellulaire totale est la même entre la situation initiale avant la fixation et la situation A après la fixation (situation dans laquelle le tissu et les cellules rétrécissent de façon proportionnelle). Pourtant, la surface occupée par chaque cellule et le nombre de cellules n'est pas le même dans les deux cas. Ainsi, la surface cellulaire totale peut être affectée à la fois par la surface individuelle des neurones et le nombre de neurones marqués, ce qui peut changer dans le tissu fixé par différentes solutions. C'est pourquoi elle doit être jumelée à d'autres variables pour interpréter les effets quantitatifs de la fixation sur les cellules et le neuropile du tissu.

La surface cellulaire totale a été analysée à l'aide d'une segmentation manuelle, qui permet d'obtenir une valeur de référence ("gold standard" ou étalon-or). Les détails de cette méthode telle qu'elle a été appliquée dans le présent projet se retrouvent dans l'article au chapitre 3. L'utilisation d'une méthode manuelle permet d'éviter les erreurs liées aux artéfacts sur les images histologiques (c.-à-d., tissu plié, tissu déchiré, intensités hétérogènes du marquage ou de l'arrière-plan, résidus de pinceau ou de crayon de plomb, etc.). En revanche, cette méthode est fastidieuse et longue à accomplir, en plus de nécessiter un évaluateur spécialisé (Billot et al., 2023; Crum et al., 2006; Dadar & Collins, 2021; Despotović et al., 2015; Gérin-Lajoie et al., 2026; Marciniewicz et al., 2019). Il a été observé que la segmentation manuelle d'une ROI pour un spécimen prenait généralement de 20 à 30 minutes pour un évaluateur habitué. La segmentation complète de chaque spécimen peut alors prendre jusqu'à 1h30 chez les souris et 2h30 chez les humains, sans compter les spécimens fixés par la SSS avec plus de cinq ROIs. Ainsi, cela constitue une limitation dans la quantité totale de spécimens qu'il est possible de segmenter manuellement.

La surface cellulaire totale a également été analysée à l’aide d’une méthode automatique, dont les principes de base seront expliqués à la section 3.4 du présent chapitre. En règle générale, les méthodes automatiques génèrent des résultats plus objectifs, comparables et reproductibles en une fraction du temps requis pour l’application des méthodes manuelles (Billot et al., 2023; Marciniewicz et al., 2019). La segmentation de toutes les ROIs de tous les spécimens ne prend que quelques minutes une fois que le logiciel automatique est validé. Cependant, les méthodes

automatiques sont aussi plus susceptibles de commettre des erreurs de type I (faux positifs), en segmentant des artéfacts histologiques qui ne seraient pas inclus lors d'une segmentation manuelle réalisée par un expert (Gérin-Lajoie et al., 2026).

3.3.2 Quantification de la surface cellulaire individuelle

Comme mentionné précédemment, la quantification de la surface cellulaire totale renseigne sur la proportion totale de surface occupée par les neurones. Toutefois, elle ne permet pas d'évaluer les tailles individuelles des neurones du tissu fixé par une des trois solutions. En effet, il pourrait y avoir plus ou moins de neurones par ROI et ces derniers pourraient être plus superposés dans le tissu fixé par une solution plutôt qu'une autre. La surface cellulaire totale montrerait ainsi une différence entre les solutions, alors que la différence réelle ne viendrait pas nécessairement d'une différence dans la taille des cellules. En segmentant des cellules individuelles, nous arrivons à savoir si la solution de fixation a un impact direct sur la taille des cellules du tissu, outre les changements du neuropile qui pourraient influencer le nombre ou la proportion de cellules par ROI. Par exemple, dans la Figure 4, la situation initiale et la situation D (situation dans laquelle seul le neuropile du tissu rétrécit après la fixation) montrent une augmentation de la surface cellulaire totale après la fixation. Sans analyser d'autres variables quantitatives, comme la surface cellulaire individuelle et le nombre de cellules, la conclusion serait que la solution fait augmenter le volume des cellules. Ce serait une conclusion erronée, car on voit bien à la Figure 4D que la taille individuelle des cellules est inchangée.

Pour quantifier cette variable, les neurones mesurés ont été déterminés aléatoirement pour éviter les biais de subjectivité qui pourraient faussement altérer les résultats obtenus. Une sélection volontaire des cellules à segmenter pourrait causer l'inclusion de cellules ayant des caractéristiques similaires, par exemple les cellules les plus grosses et les plus évidentes, ou dont les contours sont les mieux définis. Pour éviter cela, la sélection aléatoire a été accomplie à l'aide d'une grille superposée sur chaque ROI (10x10 pour les images de souris et 5x5 pour les images d'humains) et d'un générateur de chiffres aléatoires à deux colonnes (RANDOM.ORG, 2026). Ainsi, 10 cellules ont été sélectionnées aléatoirement pour chaque ROI des spécimens de souris, pour un total de 30 cellules par spécimen. Pour les cerveaux humains, nous avons remarqué qu'il y avait moins de cellules par ROI et qu'elles étaient parfois distribuées de façon hétérogène dans certains spécimens dans lesquels le marquage était plus faible. Il n'était alors pas possible de sélectionner dix cellules

par ROI pour tous les cas. Le protocole de sélection a été modifié en conséquence. Plutôt que de segmenter un nombre prédéterminé de cellules par ROI, 30 cellules ont été sélectionnées aléatoirement sur l'ensemble des cinq ROIs par spécimen. De plus, pour les cas spécifiques de la SSS dans lesquels très peu de cellules étaient marquées dans chaque ROI, une autre modification a été apportée au protocole. Dans ces cas, toutes les cellules observables dans toutes les ROIs ont été sélectionnées pour la segmentation. Dans quatre spécimens fixés par la SSS sur six, cela a nécessité la prise de photomicrographies supplémentaires pour atteindre le nombre total désiré de cellules. Ici, la sélection aléatoire des neurones a été assurée par la localisation aléatoire des ROIs dans les coupes.

La méthode manuelle (section 3.3.1) a été appliquée pour segmenter les cellules individuelles pour les cerveaux de souris et humains. Puis, la même méthode automatique a également été utilisée pour donner des résultats de segmentation des cellules individuelles.

3.3.3 Quantification du nombre total de neurones marqués

La quantification du nombre total de neurones marqués dans chaque ROI renseigne sur la densité cellulaire des tissus fixés par les trois solutions, mais aussi sur les effets des solutions sur le volume du cerveau. Si la SFA fait plus ou moins diminuer le volume du cerveau, la quantité de neurones inclus dans une ROI de même taille géométrique pourrait différer. En effet, un tissu de volume diminué aurait théoriquement plus de neurones dans le même espace géométrique qu'un tissu de volume moins affecté par la fixation (Figures 3A et 4A). Similairement, un tissu dont le volume du neuropile diminue sans affecter celui des cellules aurait théoriquement plus de neurones dans le même espace géométrique (Figures 3D et 4D).

Afin de considérer le plus possible la tridimensionnalité des coupes de tissu d'une épaisseur de 40 microns, des photomicrographies de la même ROI ont été acquises à trois reprises, à trois profondeurs différentes de la coupe histologique (haut de surface de la coupe, centre de l’épaisseur de la coupe et bas de la coupe). Cela a permis d'ajouter deux variables supplémentaires, soit le compte des cellules au focus et hors-focus. En se basant sur la photomicrographie du milieu de la coupe, les cellules dont les contours étaient clairs ont été comptées comme cellules au focus. Les cellules dont les contours étaient flous dans la couche du milieu, mais nets dans les photomicrographies du haut ou bas de la coupe ont été comptées comme cellules hors-focus. Cela permet de différencier les cellules complètement ou majoritairement incluses dans la coupe de 40

µm (cellules au focus) des cellules dont la majorité du corps cellulaire a été perdu dans les coupes précédentes ou suivantes (cellules hors-focus). Le raisonnement est le suivant : un tissu avec des cellules plus grosses aurait davantage de cellules au focus, car elles seraient présentes dans la couche du milieu (Figure 5A). Inversement, il serait moins probable de retrouver des cellules plus petites exactement dans le niveau de profondeur de la couche du milieu (Figure 5B).

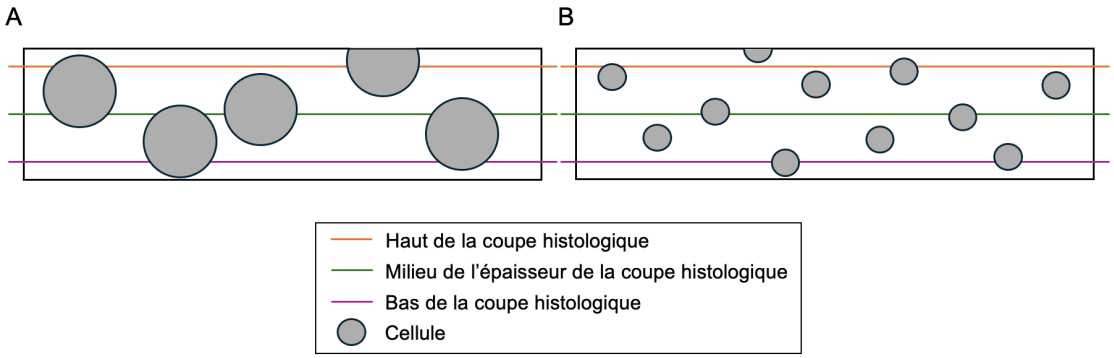


Figure 5. – **Représentation schématique des cellules au focus et hors-focus au travers de la coupe histologique**. Situation dans laquelle les cellules sont plus grosses (A). Situation dans laquelle les cellules sont plus petites (B). Les encadrés représentent l'épaisseur de la coupe histologique. Les lignes colorées représentent la hauteur à laquelle les photomicrographies ont été prises pour chaque ROI.

3.3.4 Quantification des diamètres cellulaires

La quantification des diamètres cellulaires a été appliquée sur les neurones aléatoirement choisis pour la segmentation de la surface cellulaire individuelle. Le grand diamètre est la distance entre les deux points les plus éloignés de l'image du corps cellulaire (Figure 6). Le petit diamètre est le diamètre cellulaire tel qu'obtenu perpendiculairement au plus grand diamètre (Figure 6). Nous avons préféré rapporter les diamètres cellulaires plutôt que d'autres mesures morphologiques (p. ex., périmètre, forme, etc.), car il est plus courant de rapporter la taille des cellules en diamètre dans la littérature biologique classique (Amodeo & Skotheim, 2016; Hatton et al., 2023; Rivara et al., 2003). Ces diamètres ont été mesurés manuellement à l'aide d'une fonction sur le logiciel Neurolucida. Ils ont aussi été générés automatiquement en se basant sur les segmentations automatiques des cellules individuelles.

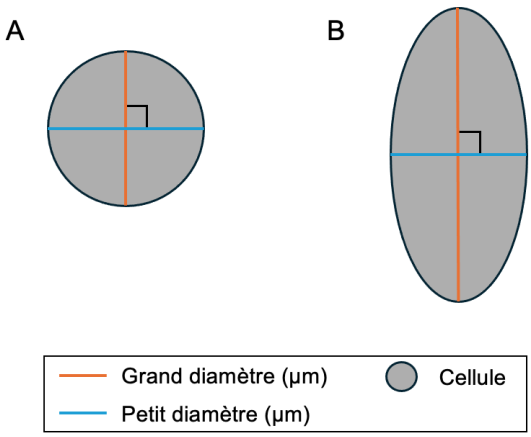


Figure 6. – **Quantification des diamètres cellulaires**. Cellule de morphologie circulaire (A). Cellule de morphologie allongée (B).

Puis, un ratio de circularité a été établi pour chacune des cellules, en divisant les petits diamètres sur les grands diamètres :

$$0 < \frac{Petit\ diamètre}{Grand\ diamètre} < 1$$

Plus la valeur du ratio s'approche de 1, plus les deux diamètres sont similaires. Cela implique que la cellule est circulaire (Figure 6A). Dans le cas contraire, une cellule de morphologie plus allongée (Figure 6B) aura une valeur de ratio qui s'éloigne de 1. Cette variable nous permet de comparer les morphologies des cellules entre les solutions. Les ratios ont été calculés pour les diamètres mesurés manuellement, puis pour les diamètres mesurés automatiquement.

3.3.5 Nombre de régions d'intérêt

Nous avons décidé d'ajouter le nombre de ROIs analysées en tant que variable quantitative pour les cerveaux humains, car c'est un indicateur de la proportion de surface occupée par les neurones dans chaque ROI. Un spécimen dans lequel cinq ROIs ont été suffisantes pour appliquer les analyses quantitatives comprend plus de cellules par ROI qu'un spécimen dans lequel des ROIs supplémentaires ont été nécessaires.

3.4 Réseau neuronal convolutif

La méthode automatique utilisée pour segmenter les surfaces cellulaires totale et individuelle a été élaborée par nos collaborateurs du Centre de recherche Douglas. Elle est basée sur le réseau

neuronal convolutif ("convolutional neural network" ou CNN). C'est une forme d'apprentissage profond ("deep learning") inspirée de la vision humaine et utilisée comme méthode de reconnaissance d'objets et de classification d'images (Chen et al., 2025). Son organisation hiérarchique complexe lui confère une grande efficacité de classification des CNNs. Elle se crée en deux grandes étapes : 1) l'extraction de caractéristiques de l'image initiale et 2) la classification de l'image.

La première étape comprend plusieurs cycles de convolution et de mise en commun ("pooling") sur l'image initiale. La convolution réfère à l'étape durant laquelle les filtres sont appliqués sur l'image. Ces filtres analysent des blocs de pixels pour reconnaître des formes précises, par exemple des lignes, des angles, des coins ou des formes abstraites (Chen et al., 2025). Pour chaque bloc de pixels, un score numérique est établi en fonction de la similitude des formes qui y sont avec la forme recherchée pour chaque filtre (IBM Technology, 2021). Les scores de tous les blocs de pixels sont regroupés pour former des cartes de caractéristiques. Ensuite, les cartes de caractéristiques sont soumises à la mise en commun, soit l'étape durant laquelle les dimensions spatiales des cartes sont réduites (Unboxing Big Data, 2025). Cela permet au modèle d'être plus robuste face aux variations subtiles de l'image initiale (distorsions des pixels) et de réduire les coûts du calcul. Ceci est fait en glissant une fenêtre de mise en commun sur les cartes de caractéristiques pour appliquer des fonctions de mise en commun (Alma Better, 2024). Il existe plusieurs types de fonctions de mise en commun (Figure 7), par exemple la mise en commun maximale ou la mise en commun moyenne. Dans la mise en commun maximale, seul le score numérique le plus élevé dans chaque bloc analysé par la fenêtre de mise en commun est conservé (Figure 7A). Dans la mise en commun moyenne, seule la moyenne de tous les scores dans chaque bloc analysé par la fenêtre de mise en commun est conservée (Figure 7B). Dans les deux cas, le résultat donne une carte de caractéristiques réduite. Les étapes de convolution et de mise en commun sont répétées un nombre k de fois à l'intérieur du CNN.

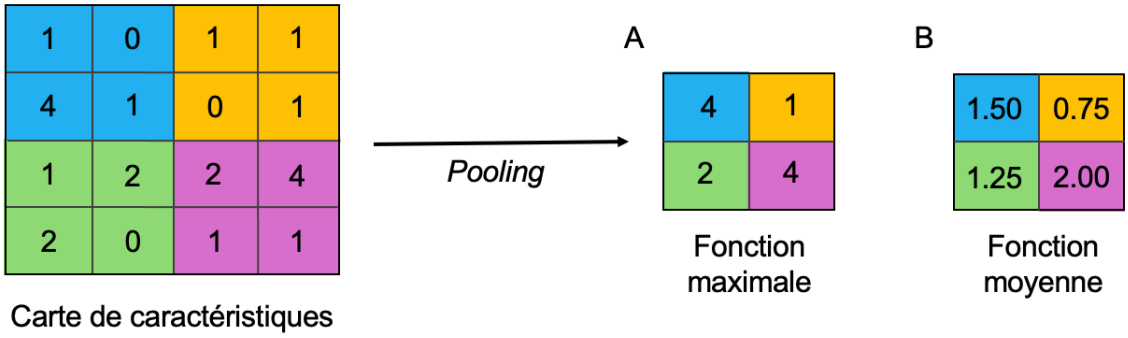


Figure 7. – **Types de fonctions de mise en commun**. Mise en commun maximale (A). Mise en commun moyenne (B). Chaque bloc coloré représente un bloc analysé par une fenêtre de mise en commun sur la carte de caractéristiques initiale et le score mis en commun sur la carte de caractéristiques réduite.

La deuxième étape se fait en connectant toutes les couches des différentes cartes de caractéristiques extraites. En les analysant toutes ensemble, le CNN peut alors émettre des prédictions pour reconnaître l'image initiale.

C'est l'ensemble de ces deux étapes qui permet aux CNNs de former des représentations hiérarchiques complexes de chaque image (Hoffmann et al., 2024) et ainsi d'accomplir des tâches de reconnaissance. Toutes les étapes principales du CNN sont illustrées à la Figure 8.

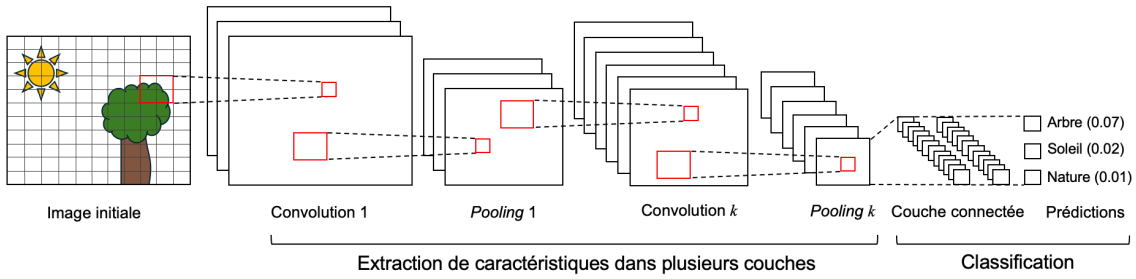


Figure 8. – **Organisation hiérarchique d'un réseau neuronal convolutif**. Figure inspirée de Alma Better (2024).

La méthode des CNNs permet de répondre à certaines limitations associées avec les images biomédicales, comme c'est le cas pour nos photomicrographies d'IHC. La production des coupes histologiques peut être soumise à des contraintes de main-d'œuvre et de temps. Cela peut entraîner une quantité insuffisante d'images qui sont générées pour l'entraînement adéquat d'un logiciel automatique à une tâche de reconnaissance (Ronnerberger et al., 2015). Les CNNs ont été conçus pour contourner cet obstacle, en permettant des segmentations précises malgré une faible quantité

d'images (Ronnerberger et al., 2015). Pour ce faire, des augmentations d'images sont appliquées, c'est-à-dire que plusieurs images sont produites à partir de la première. Cela signifie que des déformations d'images sont volontairement créées pour entraîner le logiciel à segmenter correctement les neurones du tissu en dépit des possibles artéfacts histologiques et du petit nombre d'images disponibles (Ronnerberger et al., 2015). Les déformations peuvent être faites en créant des changements de dimensions ou d'orientation de l'image originale, par exemple en coupant des bouts d'image, en ajoutant des bouts d'images, en insérant des rotations ou en insérant des formes. Les artéfacts peuvent inclure des contrastes faibles entre les objets à segmenter et l'arrière-plan, des contours non linéaires et l'hétérogénéité de morphologie des objets (Hoffmann et al., 2024). Les détails concernant l'entraînement de la méthode automatique utilisée dans le présent projet, basée sur le principe des CNNs, sont donnés dans l'article des souris au chapitre 3.

Pour ce projet, la segmentation automatique est pertinente pour évaluer les variables rapidement et de façon plus objective que la méthode manuelle (voir section 3.3.1, chapitre 2). Cependant, la qualité des segmentations obtenues est grandement dépendante de la qualité des images histologiques. Si une solution de fixation entraîne l'hétérogénéité de l'arrière-plan ou du marquage cellulaire, le logiciel automatique pourrait moins bien performer dans ces images. En ce sens, l'ajout du volet automatique à ce projet ajoute de la profondeur à l'interprétation des résultats et de la qualité histologique produite par chacune des trois solutions étudiées.

Chapitre 3 – Neuronal quantification in mouse brains fixed with solutions from human gross anatomy laboratories

Amy Gérin-Lajoie, BSc[1], Eve-Marie Frigon, PhD[1], Walter Adame-Gonzalez, MSc[2,3], Mahsa Dadar, PhD[2,3], Denis Boire, PhD[1], Josefina Maranzano, MD, PhD[1,4]

1. Department of Anatomy, University of Québec in Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada
2. Department of Psychiatry, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
3. Douglas Mental Health University Institute, Montreal, Quebec, Canada
4. Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Corresponding author:
Amy Gérin-Lajoie
Université du Québec à Trois-Rivières
3351 Bd des Forges, Trois-Rivières, Québec, Canada, G8Z 4M3
amy.gerin-lajoie@uqtr.ca

Acknowledgements: The authors would like to thank the funding resources and the staff at the Animal Care facilities of the University of Québec in Trois-Rivières.

Funding: This work was funded by the NSERC grant to JM. AGL was supported by the NSERC and FRQNT.

Conflict of interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

1. Abstract

Background: Brain banks usually provide neuroscientists small blocks of tissue fixed by immersion in neutral-buffered formalin (NBF). While still underexploited for research, gross anatomy laboratories could provide full brains fixed by perfusion with solutions usually better adapted for gross anatomy dissection. However, the chemicals in these solutions might have a different impact on histology protocols for cell quantification than in NBF-fixed brains. The main goal of this study is to compare the effects on the number and size of neurons of brains fixed with three different solutions: (1) NBF, typical of brain banks, (2) a saturated salt solution (SSS), and (3) an alcohol-formaldehyde solution (AFS), both used in laboratories of human anatomy.

Methods: 27 C57BL/6J mouse brains were perfused with the NBF (N=9), SSS (N=9) or AFS (N=9), then cut in 40-µm slices and processed with an immunohistochemistry protocol targeting neurons. Various quantitative variables were assessed manually and automatically on photomicrographs of 3 regions of interest (ROIs) per specimen, namely the total and individual neuronal surfaces, number and diameters. The effects of these three fixatives on these variables were compared by using ANOVA or Kruskal-Wallis, depending on the distribution.

Results: There was no difference between the three fixatives for the total and individual cell surfaces, and the total cell count. Automatic results generated similar statistical findings. However, it was found that NBF-fixed cells had smaller large diameters than cells fixed with the gross anatomy solutions. These results were not replicated by the automatic measures, which instead showed that the small diameters were greater for the SSS-fixed neurons than those fixed with NBF and AFS.

Conclusion: It was found that the SSS and AFS had similar impacts on the quantitative variables in the tissue as the NBF. However, the difference in cell diameters observed in NBF-fixed neurons might indicate a slight difference in cell morphology that requires further investigation before the use of the SSS and the AFS can be considered for quantitative neuroscientific research.

2. Introduction

In neuroscientific research, histology remains the gold standard to assess the cellular and molecular changes caused by normal and pathological aging of the brain at the microstructural level (den Bakker, 2017; Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Hoffmann et al., 2011). Since biopsies are an invasive and therefore rarely performed technique to acquire brain tissue for histology processing, researchers tend to turn to *ex vivo* approaches, which allow them to gather information concerning the cellular changes. *Ex vivo* specimens need to be fixed to prevent tissue decomposition and to preserve the cellular architecture (Arnold et al., 1996; Brenner, 2014; Musiał et al., 2016; Thavarajah et al., 2012). Fixation involves the use of chemical solutions that could potentially modify the tissue's physicochemical characteristics (Holmes et al., 2017). The solutions might in turn alter the distribution of fluids and the molecular conformation of proteins, which translates into deformations and changes in cellular morphology (Alkemade et al., 2023; Haga et al., 2019; Kotrotsou et al., 2014; Vasung et al., 2019).

Neutral-buffered formalin (NBF) remains the most wildly used chemical fixative in neuroscientific and histopathological studies. It prevents the decay of tissues through protein cross-linking (Blum, 1896; de Paula et al., 2018; Grigorev & Korzhevskii, 2018; Helander, 1994; Hobro & Smith, 2017; Hopwood, 1985; Ma et al., 2024; O'Rourke & Padula, 2016; Puchtler & Meloan, 1985; Wu et al., 2022). Although formaldehyde has excellent tissue preservation properties that prevent decomposition very effectively (Fox & Benton, 1987; O'Rourke & Padula, 2016), it also causes tissue shrinkage and hardening (Balta et al., 2015; Barton et al., 2009; Birkl et al., 2016; Brenner, 2014; Eisma et al., 2013; Eisma et al., 2011; Frigon et al., 2022b; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016; Jaung et al., 2011; Mayer, 2006; Regelsberger et al., 2015; Richins et al., 1963; Tomalty et al., 2019; Weisbecker, 2012). Furthermore, it is a toxic compound with carcinogenic potential in high concentrations and with long-term exposure (Benet et al., 2014; Brenner, 2014; Coleman & Kogan, 1998; de Paula et al., 2018; Fischer, 1905; Hayashi et al., 2016; Lombardero et al., 2017; Moelans et al., 2011; Musiał et al., 2016; Otsuka et al., 2022). Consequently, specimens fixed with NBF are not appropriate for gross anatomy laboratories. Alternative solutions have been developed and optimized to better mitigate these challenges for dissection and anatomy teaching. These solutions include a saturated salt solution (SSS) (Coleman & Kogan, 1998; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016) and an alcohol-formaldehyde solution (AFS) (Benet et al., 2014). Both

solutions contain lower formaldehyde concentrations, combined with other chemicals (i.e., sodium chloride and various types of alcohols) to allow for lengthy dissections and to decrease the toxicity risk while maintaining an excellent tissue preservation.

Although the SSS and AFS are useful solutions for gross anatomy laboratories, their compatibility with (immuno-) histochemical procedures have not been extensively tested. We have previously shown that they appropriately preserved antigenicity of the four main brain cell populations (i.e., neurons, astrocytes, microglia, and myelin of oligodendrocytes) in mice (Frigon et al., 2022b) and in humans (Frigon et al., 2024). Our results also showed satisfactory tissue quality of the samples fixed with AFS, but lower tissue quality and ease of manipulation of the sections of tissue fixed with SSS. However, since both studies focused on the qualitative assessment of histology quality, whether these solutions impact quantitative studies of brain tissue has yet to be determined. Indeed, it is widely known that neuronal loss is a hallmark of many neurodegenerative diseases and other neurological pathologies (Agnello & Ciaccio, 2022; Vogels et al., 1990). Morphological alterations are also common. For instance, neuronal shrinkage within the nucleus basalis of Meynert has been detected in cases of Alzheimer's disease (Rinne et al., 1987; Vogels et al., 1990). It has also been observed in the hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus of brains of patients with schizophrenia (Rajkowska et al., 1998). The number and size of pyramidal cells within the primary cortex of people with amyotrophic lateral sclerosis are also known to be impaired (Hammer et al., 1979; Mezzapesa et al., 2013). Consequently, it is important to explore the neuronal count, size and surface in brains fixed with each fixative to know if solutions used in anatomy laboratories affect the cell populations in the same way as the NBF used by brain banks. In doing so, we aim to support the use of an alternative source of brain samples for research purposes, since brain banks generally only provide small blocks of NBF-fixed tissue while gross anatomy laboratories could offer full brains.

Therefore, the present study aims to describe and compare the effects of two solutions used in gross anatomy laboratories (i.e., the SSS and AFS) to those of the classic fixative used by brain banks (i.e., the NBF) on the number and size of neurons in mice, using manual and automatic techniques. We hypothesized that the cell number, surface and diameters may be different in mouse brains fixed with AFS and SSS compared to NBF-fixed brains.

3. Materials and Methods

3.1 Population

We used a sample of 27 adult C57BL/6J mice (male to female ratio of 14 to 13) (Table 1) that were raised and kept in a controlled environment (45-60% humidity; 20-25°C temperature; 12-hour daylight schedule). We followed the guidelines as described by the Canadian Council on Animal Care. Our protocols were approved by the Ethics Committee of the University of Québec in Trois-Rivières.

By using mouse brains, we avoided the confounding variables associated with the use of human samples, such as post-mortem delay, fixation delay, comorbidities, biological heterogeneity of donors, etc.

Fixative	**Sex**	**Age** (days)	**Post-fixation time** (hours)
NBF	F	182	1.5
		182	1.0
		182	1.0
		200	1.0
		187	1.0
	M	220	1.5
		182	1.0
		214	1.0
		214	1.0
SSS	F	182	1.5
		182	1.5
		200	2.0
		187	1.0
	M	220	1.5
		182	1.0
		182	1.0
		189	2.0

		215	1.0
AFS	F	182	1.5
		200	1.0
		200	1.0
		187	1.0
	M	167	2.0
		182	2.0
		182	2.0
		215	1.0
		215	1.0

Table 1. – **Mice data**. NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; F = female; M = male

3.2 Fixation procedure

Brains were fixed by transcardiac perfusion (Paul et al., 2008; Rana et al., 2022), using 0.1M phosphate-buffered saline (PBS) (0.9% NaCl). This was followed by one of the three tested fixative solutions tested in this study: 1) NBF, 2) SSS, and 3) AFS (see Table 2 for the chemical composition of each fixative) for 5 minutes to standardise fixative exposure. Mice were randomly assigned to fixative solution groups (NBF: N=9; SSS: N=9; AFS: N=9). Following the perfusion, the brains were harvested and immersed in their respective fixative solution for a post-fixation time before immunohistochemistry (IHC) processing. The length of the post-fixation was determined by assessing the color of the tissue, which indicates the amount of remaining blood (Frigon et al., 2022b): two hours for pink brains, one hour and a half for heterogeneous brains, and one hour for beige brains. The post-fixation times (see Table 1) were not statistically different between the three groups.

NBF	SSS	AFS (Benet et al., 2014)
4% formaldehyde	0.8% formaldehyde	2.3% formaldehyde
0.1M PBS	36% NaCl	62.4% ethanol
	0.72% phenol	10.2% phenol
	2% glycerol	17% glycerol
	16% isopropyl alcohol	
	2.5% Dettol	

Table 2. – **Chemical composition of the fixatives**. NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; PBS = phosphate-buffered saline; NaCl = sodium chloride

3.3 Immunohistochemistry processing

After post-fixation, the brains were rinsed in 0.1M PBS and immersed in 30% sucrose for cryoprotection. Brains were then frozen in dry ice and stored at -80°C until processed. They were cut in 40-µm-thick coronal sections using a cryostat at -19°C (Leica CM1950). The sections were rinsed three times in 5-minute intervals in 0.1M PBS before a 30-minute incubation in an aqueous methanol solution (20% methanol, 0.5% H_2O_2, and 0.3% Triton X-100 in 0.1M PBS) to quench endogenous peroxidase. The sections were rinsed three other times for 5 minutes in 0.1M PBS, followed by a 2-hour incubation in a blocking solution comprising 3% normal donkey serum, 0.5% bovine serum albumin, and 0.3% Triton X-100 in 0.1M PBS. The sections were then transferred directly into the same blocking solution with the added primary antibodies (1:3000, rabbit anti-Neuronal nuclei (NeuN), Abcam, Ab177487) for an overnight incubation at 4°C on a shaker. The next day, the slices were rinsed three times at 5-minute intervals in 0.1M PBS before an incubation in the blocking solution with secondary antibodies (1:500, donkey anti-rabbit biotinylated, NovusBio, NBP1-75274) for 2 hours at room temperature. The sections were then rinsed again in 0.1M PBS in three 5-minute baths before a 30-minute incubation in the dark in an avidin-biotin complex kit (Vector Laboratories, Newar, CA USA, catalog #VECTPK6100). Following three 5-minute rinses in 0.05M TRIS-buffered saline (TBS) (0.9% NaCl), sections were then incubated for 10 minutes in 0.07% diaminobenzidine (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA catalog #D5905-50TAB) with 0.024% H_2O_2 in 0.05M TBS. The sections were rinsed three times for 5 minutes in 0.1M phosphate buffer and mounted on 2% gelatin-subbed slides. Finally, the slides were

dehydrated in graded alcohols (70% ethanol, 95% ethanol, 2 x 100% ethanol, and 2 x xylene) and coverslipped with Eukitt quick-hardening mounting medium.

3.4 Microscopy

Photomicrographs were captured through a brightfield microscope (Olympus, Tokyo, Japan, BX51W1) controlled by Neurolucida (MBF Bioscience, Williston, VT, USA) with a 100X objective (100X, UPlanSApo 100x/1.40 Oil∞/0.17/FN26.5) and a high resolution DV-HR-CLR Lumina camera with a 1"CCS sensor. The boundaries of the primary motor cortex were traced on the Neurolucida software using a mouse brain atlas (Paxinos & Franklin, 2001). Using cytoarchitectural landmarks, three regions of interest (ROIs) (125 x 100 microns) were selected in layer 3 of the primary motor cortex. Three images were captured for each selected ROI across the thickness of the tissue section, including one at the top, one in the middle and one at the bottom of the slice (hereby referred to as top, middle, and bottom, respectively).

3.5 Image analyses

Quantification of the total neuronal surface, the surface of ten individual neurons, the total neuronal count, and their diameters were considered for subsequent statistical analyses.

3.5.1 Total cell surface

The total neuronal surface is the sum of all the neuronal profile areas within the surface of each photomicrograph. This variable is therefore a composite of the number of cells within a ROI and their individual sizes. For example, if the fixation causes the tissue to expand, there would be fewer neurons in each ROI, but they would be of a larger size. While the total cell surface might not reveal any differences between the initial and the fixed tissue, the other quantitative variables would be affected in the given example. Therefore, the total cell surface must be interpreted while also considering the other variables we report here.

3.5.1.1 Manual segmentation

The total cell surface was segmented manually by the same rater (A.G.L.) in the middle image of each ROI using the Display software (MINC Tool Kit, McConnell BIC). An intensity threshold function allowed us to select the range of gray intensity of pixels that best revealed neuronal surface on each image. All the pixels within the chosen range of intensities were selected by the software

and then corrected manually to add false negative pixels and remove false positive pixels. These segmentations were used as the gold standard for the remainder of the project.

3.5.1.2 Automatic segmentation

Using the same middle images, we also tested an automatic detection method that generated labels of the total cell surface for every specimen. The method itself was based on an adapted in-house deep learning network for medical image segmentation using a UNet architecture (Ronnerberger et al., 2015). Raw MINC volumes were paired with their painted cell masks, and the masks were binarized with a > 0.5 threshold. Out of the 79 available samples (pixel dimensions of 3 x 2 192 x 2 752), 67 were used for training the network using five-fold cross-validation, leaving the remaining 12 reserved for the test subset. The images were fed into the network after linear min-max normalization to [-1, 1]. Due to the relatively small number of training images, aggressive augmentation techniques were applied to the input images during training: horizontal and vertical flips, random 90-degree rotations, additive white Gaussian noise ($\sigma = 0.01$), random gamma [0.8, 1.2], and CutMix ($p = 0.5$, $min_{frac} = 0.05$, $max_{frac} = 0.2$). For the validation and test subsets, no augmentations were used but they were processed with the same normalization to [-1, 1]. The network was trained using a standard implementation of binary cross-entropy (*BCELoss*) for 200 epochs per fold using a batch size of 1, and the checkpoint with the best validation loss per fold was used for downstream inference.

3.5.2 Individual cell surface

This variable allows for the evaluation of the effect of the fixative solution on the cell surfaces, without the influence of cellular overlap or the confounding effects of the other variables. In combination with the total cell surface and the number of neurons, this metric allows to test whether the fixation has an influence on the neuropil or the cells, or on both.

3.5.2.1 Manual segmentation

Ten individual cells were randomly selected per ROI with a 10x10 grid and a two-column random number generator (RANDOM.ORG, 2026). To be considered for inclusion in the sampling, cell profiles were required to be isolated from others or their borders very distinct from a neighboring cell. This ensured that it could be segmented without inadvertently including portions of the neighboring cells. Then, every randomly selected cell was segmented manually (A.G.L.) using the

same manual method as was used for the total cell surface quantification. The rater measured ten cell surfaces per ROI and three ROIs per specimen, producing individual surfaces for 30 cells per specimen.

3.5.2.2 Automatic segmentation

The automatic total cell surfaces were used as a basis to adapt the automatic segmentation for individual cell surfaces. The cell clusters were isolated using a watershed algorithm using the *scipy.ndimage.watershed_ift* Python package ($distance_{min}$ = 90 px, $distance_{sigma}$ = 0 px, $area_{min}$ = 15 000 px, connectivity = 8). This permits the separation of overlapping objects that have previously been segmented by another method (Kornilov et al., 2022). The automatic surface measures of the same cells of interest were then obtained as they were with the manual method.

3.5.3 Cell counts

This variable allows us to assess whether the fixative solution impacts the number of labeled neurons in a specific ROI. Either this variable can be affected by the changes in volume of the tissue, or by the effect of the chemicals present in the fixative solutions on antigenicity preservation.

The total number of labeled neurons per ROI was quantified with the Neurolucida software. Two different markers were used: one for in-focus cells and one for out-of-focus cells. We defined in-focus cells as cells with clear outlines in the middle layer and out-of-focus cells as cells with blurry outlines in the middle layer and clear outlines either in the bottom or top layer. The purpose of the in-focus and out-of-focus cells is to consider all cells present in the middle layer while still differentiating their spatial characteristics, since they could be related to the neuronal size. Larger neurons would more often appear in focus because they have a higher probability of being included in the middle layer. Conversely, smaller neurons would be less likely to appear as often in the middle layer, as they would be more dispersed in the thickness of the slice. Finally, we also added up the number of in-focus and out-of-focus cells to obtain a total cell count.

3.5.4 Cell diameters

The large and small diameters are informative of the size of individual cells. It is also the standard way in which biology literature has traditionally reported cell size (Paxinos & Mai, 2004).

Furthermore, the diameters enable the assessment of cell morphology by calculating a circularity ratio.

The large and small diameters of the same ten cells per ROI were manually measured using the Neurolucida software. The large diameter was defined as the length between the two furthest opposing points of the cell and the small diameter as the length between the two furthest opposing points perpendicular to the large diameter. The diameters were also measured automatically based on the automatic cell surfaces previously generated.

Using these cell diameters, a circularity ratio was measured by dividing the small diameters by the large diameters:

$$0 < \frac{Small\ diameter}{Large\ diameter} < 1$$

A value closer to one would mean the cell has a circular morphology, wherein the large and small diameters are similar in length. On the contrary, a value further from 1 would mean the cell had an elongated morphology, wherein the large diameters had a distinctly longer length than the small diameters. These ratios were measured for every cell and compared between solutions. They were generated for both the manually- and automatically-measured cell diameters.

3.6 Statistical analyses

One-way ANOVAs were performed when the distribution of values met the normality requirement according to the Kolmogorov-Smirnov test. In such scenarios, the mean and standard deviation were reported. Since the comparisons were made between three groups of equal size, Fisher's Least Significant Difference (LSD) was applied as a post hoc test. Kruskal-Wallis tests were performed when the distribution of values did not respect the normality curve. In these cases, the median and range were instead reported.

The validity and reproducibility of the ten-cell manual method was assessed by evaluating the intraclass correlation coefficients (ICCs) for intra-rater (AGL-1 vs AGL-2) and inter-rater (AGL vs other rater) variabilities. A two-way mixed ICC model for absolute agreement was selected to evaluate the agreement across raters.

The comparisons between manual and automatic segmentation methods were done with the Dice coefficient. All comparisons between manual and automatic measures were also evaluated with correlations. Both the Pearson and Spearman correlations were used, depending on the data normality.

All statistical tests were performed using SPSS (version 29.0.1.1). Truncated violin plots were generated with GraphPad Prism (version 10.4.1).

4. Results

To facilitate the comparison of results between the fixatives, all descriptive statistics, Dice coefficients and correlations are summarized in Table 3 at the end of the Results section. The results of ANOVAs or Kruskal-Wallis tests are detailed in their respective sections for each variable.

4.1 Total cell surface

Using the manual segmentation method, the mean total cell surface was 4 836 ± 1 164 μm^2 in NBF-fixed specimens, 5 268 ± 910 μm^2 in SSS-fixed specimens, and 5 033 ± 706 μm^2 in AFS-fixed specimens. An ANOVA showed that the manually-measured total cell surface was not significantly different between the three fixative groups ($F_{2;24} = 0.471$; $p = 0.630$; $\eta^2_p = 0.038$) (Figure 1A).

Using the automatic segmentation method, the mean total cell surface was 5 240 ± 607 μm^2 in NBF-fixed specimens, 5 506 ± 658 μm^2 in SSS-fixed specimens, and 5 216 ± 574 μm^2 in AFS-fixed specimens. An ANOVA showed that the automatically-measured total cell surface was not significantly different between the three fixative groups ($F_{2;24} = 0.618$; $p = 0.547$; $\eta^2_p = 0.049$) (Figure 1B).

Across all three fixatives, the Dice coefficient between the manual and automatic total cell surfaces showed a pixel alignment of 0.92. The Dice coefficient was 0.89 for NBF-fixed specimens, 0.93 for SSS-fixed specimens, and 0.95 for AFS-fixed specimens. There was a significant Pearson correlation between the manual and automatic total cell surfaces ($r = 0.867$; $p < 0.001$). Within each fixative group, these correlations were significant for NBF-fixed specimens ($r = 0.849$; $p = 0.004$), SSS-fixed specimens ($r = 0.904$; $p < 0.001$), and AFS-fixed specimens ($r = 0.911$; $p < 0.001$).

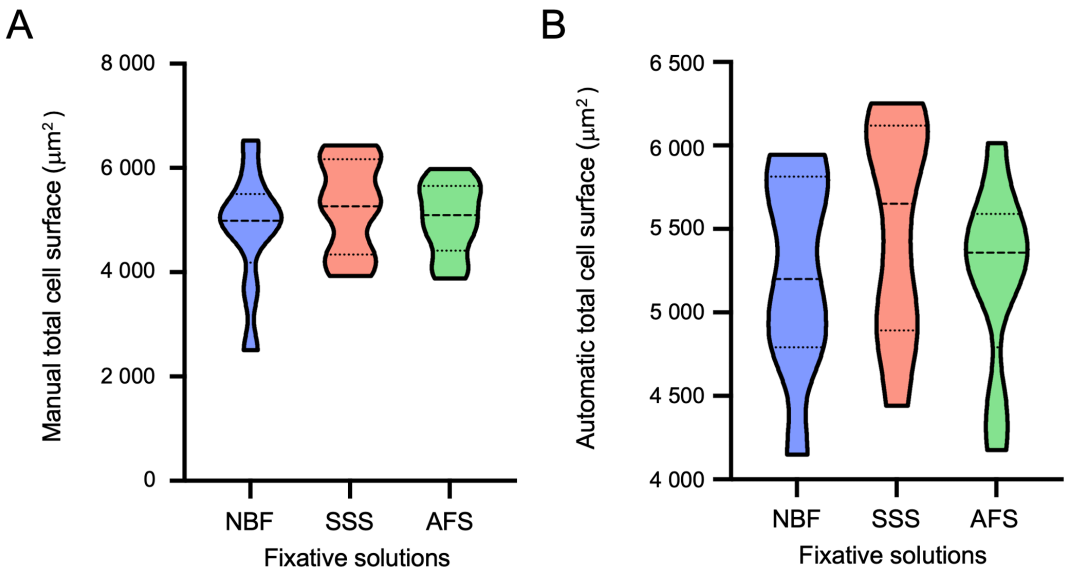


Figure 1. – **Violin plots of the total cell surfaces in all three fixative solutions**. Manually-segmented total cell surfaces (A). Automatically-segmented total cell surfaces (B). µm = microns; NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.2 Individual cell surface

Using the manual segmentation, the median individual cell surface was 73.3 µm² (range: 35.0-158.0 µm²) in NBF-fixed specimens, 78.2 µm² (range: 27.0-189.0 µm²) in SSS-fixed specimens, and 74.8 µm² (range: 26.0-164.0 µm²) in AFS-fixed specimens. The manually-segmented individual cell surface was not significantly different between the three fixative groups (Kruskal-Wallis $H(2) = 4.510$; $p = 0.105$) (Figure 2A).

When the manual segmentation was applied, it produced an intra-rater variability (AGL-1 vs AGL-2; N=8) with an ICC value of 0.889 [0.772-0.936], which shows a good to excellent level of reliability. The inter-rater variability (mean of AGL-1 and AGL-2 vs JM; N=8) produced an ICC value of 0.686 [0.028-0.873], which shows an overall moderate reliability.

Using the automatic segmentation method, the median individual cell surface was 89.6 µm² (range: 36.0-342.4 µm²) in NBF-fixed specimens, 97.6 µm² (range: 34.0-756.9 µm²) in SSS-fixed specimens, and 88.3 µm² (range: 32.9-633.8 µm²) in AFS-fixed specimens. The automatically-segmented individual cell surface was not significantly different between the three fixative groups (Kruskal-Wallis $H(2) = 4.957$; $p = 0.084$) (Figure 2B).

The mean Dice coefficient for all three groups showed a pixel alignment between the manual and automatic individual cells of 0.81. Per solution, the mean Dice coefficients were 0.79 for NBF-fixed specimens, 0.81 for SSS-fixed specimens, and 0.83 for AFS-fixed specimens. Moreover, there was a significant Spearman correlation between the manual and automatic individual cell surfaces ($r_s = 0.454$; $p < 0.001$). The correlations were also significant within each fixative group ($r_s = 0.363$; $p < 0.001$ for NBF-fixed specimens, $r_s = 0.434$; $p < 0.001$ for SSS-fixed specimens, and $r_s = 0.550$; $p < 0.001$ for AFS-fixed specimens).

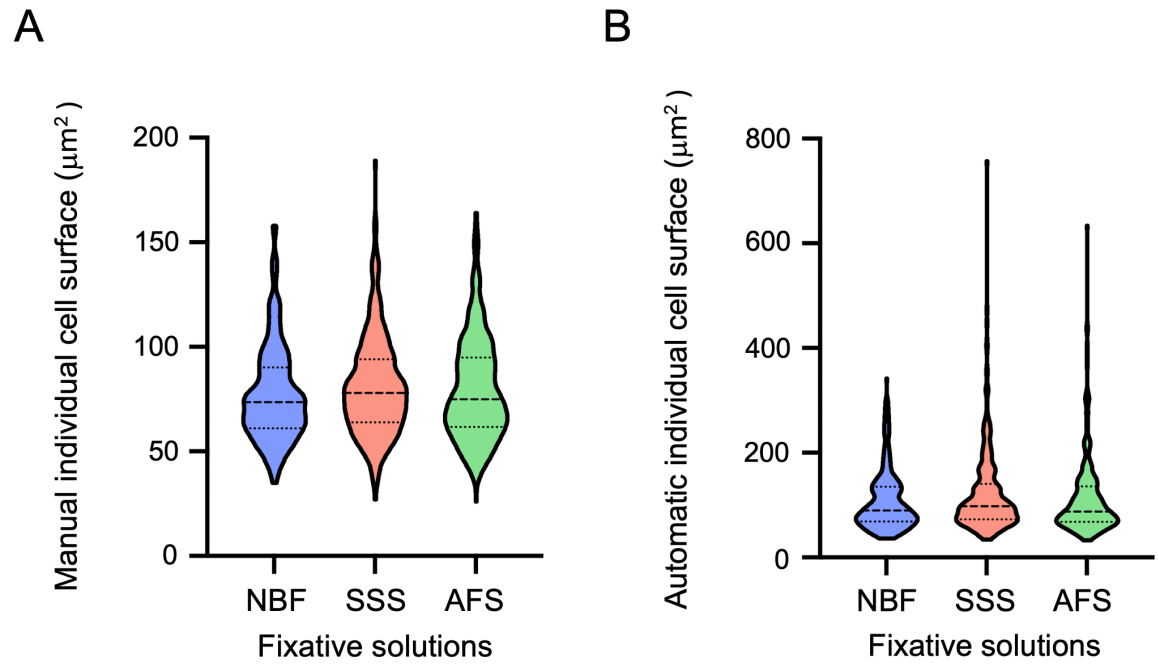


Figure 2. – **Violin plots of the individual cell surfaces in all three fixative solutions**. Manually-segmented individual cell surfaces (A). Automatically-segmented individual cell surfaces (B). µm = microns; NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.3 Cell counts

4.3.1 Total cell count

The mean total cell count per specimen was 87.56 ± 18.77 neurons in NBF-fixed specimens, 80.00 ± 13.39 neurons in SSS-fixed specimens, and 82.81 ± 12.30 neurons in AFS-fixed specimens. The total cell count was not significantly different between the three fixative groups ($F_{2;24} = 131.269$; $p = 0.569$; $\eta^2_p = 0.046$) (Figure 3A).

4.3.2 In-focus and out-of-focus cell counts

The mean number of in-focus cells per specimen was 23.81 ± 7.25 neurons in NBF-fixed specimens, 30.19 ± 4.71 neurons in SSS-fixed specimens, and 33.07 ± 5.87 neurons in AFS-fixed specimens. An ANOVA showed that the number of in-focus cells significantly differed between the three fixative groups ($F_{2;24}$ = 5.549; p = 0.010; η^2_p = 0.316) (Figure 3B). The NBF-fixed specimens had a lower number of in-focus cells when compared with those fixed with the SSS (p = 0.035) and the AFS (p = 0.003). There was no difference between the number of in-focus cells in SSS- and AFS-fixed specimens (p = 0.320).

The mean number of out-of-focus cells per specimen was 63.74 ± 16.80 neurons in NBF-fixed specimens, 49.81 ± 9.25 neurons in SSS-fixed specimens, and 49.74 ± 8.95 neurons in AFS-fixed specimens. An ANOVA showed that the out-of-focus cell numbers significantly differed between the three fixative groups ($F_{2;24}$ = 3.919; p = 0.034; η^2_p = 0.246) (Figure 3C). The NBF-fixed specimens had a higher number of out-of-focus cells when compared with those fixed with the SSS (p = 0.024) and the AFS (p = 0.023). Conversely, there was no significant difference between the number of out-of-focus cells in SSS- and AFS-fixed specimens (p = 0.990).

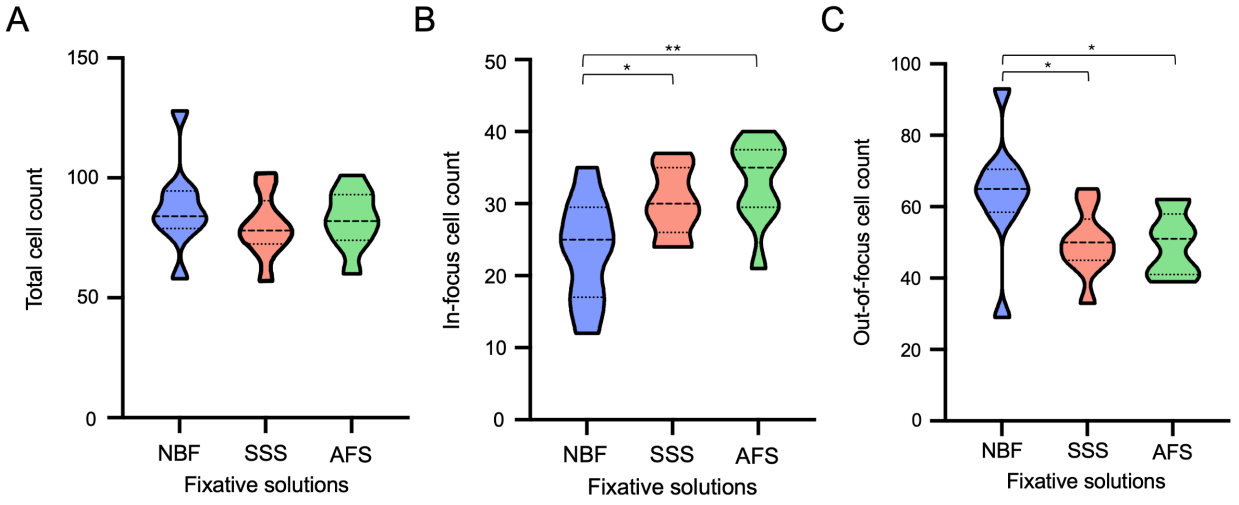


Figure 3. – **Violin plots of the cell counts in all three fixative solutions**. Total cell count (A). In-focus cell count (B). Out-of-focus cell count (C). µm = microns; NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001

4.4 Cell diameters

4.4.1 Large diameters

Using the manual method, the median large diameter was 11.56 μm (range: 7.73-22.49 μm) in NBF-fixed specimens, 11.97 μm (range: 6.83-22.38 μm) in SSS-fixed specimens, and 11.96 μm (range: 5.99-24.75 μm) in AFS-fixed specimens. The manually-measured large diameters were significantly different between the cells fixed by the three solutions (Kruskal-Wallis $H(2) = 9.165$; $p = 0.010$) (Figure 4A). We found that the NBF-fixed cells had significantly smaller large diameters than the SSS- ($p = 0.004$) and the AFS-fixed cells ($p = 0.020$). Furthermore, although both the SSS- and the AFS-fixed specimens had cells with larger large diameters than the NBF-fixed specimens, they were not significantly different from each other ($p = 0.607$).

Using the automatic method, the median large diameter was 13.42 μm (range: 7.71-27.23 μm) in NBF-fixed specimens, 13.69 μm (range: 7.24-41.65 μm) in SSS-fixed specimens, and 13.37 μm (range: 7.81-36.48 μm) in AFS-fixed specimens. The automatically-measured large diameters were not significantly different between the cells fixed by the three solutions (Kruskal-Wallis $H(2) = 1.605$; $p = 0.448$) (Figure 4D).

There was a significant Spearman correlation between the manually- and automatically-measured large diameters ($r_s = 0.382$; $p < 0.001$). The correlations were also significant within each fixative group ($r_s = 0.302$; $p < 0.001$ for NBF-fixed specimens, $r_s = 0.380$; $p < 0.001$ for SSS-fixed specimens, and $r_s = 0.455$; $p < 0.001$ for AFS-fixed specimens).

4.4.2 Small diameters

Using the manual method, the median small diameters were 9.06 μm (range: 4.74-14.58 μm) in NBF-fixed specimens, 9.02 μm (range: 4.54-15.96 μm) in SSS-fixed specimens, and 9.06 μm (range: 5.05-14.95 μm) in AFS-fixed specimens. The manually-measured small diameters were not significantly different between the cells fixed by the three solutions (Kruskal-Wallis $H(2) = 1.355$; $p = 0.508$) (Figure 4B).

Using the automatic method, the median small diameters were 9.50 μm (range: 5.36-18.72 μm) in NBF-fixed specimens, 9.95 μm (range: 5.14-28.84 μm) in SSS-fixed specimens, and 9.36 μm (range: 4.93-25.91 μm) in AFS-fixed specimens. The automatically-measured small diameters

were significantly different between the cells fixed by the three solutions (Kruskal-Wallis $H(2) = 12.894$; $p = 0.002$) (Figure 4E). The small diameters of cells fixed with the SSS were larger than those fixed with the NBF ($p = 0.007$) and the AFS ($p < 0.001$). There was no significant difference between the NBF- and AFS-fixed specimens ($p = 0.497$).

There was a significant Spearman correlation between the small diameters measured manually and automatically ($r_s = 0.438$; $p < 0.001$). The correlations were also significant within each fixative group ($r_s = 0.354$; $p < 0.001$ for NBF-fixed specimens, $r_s = 0.433$; $p < 0.001$ for SSS-fixed specimens, and $r_s = 0.525$; $p < 0.001$ for AFS-fixed specimens).

4.4.3 Cell circularity ratios

Using the manually-measured cell diameters, the median circularity ratio was 0.77 (range: 0.44-1.00) in NBF-fixed specimens, 0.76 (range: 0.39-0.99) in SSS-fixed specimens, and 0.77 (range: 0.38-0.99) in AFS-fixed specimens. The ratios did not differ significantly between the three fixative solutions (Kruskal-Wallis $H(2) = 2.838$; $p = 0.242$) (Figure 4C).

Using the automatically-measured cell diameters, the median circularity ratio was 0.72 (range: 0.38-0.99) in NBF-fixed specimens, 0.73 (range: 0.35-1.00) in SSS-fixed specimens, and 0.70 (range: 0.36-0.99) in AFS-fixed specimens. The ratios differed significantly between the three fixative solutions (Kruskal-Wallis $H(2) = 6.358$; $p = 0.042$) (Figure 4F). The circularity ratios were slightly higher for the cells in tissue fixed with the SSS than they were in tissue fixed with the AFS ($p = 0.014$). This difference remained after a Bonferroni correction ($p = 0.041$). There were no other differences between the fixatives.

Finally, there was a significant Spearman correlation between the circularity ratios measured from the manual and automatic diameters ($r_s = 0.424$; $p < 0.001$). The correlations were also significant within each fixative group ($r_s = 0.311$; $p < 0.001$ for NBF-fixed specimens, $r_s = 0.424$; $p < 0.001$ for SSS-fixed specimens, and $r_s = 0.528$; $p < 0.001$ in AFS-fixed specimens).

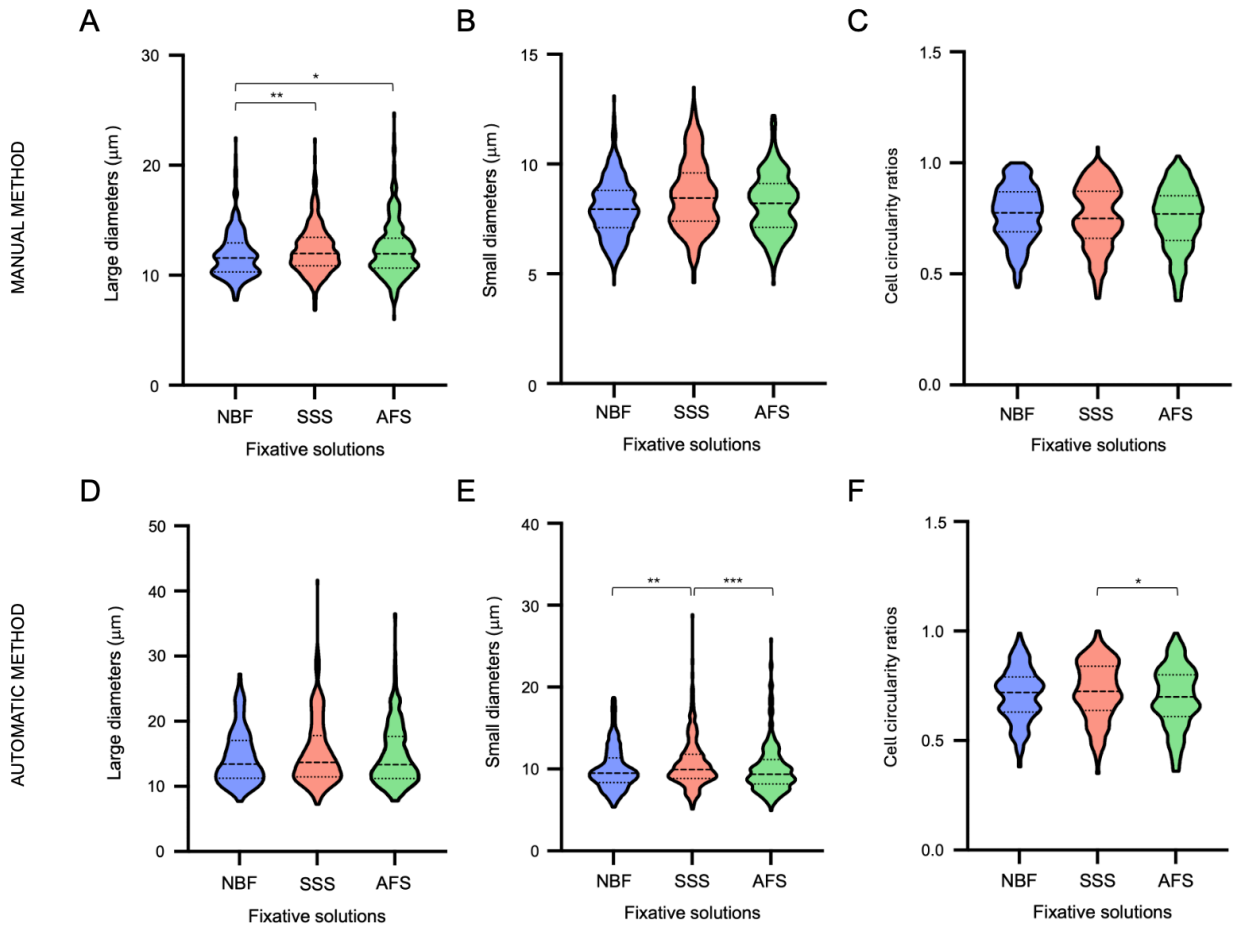


Figure 4. – **Violin plots of the cell diameters in all three fixative solutions**. Manually-measured large diameters (A). Manually-measured small diameters (B). Cell circularity ratios obtained from the manual diameters (C). Automatically-measured large diameters (D). Automatically-measured small diameters (E). Cell circularity ratios obtained from the automatic diameters (F). µm = microns; NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

		NBF		SSS		AFS	
		Manual	Automatic	Manual	Automatic	Manual	Automatic
Total cell surface (μm^2)	Mean	4 836	5 240	5 268	5 506	5 032	5 216
	SD	1 164	607	910	658	706	574
	Median	4 991	5 200	5 263	5 651	5 093	5 358
	Range	2 505 - 6 526	4 148 - 5 945	3 928 - 6 432	4 442 - 6 252	3 881 - 5 979	4 176 - 6 014
	Dice coefficient	0.89		0.93		0.95	
		0.92					
	Pearson correlation	$r = 0.849$; $p = 0.004$		$r = 0.904$; $p < 0.001$		$r = 0.911$; $p < 0.001$	
		$r = 0.867$; $p < 0.001$					
Individual cell surface (μm^2)	Mean	77.2	108.0	81.0	122.3	79.7	113.4
	SD	23.0	57.8	24.0	81.4	24.7	75.7
	Median	73.3	89.6	78.2	97.6	74.8	88.3
	Range	35.0 - 158.0	36.0 - 342.4	27.0 - 189.0	34.0 - 756.9	26.0 - 164.0	32.9 - 633.8
	Dice coefficient	0.79		0.81		0.83	
		0.81					
	Spearman correlation	$r_s = 0.363$; $p < 0.001$		$r_s = 0.434$; $p < 0.001$		$r_s = 0.550$; $p < 0.001$	
		$r_s = 0.454$; $p < 0.001$					
Total cell count	Mean	88	NA	80	NA	83	NA
	SD	19		13		12	
	Median	84		78		82	
	Range	58 - 128		57 - 102		60 - 101	
In-focus cell count	Mean	24	NA	30	NA	33	NA
	SD	7		5		6	
	Median	25		30		35	
	Range	12 - 35		24 - 37		21 - 40	

Out-of-focus cell count	Mean	64	NA	50	NA	50	NA
	SD	17		9		9	
	Median	65		50		51	
	Range	29 - 93		33 - 65		39 - 62	
Large diameters (μm)	Mean	11.86	14.50	12.30	15.23	12.35	14.84
	SD	2.20	4.21	2.21	5.14	2.62	4.80
	Median	11.56	13.42	11.97	13.69	11.96	13.37
	Range	7.73 - 22.49	7.71 - 27.23	6.83 - 22.38	7.24 - 41.65	5.99 - 24.75	7.81 - 36.48
	Spearman correlation	$r_s = 0.302$; $p < 0.001$		$r_s = 0.380$; $p < 0.001$		$r_s = 0.455$; $p < 0.001$	
		$r_s = 0.382$; $p < 0.001$					
Small diameters (μm)	Mean	9.02	10.04	9.18	10.69	9.01	10.04
	SD	1.59	2.62	1.80	3.08	1.68	3.11
	Median	9.06	9.50	9.02	9.95	9.06	9.36
	Range	4.74 - 14.58	5.36 - 18.72	4.54 - 15.96	5.14 - 28.84	5.05 - 14.95	4.93 - 25.91
	Spearman correlation	$r_s = 0.354$; $p < 0.001$		$r_s = 0.433$; $p < 0.001$		$r_s = 0.525$; $p < 0.001$	
		$r_s = 0.438$; $p < 0.001$					
Circularity ratios	Mean	0.77	0.71	0.76	0.73	0.75	0.70
	SD	0.13	0.12	0.14	0.13	0.14	0.14
	Median	0.77	0.72	0.75	0.73	0.77	0.70
	Range	0.44 - 1.00	0.38 - 0.99	0.39 - 0.99	0.35 - 1.00	0.38 - 0.99	0.36 - 0.99
	Spearman correlation	$r_s = 0.311$; $p < 0.001$		$r_s = 0.424$; $p < 0.001$		$r_s = 0.528$; $p < 0.001$	
		$r_s = 0.424$; $p < 0.001$					

Table 3. – **Summary of the descriptive statistics for each fixative**. Surfaces are reported in square microns. Diameters are reported in microns. NBF = neutral-buffered formalin; SSS = saturated salt solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution; SD = standard deviation; r = Pearson correlation coefficient; r_s = Spearman correlation coefficient; NA = not applicable

5. Discussion

In this study, we evaluated the impact of three different fixative solutions on the quantitative analysis of neurons in the primary motor cortex of mice. Our goal was to determine whether the solutions used in human gross anatomy laboratories (i.e., the SSS and AFS) impacted the nervous tissue in a similar or idiosyncratic manner when compared to the NBF solution commonly used in brain banks.

5.1 Quantitative variables

5.1.1 Cell surfaces and total cell count

We first quantified the total cell surface, by segmenting all the cells in every ROI. This showed us the overall proportion of surface occupied by neurons in the same geometrical area. This variable is important to assess whether the fixation of the brain tissue and the following histology treatment had a similar or idiosyncratic impact on the tissue shrinkage or expansion in brains fixed by all three solutions. However, individually, this variable is not sufficient to conclude on the impact of the solutions on the volume of cells. The total volume could be affected by the individual volume of cells and their total number, which is why these variables were interpreted along with the total cell surface.

Initially, the hypothesis was that NBF-fixed specimens would have a lower cell surface because of the high concentration of formaldehyde in its composition, which is known to cause brain shrinkage (Mouritzen Dam, 1979). We also expected the AFS-fixed specimens to render larger cell surfaces than the other two solutions, since it was observed in a previous experiment that mounted sections of AFS-fixed mouse brains were larger than those of NBF- and SSS-fixed brains (Figure 5) (Frigon et al., 2022a)

In reality, the results showed that the total cell surface per ROI as well as the individual cell surface were not different between the three fixative solutions, thereby invalidating the initial hypotheses. We instead surmise that the high concentration of alcohol in the compositions of the SSS and AFS might shrink the tissue and its cells in a similar manner as the NBF. Indeed, ethanol is also known to dehydrate tissues and diminish the volume of many organs, including the brain (Boon & Kok, 2008; Fox et al., 1985).

Concerning the second hypothesis mentioned, the results seem to indicate that the larger section surface of AFS-fixed brains is not related to the size of cortical neurons. Since the total and individual cell surfaces were not different between the three fixative solutions, we surmised that there might be a difference in the surface of the neuropil. If it were affected independently from the cells, its volume could increase or decrease following fixation, impacting the number of neurons per ROI. However, our results suggest that it is not the case, seeing as the total number of labeled neurons was also not different between the solutions. The observation concerning the larger surface of AFS-fixed brain sections might then not be related to the impact of the fixation on the size of cortical structures, as was studied here. Instead, it might be related to the surface occupied by subcortical structures and/or deep white matter, which might expand after fixation with AFS and explain the larger surfaces of sections. This hypothesis would be consistent with the previous evidence that fixation causes more shrinkage and deformation in white matter as compared to gray matter (Gros et al., 2023). This was not tested within the confines of this study since all ROIs are exclusively cortical.

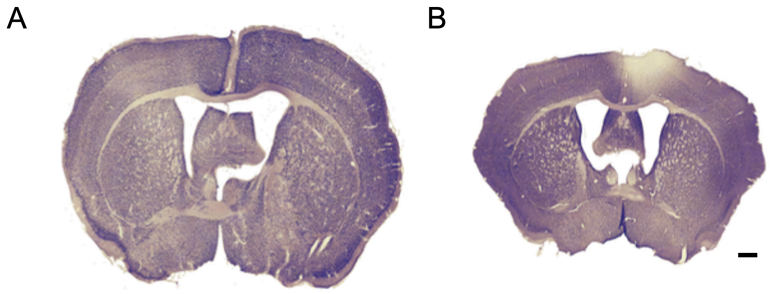


Figure 5. - **Mounted sections of fixed mouse brains**. A) AFS-fixed section. B) NBF-fixed section. Scalebar = 500 μm.

5.1.2 In-focus and out-of-focus cell counts

The purpose of distinguishing between in-focus and out-of-focus cells was to consider the three-dimensionality of the cells and the penetration of antibodies. This allowed us to indirectly assess the size of the cells. Indeed, our hypothesis is that larger cells would generate a higher in-focus cell count, whereas smaller cells would instead generate a lower in-focus cell count.

We initially expected AFS-fixed specimens to show more in-focus cells and less out-of-focus cells due to the observation concerning the larger surface of mounted AFS-fixed sections. Since there was no difference in cellular surface or in the total neuronal count in spite of the larger size of AFS-fixed brains, this hypothesis was invalidated. In reality, our findings showed that the number of in-

focus cells was significantly lower in NBF-fixed specimens as compared to both SSS- and AFS-fixed specimens. This difference was not present between the SSS- and AFS-fixed specimens. Conversely, the number of out-of-focus cells was significantly higher in NBF-fixed specimens as compared to both SSS- and AFS-fixed specimens, but there was no difference between the SSS- and AFS-fixed specimens. These results might be explained by two hypotheses that will be discussed in the following paragraphs: 1) the size of the cells, or 2) the penetration of antibodies.

Concerning the first hypothesis, the lower number of in-focus cells and the higher number of out-of-focus cells that were found in NBF-fixed brains might indicate smaller cells. Indeed, a smaller cell would be more likely to be excluded in the level of thickness in which the photomicrographs were taken. The presence of higher levels of formaldehyde in the NBF solution would explain this finding, given that formaldehyde is known to decrease the volume and increase the rigidity of the cadaver as a whole (Balta et al., 2015; Barton et al., 2009; Brenner, 2014; Eisma et al., 2013; Eisma et al., 2011; Frigon et al., 2022b; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016; Jaung et al., 2011; Mayer, 2006; Regelsberger et al., 2015; Richins et al., 1963; Tomalty et al., 2019; Weisbecker, 2012). Inversely, we expected larger cells in the SSS- and AFS-fixed brains owing to their lower formaldehyde content (Benet et al., 2014; Coleman & Kogan, 1998), thus limiting the usual shrinkage. However, the results from the cell surfaces showed that the resulting shrinkage was comparable between the three fixative solutions, therefore overturning this first hypothesis.

Concerning the second hypothesis, an incomplete penetration of antibodies throughout the full thickness of the sections would result in blurry labeling of cells visualized in the middle image and in a lower number of in-focus cell profiles therein. This would coincide with the results from a past study of our group, reporting an incomplete penetration of NeuN antibodies in some NBF-fixed specimens (Frigon et al., 2022b). There is a higher concentration of formaldehyde in the NBF solution as compared with the two solutions from gross anatomy laboratories. Consequently, the greater cross-linking of proteins might mask the NeuN epitopes and hinder their detection. Furthermore, the SSS and AFS solutions contain high levels of alcohol. Since methanol is known to permeabilize membranes and therefore facilitate the passage of antibodies through the cell membrane (Yuan et al., 2017), a similar process might also be true for the isopropyl alcohol and ethanol present in the SSS and AFS (Frigon et al., 2022b). The permeabilization would then be more advanced in the specimens fixed by these solutions as compared to those fixed by the NBF,

which would explain the poorer penetration of antibodies and the blurry contours of the neurons in the middle images of NBF-fixed specimens.

5.1.3 Cell diameters and circularity ratios

Finally, we measured the cell diameters of ten randomly-selected neurons per ROI, differentiating between the large diameters and the small diameters. This can be coupled with the individual cell surface to assess the impact of the fixative on the cell size. Based on these diameters, we also calculated circularity ratios to find out more about the neuronal morphology.

Although we initially expected a smaller cell size in NBF-fixed brains due to the high formaldehyde content, the results did not support this. The small diameters were not significantly different between the three solutions. However, the NBF-fixed neurons had significantly smaller large diameters than the tissue fixed by the two gross anatomy solutions. If the large diameters are smaller, then the cell possesses a rounder shape when compared to the more elongated form of SSS- and AFS-fixed neurons. This would point to a difference in cell morphology. This might, once again, be explained by the higher levels of formaldehyde in the NBF solution, as it would shrink the brain equally in all three planes (x, y, and z axes).

However, the difference between the large diameters were less than a half-micron (11.56 vs 11.97 vs 11.96 μm). While this might be statistically significant according to the Kruskal-Wallis test, the significance on a biological level represents only 3 to 4% of the cell diameter. Moreover, there was no difference between the individual surfaces of cells between the three solutions. If the large diameter was indeed smaller, the cell size would also be smaller. The same goes for the circularity ratios, which were not different between the solutions.

Taking all this into account, the difference detected in the large neuronal diameters is not overly concerning for the use of the brains fixed by the gross anatomy solutions.

5.2 Automatic software

5.2.1 Total cell surface

The comparison between the manual and automatic segmentation procedures showed a strong Dice coefficient (0.92) and a moderate correlation coefficient (0.532). This indicates an overall good agreement between the methods. In most cases (20 out of 27), the automatic segmentation generated higher surface area values than the manual segmentation. This implies an

oversegmentation of the automatic detection method. This is largely due to darker backgrounds, as shown in the upper half of Figure 6. However, the oversegmentations in most cases are more subtle than the ones shown in the Figure, usually coming from a falsely-segmented, darker circle around the cells. This indicates a difference in the way to deal with the partial volume present at the borders between the cell profiles and the background. Although the automatic detection software segments a little more around the cells, the results are still similar enough to give good agreement between the manual and automatic methods and to detect the same differences between the three fixative groups. Furthermore, of the 7 cases in which the automatic segmentation generated lower values, 3 were NBF-fixed specimens, 2 were SSS-fixed specimens and 2 were AFS-fixed specimens. Observations of these specimens highlighted the undersegmentation of the automatic method when the cells were very pale compared to the rest of the cells (lower half of Figure 6). However, even with these segmentation issues in a few specimens, the automatic method was once again able to detect the same differences, or the lack thereof, between the three groups. Therefore, the automatic method is sufficiently accurate to be used on its own to segment the total cell surface of fixed mouse specimens.

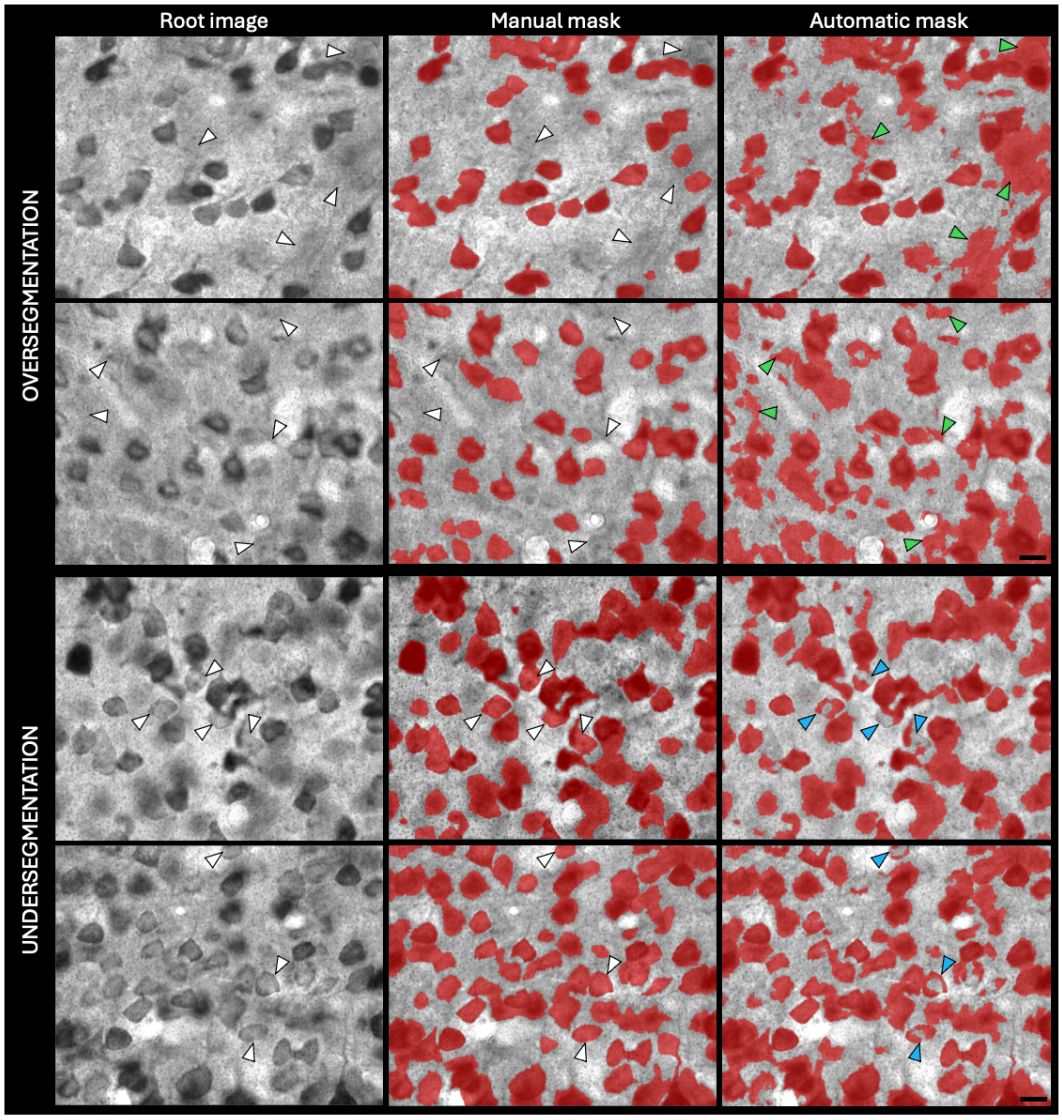


Figure 6. - **Segmentation errors of the automatic method for the total cell surface**. White arrowheads point to the regions affected by the segmentation errors in the root images and manual masks. Green and blue arrowheads respectively point to the oversegmentation and undersegmentation errors on the automatic masks. All specimens shown here are NBF-fixed. Scalebar = 10 μm.

5.2.2 Individual cell surface

As for the automatic method for the individual cell surfaces, it was found to be less accurate than the automatic segmentation of the total cell surface. The Dice coefficient (0.81) and the Spearman correlation coefficient (0.454) applied to compare the manual and automatic results in individual cells were lower than the Dice and correlation coefficients calculated for the total cell surface. Nonetheless, a Dice coefficient over 0.8 is generally considered to reflect a high accuracy in pixel

alignment. Moreover, the correlation coefficient is over 0.4, which reflects a strong relationship between the manual and automatic results. By examining the coefficients in each solution separately, we found that the NBF-fixed specimens showed a lower correlation coefficient than the other two solutions.

This is in line with the observations made for the total cell surface segmentation, where it was observed that the biggest segmentation errors of the automatic method had been made in NBF-fixed specimens. The biggest oversegmentations of the total cell surface happened in two NBF-fixed specimens with heterogeneous and dark backgrounds. Inversely, the few cases of undersegmentation of the automatic method also happened mostly in NBF-fixed specimens because of the presence of faintly-labeled cells.

As for the automatic segmentation of the individual cell surface, the observations showed a similar result. Individual cells with a weaker labeling and/or heterogeneous backgrounds generated segmentation errors in the automatic method. Overall, these segmentation errors made by the automatic method did not influence the results disproportionately, apart from a few cells. Both the manual and automatic methods were able to reach the same conclusion with regards to the dearth of difference between fixative solutions. Moreover, automatic segmentations can be easily corrected by a manual rater in cases with bigger false negatives or positives. This would still ensure a quicker processing than with a completely manual method.

5.2.3 Cell diameters

Whereas the manually-measured large diameters were different across the three groups, the automatically-measured large diameters showed no such difference. The Spearman correlation coefficient was below 0.4, which denotes a moderate relationship between the two methods. It was mentioned earlier that the automatic method oversegmented in cases with darker background spots and undersegmented in certain cases where the cells exhibited pale or weak labeling. This was mostly observed in NBF-fixed specimens. When considering the correlations for each solution separately, the coefficient was also lower in NBF-fixed specimens. Taking this into account, we believe the automatic measures of diameters are deeply affected by the heterogeneity of labeling intensity. Thus, the automatic method might still be lacking in precision for measuring cell diameters, especially in specimens with heterogeneous labeling.

Moreover, the automatically-measured small diameters were greater in neurons fixed with the SSS than with the other two solutions. This difference was not detected in the manually-measured small diameters. Here, the global Spearman correlation coefficient was higher than 0.4, but it was still lower in NBF-fixed specimens when considering the solutions separately. Results from a past study of our group showed that SSS-fixed specimens had darker backgrounds (Frigon et al., 2022b), which might have confounded the automatic detection of neuronal profiles. A darker background increases the risks of false positives when classifying between background and cells. The diameters would then be falsely larger when measured via the automatic method. However, this hypothesis would be more likely if both the large and small diameters of SSS-fixed specimens had been similarly affected. Upon visual observations of the segmented images, the length of large diameters is often increased by the automatic segmentation of the axon hillock and the proximal portion of the axon. The NeuN antibody can stain some proximal processes (Wolf et al., 1996), but we have noticed that this is very variable from one neuron to another. The presence of labeled axon hillocks and proximal portions of the axon was more often seen in SSS-fixed specimens compared to the other specimens, which might explain why the automatic large diameters were larger. Since their presence would only impact the length of the cell measured for the large diameters, it would also explain why the small diameters don't seem to be affected in SSS-fixed specimens.

5.2.4 Circularity ratios

Finally, the ratios calculated with the manual diameters were not different between the three solutions. The automatic detection of diameters produced higher ratios for the SSS-fixed specimens than the AFS-fixed specimens. This would indicate a more circular morphology for the SSS-fixed cells, although it is unnoticeable upon visual observation. The slight difference in microns between the specimens is too small for the human eye to notice without the help of statistics. The Spearman correlation between both methods generated a coefficient higher than 0.4, denoting a strong relationship. Considering the aforementioned imprecisions of the automatic methods when dealing with histology artefacts or heterogeneous labeling, the manual results are more robust, especially in the case of cell diameters.

5.3 Study limits

Given the small sample size in this study (9 mice per fixative solution), the statistical power is not sufficient, therefore impeding the detection of significant differences between the three fixative

solutions. However, the magnitude of difference across mean values was overall small, so detecting a difference of a few microns might not be relevant for research projects looking for clear changes in cell numbers or size. A power analysis also showed that the total number of specimens needed to ensure the detection of a significant difference with a medium effect size was 269, which is simply unattainable.

Moreover, we could have assessed more quantitative variables or other antigens to compare the three fixatives. Instead, we chose to focus on the neuronal count and dimensions (surface and diameters) since neuronal loss and atrophy are closely related to the pathogenesis of neurodegenerative disorders (Agnello & Ciaccio, 2022; Hammer et al., 1979; Mezzapesa et al., 2013).

Furthermore, although digital stereology could have been used to compare the quantitative variables between fixative solutions (Kristiansen & Nyengaard, 2012; Mehrabi et al., 2018), applying these methods would have required more numerous and equidistant sections of the primary motor cortex. However, it is not applicable in SSS-fixed specimens in which many sections are lost due to their difficulty of manipulation (Frigon et al., 2022b). We therefore opted for a practical and less time-consuming option that would still allow for a comparison between the three groups. The ROI method allowed us to fulfill the goals of this study while still staying true to the basic sampling theory by using the different levels of thickness per slice, the multiple ROIs per specimen and the random method to select the cells to segment.

The ROIs were also analyzed only in one region (i.e., the primary motor cortex). Consequently, the effects on each variable might differ in other regions. However, this study design was chosen explicitly to reduce the number of variables and thus ensure comparability between the three groups.

Finally, there is a concern about the relevance of these results for a human application, which is the ultimate purpose of our research. Using mouse brains to test the properties of the fixative solutions before replicating the study on human brains might seem redundant or not transferable. However, it allows us to see how the brain tissue reacts to the solutions in optimal conditions without all the unavoidable confounding variables associated with human brains, such as the longer postmortem delay, fixation delay, comorbidities, and biological heterogeneity of donors, among others (Alkemade et al., 2023; Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024). While the comparability

of mice and humans is not the same, the study design with a single independent variable (type of fixative solution) would not be possible in humans.

6. Conclusion

We compared the effects of fixative solutions from gross anatomy laboratories on various quantitative variables on neurons in delimited regions of interest. We assessed the cell surface, the total number of neurons, and the cell diameters. Most variables showed no difference between the three fixatives tested, which supports the use of brains fixed with gross anatomy solutions in research. However, we found that the large diameters of cells fixed with the saturated salt solution and the alcohol-formaldehyde solution were significantly larger than in cells fixed with the classic neutral-buffered formalin. This might indicate a small difference in cell morphology that needs to be addressed before we can recommend the use of these solutions for quantitative research. On the other hand, they could presently be used as long as the fixative remains the same throughout the whole project.

Chapitre 4 – Résultats supplémentaires

Ce chapitre contient les résultats obtenus avec la méthode manuelle sur les coupes de tissu humain pour toutes les variables à l'étude. Cependant, la méthode automatique est encore en phase d'optimisation du CNN pour les images histologiques de tissu humain, alors les résultats automatiques pour les variables à l'étude ne sont pas disponibles pour le moment. Comme les résultats actuels concernant le tissu humain sont pertinents dans le but du présent projet, mais qu'ils sont actuellement incomplets, nous avons choisi de les rapporter quand même sous forme de résultats supplémentaires plutôt que sous forme d'article. Cela permettra l'inclusion de ces résultats dans la discussion générale du mémoire.

Afin de faciliter les comparaisons entre les solutions de fixation, un tableau récapitulatif (Tableau 4) des statistiques descriptives est donné en fin de section.

1. Matériel et méthodes

1.1 Population

Les cerveaux humains utilisés dans le présent projet proviennent du programme de don de corps mis en place au laboratoire d'anatomie de l'UQTR. De leur vivant, les donneurs ont fourni leur consentement pour autoriser l'accès à leur dossier médical et l'usage de leur corps dans le cadre d'activités de recherche et d'enseignement. Le protocole de cette étude a été approuvé par le sous-comité d'éthique du laboratoire d'enseignement et de recherche en anatomie (SCÉLERA). Un échantillon de convenance de 18 cerveaux a été utilisé lors de cette étude. Les informations concernant les spécimens utilisés sont rapportées au Tableau 3.

Fixateur	ID	Âge	Sexe	Cause du décès	IPM (heures)
SFA	1	61	M	Néoplasie pulmonaire métastatique	24.0
	2	53	M	Alzheimer	24.0
	3	85	M	Œdème pulmonaire	12.0
	4	84	F	Septicémie sur pyélonéphrite aigue	2.0
	5	74	M	Néoplasie pulmonaire	3.0
	6	89	F	Pneumonie	23.0
SSS	7	59	M	Dénutrition sévère	24.0
	8	83	M	Insuffisance cardiaque	20.0
	9	84	F	Infarctus du myocarde	60.0
	10	85	M	Néoplasie pulmonaire	16.5
	11	81	M	Cancer du côlon sigmoïde métastatique et occlusion	26.0
	12	78	M	Cholangiocarcinome	39.0
SA	13	64	F	Pneumonie et démence	15.5
	14	91	M	Insuffisance respiratoire, MPOC terminale et pneumonie d'aspiration	20.0
	15	80	F	Carcinomatose péritonéale	23.0
	16	80	M	Infarctus probable et sténose aortique sévère	30.0
	17	93	F	Cancer du côlon métastatique	6.0
	18	83	F	Cancer du pancréas	18.0

Tableau 3. – **Données relatives aux spécimens humains**. ID = identification du spécimen; IPM = intervalle post-mortem; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de

sel; SA = solution d'alcools; M = homme; F = femme; MPOC = maladie pulmonaire obstructive chronique

1.2 Fixation des corps

Tous les spécimens ont été fixés avec une des trois solutions à l'étude. Pour les cas fixés avec la SFA, les cerveaux ont été extraits frais et fixés par immersion dans quatre litres de solution. Ce protocole sert à imiter les procédures réalisées par les banques de cerveaux. Les cerveaux sont alors conservés dans la solution jusqu'à leur utilisation.

Pour les cas fixés avec la SSS ou la SA, une dissection de la région cervicale a été réalisée pour injecter en moyenne 25 litres de la solution de fixation dans l'artère carotide commune avec une pompe de 41 pKa (Duotronic III, Hygeco International Products). Ce protocole est celui couramment utilisé par les laboratoires d'anatomie (Maranzano et al., 2020). Après le délai de fixation du corps complet, les têtes ont pu être prélevées en réalisant une laminectomie au niveau des vertèbres C6/C7. Les têtes ont ensuite été scannées par résonance magnétique dans le cadre d'autres projets de notre groupe de recherche. Puis, les cerveaux ont été extraits pour procéder aux analyses supplémentaires *ex situ* par IRM et aux analyses histologiques du présent mémoire. Les cerveaux fixés avec la SSS ont été conservés en immersion dans leur solution jusqu'à leur utilisation. Les cerveaux fixés avec la SA ont plutôt été conservés dans l'éthanol 10% afin d'imiter les procédures mises en place par les laboratoires d'anatomie.

Tous les blocs de tissu (environ 1 cm^3) ont été prélevés dans la portion supérieure du gyrus précentral. Ils ont ensuite été coupés en tranches de 40 μm au cryostat avant leur traitement histologique.

1.3 Récupération des antigènes

Les coupes humaines ont été traitées avec un protocole de récupération des antigènes par la chaleur (section 2.2, chapitre 2). Le traitement consiste à incuber les coupes dans du tampon citrate 0.01M à pH 6 bouillant pendant 20 minutes, suivi d'un bain d'eau déminéralisée froide d'une durée de 10 minutes. Cette procédure est réalisée avant le protocole d'IHC pour libérer les épitopes cachés par la fixation avant l'exposition aux anticorps.

1.4 Immunohistochimie

Après leur traitement de récupération des antigènes, les coupes sont soumises à un protocole d'immunohistochimie ciblant la population générale des neurones avec l'anticorps NeuN (section 2.5, chapitre 2). Le protocole exact est décrit à la section 3.3 du chapitre 3, mais il est réalisé ici sur lame plutôt que par coupes flottantes. Les raisons de ce choix sont expliquées à la section 2.3 du chapitre 2.

1.5 Variables d'intérêt

Les variables analysées sont les mêmes que celles décrites précédemment chez la souris : 1) surface cellulaire totale, 2) surface cellulaire individuelle de 30 neurones, 3) nombre de neurones (total, au focus et hors-focus) et 4) diamètres cellulaires (larges, petits et ratios de circularité). Il s'en ajoute une dernière pour le tissu humain seulement : 5) nombre de ROIs acquises pour atteindre un nombre de 30 neurones par spécimen.

1.6 Analyse statistique

Pour les variables dont la distribution respectait la condition de normalité selon le test de Kolmogorov-Smirnov, les groupes ont été comparés avec une ANOVA à un facteur. Comme l'étude ne comprend que trois groupes de taille égale, le test post hoc de la plus petite différence significative de Fisher (LSD) a été employé pour interpréter les comparaisons multiples. Ce test a une meilleure puissance que les autres, ce qui diminue la fréquence des erreurs de type II (faux négatifs). Dans les cas où la distribution des valeurs n'était pas normale, les trois groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Toutes les analyses statistiques ont été accomplies sur le logiciel SPSS (version 29.0.1.1). Les graphiques ont été générés sur GraphPad Prism (version 10.4.1).

2. Résultats

Pour chacune des variables quantifiées, toutes les statistiques descriptives (moyenne, écart-type, médiane et étendue) ont été rapportées au Tableau 4.

		SFA	SSS	SA
Surface cellulaire totale (μm^2)	Moyenne	5 176	1 434	3 775
	Écart-type	2 416	511	2 240
	Médiane	4 843	1 461	3 282
	Étendue	2 218 - 9 620	770 - 2 158	1 580 - 6 972
Surface cellulaire individuelle (μm^2)	Moyenne	256.7	232.7	235.0
	Écart-type	159.3	123.8	144.6
	Médiane	218.2	209.3	203.2
	Étendue	56.4 - 1 079.8	65.2 - 833.5	38.7 - 907.4
Compte cellulaire total	Moyenne	17	6	18
	Écart-type	4	2	8
	Médiane	16	5	17
	Étendue	11 - 23	3 - 10	9 - 28
Compte des cellules au focus	Moyenne	6	2	7
	Écart-type	2	1	4
	Médiane	6	2	6
	Étendue	4 - 11	1 - 3	2 - 13
	Ratio F/T	0.37	0.37	0.35
Compte des cellules hors-focus	Moyenne	11	4	11
	Écart-type	3	2	4
	Médiane	11	3	12
	Étendue	6 - 14	2 - 7	7 - 15
	Ratio H-F/T	0.63	0.63	0.65
Grands diamètres (μm)	Moyenne	21.23	20.16	20.45
	Écart-type	6.69	5.75	6.77
	Médiane	19.95	19.10	18.93
	Étendue	10.20 - 52.13	10.66 - 46.99	8.02 - 42.69
Petits diamètres (μm)	Moyenne	13.47	12.17	12.36
	Écart-type	4.15	3.20	3.64
	Médiane	13.15	12.00	12.08

	Étendue	5.52 - 28.09	6.05 - 20.73	4.97 - 27.67
Ratio de circularité	Moyenne	0.65	0.63	0.63
	Écart-type	0.15	0.16	0.15
	Médiane	0.64	0.62	0.62
	Étendue	0.30 - 0.99	0.25 - 0.99	0.32 - 0.99
Nombre de ROIs	Moyenne	5	7	5
	Écart-type	0	2	0
	Médiane	5	7	5
	Étendue	5 - 5	5 - 9	5 - 5

Tableau 4. – **Comparaison des statistiques descriptives obtenues pour chaque variable quantitative entre les trois solutions de fixation**. SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; Ratio F/T = ratio cellules au focus/cellules totales; Ratio H-F/T = ratio cellules hors-focus/cellules totales; ROI = région d'intérêt

2.1 Quantification de la surface cellulaire totale

Il y avait une différence significative entre les trois solutions de fixation (Kruskal-Wallis $H(2) = 9.485$; $p = 0.009$) (Figure 9). La surface cellulaire totale des spécimens fixés par la SSS était significativement inférieure à celle des spécimens fixés par la SFA ($p = 0.002$) et la SA ($p = 0.045$). En revanche, il n'y avait aucune différence significative entre la surface cellulaire totale des spécimens fixés par la SFA et la SA ($p = 0.304$).

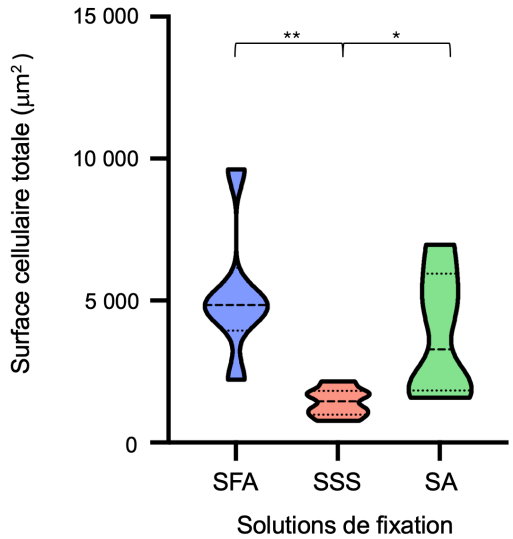


Figure 9. – **Représentation graphique de la surface cellulaire totale pour les trois solutions de fixation.** µm = microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

2.2 Quantification de la surface cellulaire individuelle

La surface cellulaire individuelle n'était pas significativement différente entre les trois solutions de fixation (Kruskal-Wallis $H(2) = 2.137$; $p = 0.343$) (Figure 10).

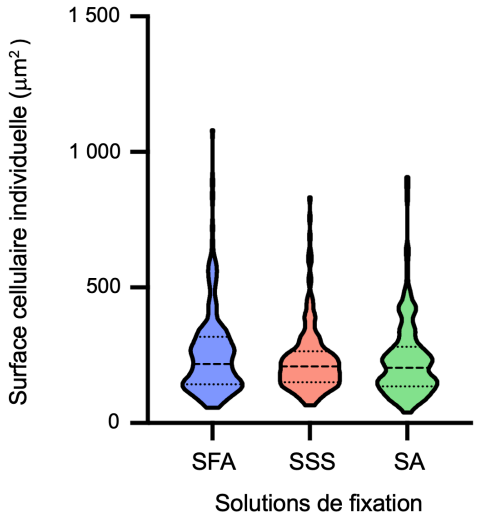


Figure 10. – **Représentation graphique de la surface cellulaire individuelle de 30 neurones par spécimen pour les trois solutions de fixation**. µm = microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

2.3 Quantification du nombre de neurones marqués

Il y avait une différence significative dans le nombre total de neurones marqués entre les trois solutions de fixation (ANOVA $F_{2;15} = 9.322$; $p = 0.002$; $\eta^2_p = 0.554$) (Figure 11A). Il y avait moins de neurones marqués dans les spécimens fixés avec la SSS que dans ceux fixés par la SFA ($p = 0.003$) et la SA ($p = 0.001$). Il n'y avait toutefois aucune différence significative entre le nombre total de neurones dans les spécimens fixés avec la SFA et la SA ($p = 0.746$).

Le nombre de cellules au focus par ROI était significativement différent entre les trois solutions de fixation (ANOVA $F_{2;15} = 4.904$; $p = 0.023$; $\eta^2_p = 0.395$) (Figure 11B). Il y avait significativement moins de cellules au focus dans les spécimens fixés avec la SSS que dans les spécimens fixés avec

la SFA (p = 0.021) et la SA (p = 0.013). Cette différence dans le nombre de cellules au focus n'apparaissait pas en comparant les spécimens fixés avec la SFA et la SA (p = 0.816).

Le nombre moyen de cellules hors-focus par ROI était significativement différent entre les trois solutions de fixation (ANOVA $F_{2;15} = 11.567$; $p < 0.001$; $\eta^2_p = 0.607$) (Figure 11C). Les spécimens fixés avec la SSS avaient significativement moins de cellules hors-focus que ceux fixés avec la SFA (p = 0.001) et la SA (p < 0.001). Il n'y avait aucune différence significative entre le nombre de cellules hors-focus des spécimens fixés par la SFA et la SA (p = 0.717).

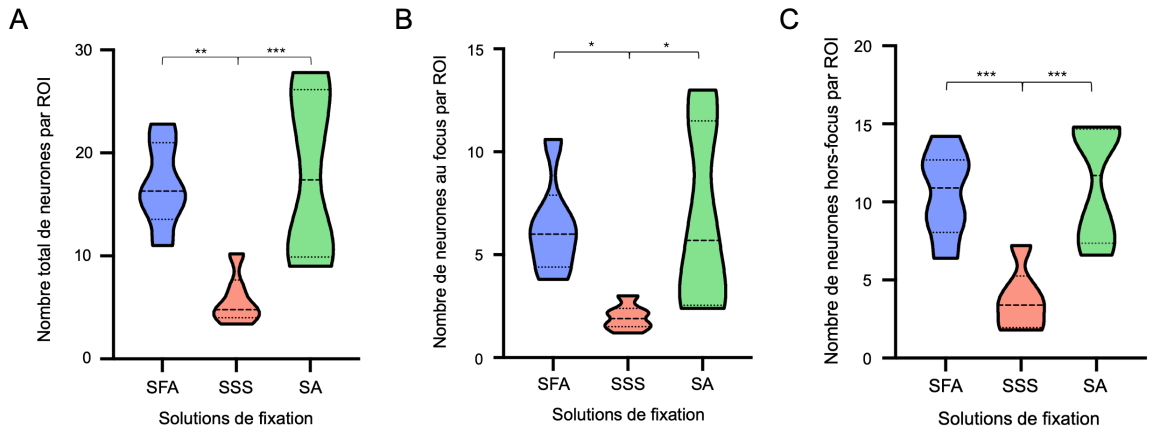


Figure 11. – **Représentation graphique du nombre de cellules marquées par ROI pour les trois solutions de fixation**. Nombre total de neurones par ROI (A). Nombre de neurones au focus par ROI (B). Nombre de neurones hors-focus par ROI (C). ROI = région d'intérêt; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001

Il faut noter que le nombre total de neurones était significativement inférieur dans les spécimens fixés avec la SSS. Ceci entraîne inévitablement un nombre inférieur de neurones au focus et hors-focus lorsqu'ils sont comparés avec les spécimens fixés par les deux autres solutions. Pour comparer ces variables dans les trois groupes malgré le nombre total différent de neurones, nous avons calculé des ratios.

En calculant le nombre de cellules au focus sur le nombre total de cellules par solution, le ratio est de 0.37 ± 0.09 pour les spécimens fixés avec la SFA, 0.37 ± 0.11 pour ceux fixés avec la SSS et 0.35 ± 0.09 pour ceux fixés avec la SA. Ces ratios n'étaient pas significativement différents entre les trois solutions de fixation (ANOVA $F_{2;15} = 0.149$; $p = 0.863$; $\eta^2_p = 0.020$) (Figure 12A).

En calculant le nombre de cellules hors-focus sur le nombre total de cellules par solution, le ratio est de 0.63 ± 0.09 pour les spécimens fixés avec la SFA, 0.63 ± 0.11 pour ceux fixés avec la SSS et 0.65 ± 0.09 pour ceux fixés avec la SA. Ces ratios n'étaient pas significativement différents entre les trois solutions de fixation (ANOVA $F_{2;15} = 0.149$; $p = 0.863$; $\eta^2_p = 0.020$) (Figure 12B).

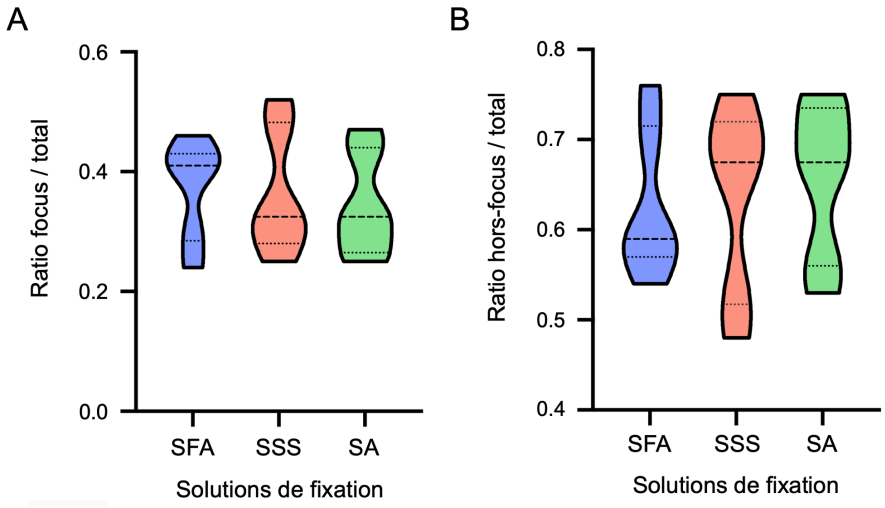


Figure 12. – **Représentation graphique des ratios de cellules au focus et hors-focus pour les trois solutions de fixation**. Ratio du nombre de cellules au focus sur le nombre total de cellules (A). Ratio du nombre de cellules hors-focus sur le nombre total de cellules (B). µm = microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

2.4 Quantification des diamètres cellulaires

Les grands diamètres neuronaux de 30 cellules par spécimen n'étaient pas significativement différents entre les trois solutions de fixation (Kruskal-Wallis $H(2) = 2.481$; $p = 0.289$) (Figure 13A).

Les petits diamètres de 30 cellules par spécimen étaient significativement différents entre les trois solutions de fixation (Kruskal-Wallis $H(2) = 9.612$; $p = 0.008$) (Figure 13B). Les petits diamètres étaient significativement plus grands chez les neurones des spécimens fixés avec la SFA que chez ceux fixés avec la SSS ($p = 0.005$) et la SA ($p = 0.011$). Cependant, il n'y avait aucune différence significative entre les petits diamètres des neurones des spécimens fixés avec la SSS et la SA ($p = 0.777$).

Il n'y avait pas de différence significative entre les ratios de circularité des trois groupes de fixateurs ($H(2) = 2.349$; $p = 0.309$) (Figure 13C).

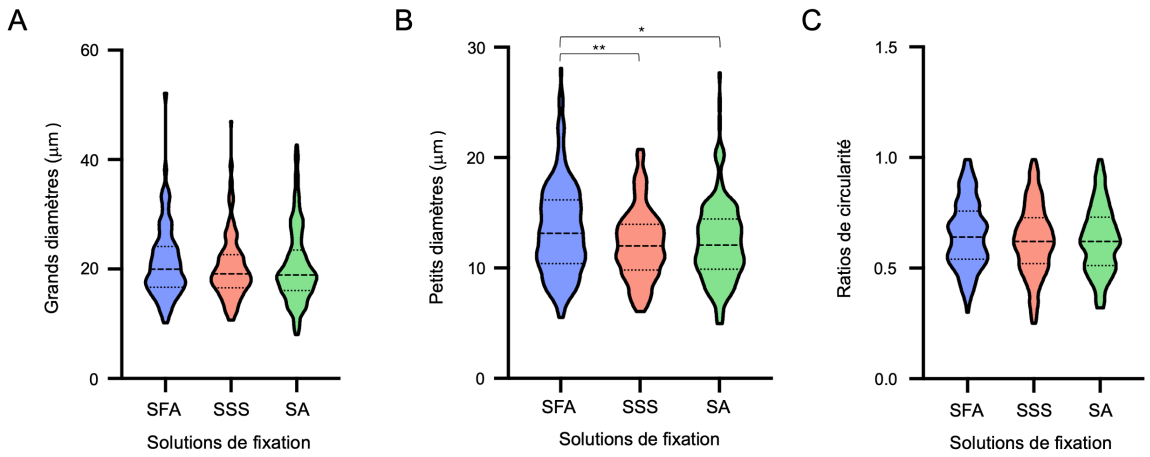


Figure 13. – **Représentation graphique des diamètres cellulaires et des ratios de circularité de 30 neurones par spécimen pour les trois solutions de fixation**. µm = microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

2.5 Nombre de régions d'intérêt

Le nombre de ROIs acquises était significativement différent entre les trois solutions de fixation (ANOVA $F_{2;15} = 7.857$; $p = 0.005$; $\eta^2_p = 0.512$). Une quantité significativement plus grande de ROIs était requise pour atteindre le seuil de 30 cellules dans les spécimens fixés avec la SSS par rapport à ceux fixés avec la SFA ($p = 0.004$) et la SA ($p = 0.004$). Il n'y avait aucune différence entre le nombre de ROI nécessaire pour les spécimens fixés avec la SFA et la SA ($p = 1.000$).

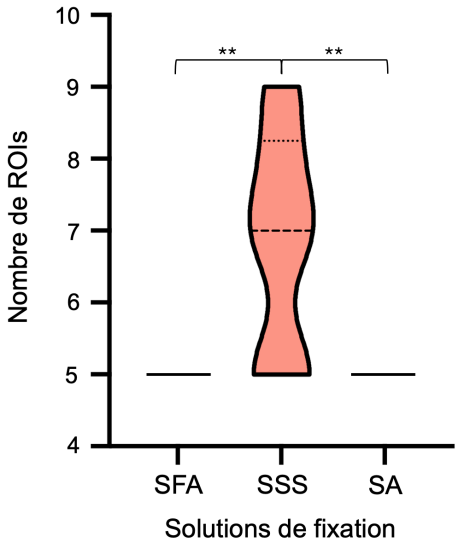


Figure 14. – **Représentation graphique du nombre de régions d'intérêt acquises pour les trois solutions de fixation.** ROI = région d'intérêt; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

En résumé, les spécimens humains fixés avec la SSS ont une moins grande surface cellulaire totale en raison de leur nombre inférieur de neurones marqués par ROI par rapport aux spécimens des deux autres solutions. La surface cellulaire individuelle ne montrait cependant pas de différence, ce qui veut dire que le problème vient surtout de la qualité du marquage histologique. Ainsi, les résultats soulignent que les spécimens humains fixés avec la SSS sont moins bien adaptés pour la recherche quantitative sur du tissu traité de façon immunohistochimique avec le protocole actuel. Une optimisation des protocoles devra être envisagée afin d'améliorer la qualité du marquage histologique. De plus, à l'exception d'une différence dans les petits diamètres qui devra être examinée davantage, tout semble indiquer que les spécimens humains fixés avec la SA sont bien adaptés pour la recherche quantitative. Ceci est un résultat prometteur pour répondre à notre objectif principal et pour les futures études de notre groupe de recherche.

Chapitre 5 – Discussion globale

Dans le cadre de ce projet, nous avons évalué les effets de trois solutions de fixation sur plusieurs variables quantitatives des neurones dans le cortex moteur primaire. Le but de l'étude était de comparer les effets sur le tissu nerveux de deux solutions utilisées dans les laboratoires d'anatomie humaine avec la solution standard utilisée en recherche et dans les banques de cerveaux. Pour ce faire, nous avons divisé l'étude en deux volets : un volet sur les cerveaux de souris et un volet sur les cerveaux humains. En comparant les effets des solutions de fixation sur le tissu nerveux, il sera possible de déterminer si les cerveaux des laboratoires d'anatomie peuvent devenir une source alternative de tissu *ex vivo* pour la recherche neuroscientifique utilisant l'histologie des neurones de façon quantitative.

1. Solutions utilisées

La SFA a été désignée comme solution contrôle, car c'est la principale solution utilisée en recherche animale et humaine (Balta et al., 2015; Brenner, 2014; de Paula et al., 2018; Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016; Lombardero et al., 2017; Martins-Costa et al., 2022; Moelans et al., 2011) ainsi que 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). Les effets de la SFA sur le tissu nerveux sont bien documentés, en particulier les effets de cette solution sur le volume du cerveau (Quester & Schröder, 1997) et l'histologie (Fox et al., 1985; Hade et al., 2024; Ma et al., 2024).

La SSS et la SA ont été incluses dans ce projet, puisqu’elles sont couramment utilisées au laboratoire d'anatomie humaine de l'UQTR pour produire un embaumement adapté aux activités d'enseignement et de dissection. Plusieurs cerveaux complets seraient ainsi disponibles pour la recherche. De plus, les cerveaux fixés par ces deux solutions sont d'une bonne qualité macroscopique. Ils peuvent être manipulés sans se détériorer, en plus de conserver une texture et une couleur appropriées pour les activités du laboratoire d'anatomie (Benet et al., 2014; Hayashi et al., 2014). Ils peuvent donc être coupés en blocs pour un traitement histologique, comme les études précédentes de notre groupe de recherche l’ont montré (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024; Frigon et al., 2026).

D'autres solutions de fixation sont employées au laboratoire d'anatomie de l'UQTR. Par exemple, la solution de Thiel (Balta et al., 2015; Hammer, 2022) produit une fixation souple et est grandement utilisée pour différentes simulations chirurgicales (Venne et al., 2020). Cependant, les cerveaux des corps fixés avec cette solution sont friables et inutilisables à la fois pour les études macroscopiques et microscopiques. D'ailleurs, le laboratoire d'anatomie de l'UQTR a pris l'habitude de prélever les cerveaux de ces corps avant leur embaumement pour les fixer en immersion dans la SFA afin de les préserver. Ces cerveaux sont ainsi traités de la même façon que ceux des banques de cerveaux.

2. Variables d'intérêt

2.1 Quantification de la surface cellulaire totale

2.1.1 Volet souris

La surface totale des neurones du tissu de souris n'était pas différente entre les trois solutions de fixation testées. Cela est cohérent avec les résultats précédents de notre groupe de recherche, qui montrent que l'antigénicité du tissu de souris et l'homogénéité de la distribution des antigènes étaient conservées de façon comparable entre les trois groupes (Frigon et al., 2022b). Ainsi, contrairement à notre hypothèse initiale, la grande concentration de formaldéhyde dans la SFA ne semble pas avoir un effet plus prononcé sur la diminution de la surface cellulaire que dans les spécimens fixés avec la SSS et la SA. Cela pourrait s'expliquer par la présence d'alcools dans les deux autres solutions. Bien qu'elles aient une plus faible concentration en formaldéhyde, leur forte concentration en alcool pourrait faire diminuer la surface des cellules du tissu de façon semblable au formaldéhyde de la SFA. Effectivement, l'éthanol est connu pour déshydrater le tissu et ainsi faire diminuer le volume de certains organes, incluant le cerveau (Boon & Kok, 2008; Fox et al., 1985).

Les résultats de la segmentation automatique des neurones ont également montré qu'il n'y avait pas de différence entre les trois solutions de fixation. Notre hypothèse de départ était que les spécimens fixés par la SSS donneraient des résultats de segmentation automatique plus variables, car ces images ont un contraste diminué entre les cellules et l'arrière-plan (Frigon et al., 2022b). Ce n'était pas le cas pour les cerveaux de souris. Cependant, quelques spécimens avaient des arrière-plans

plus foncés, particulièrement autour des cellules ou des agglomérations de cellules. Dans ces cas, le logiciel automatique a généré de faux positifs, en segmentant faussement des pixels appartenant à l'arrière-plan comme des profils neuronaux. Le logiciel automatique a ainsi généré des résultats de segmentation plus élevés que ceux de l'évaluateur avec la méthode manuelle. Cependant, cette sursegmentation de la méthode automatique par rapport à la méthode manuelle n'a pas changé les résultats finaux. Les deux méthodes ont montré un fort alignement des pixels et une bonne corrélation entre les résultats de segmentation des neurones. De plus, aucune des deux méthodes n'a détecté de différence entre les trois groupes comparés, c'est-à-dire que leur performance est similaire, voire équivalente. Ainsi, la méthode automatique serait assez précise pour être utilisée pour segmenter la surface cellulaire totale dans les trois solutions utilisées. Nous recommandons cependant un contrôle de qualité sur toutes les ROIs afin de s'assurer que les hétérogénéités de l'arrière-plan ne causent pas de faux positifs. Au besoin, un ajustement manuel des segmentations automatiques devrait être réalisé.

2.1.2 Volet humain

La surface totale des neurones était différente entre les trois solutions de fixation sur le tissu humain. La surface cellulaire du tissu fixé par la SSS était beaucoup plus petite que celle des deux autres groupes. En comparant les photomicrographies de tous les spécimens (Figure 15), cela s'explique par la qualité du marquage immunohistologique. Le marquage des spécimens fixés par la SSS était de moins bonne qualité dans cinq cas sur six, qui présentaient peu de neurones marqués ou un marquage généralement très pâle. Ce résultat est en partie supporté par une étude précédente de notre laboratoire, dans laquelle il a été observé que le tissu humain fixé par la SSS produisait un marquage hétérogène (Frigon et al., 2024). Cependant, cette étude a aussi rapporté qu'un protocole de récupération des antigènes réussissait à corriger ce marquage de moins bonne qualité (Frigon et al., 2024). Dans le présent projet, le marquage faible et hétérogène des spécimens fixés par la SSS a subsisté malgré l'application de la chaleur pour récupérer les antigènes. Comme les deux études ont utilisé des cerveaux provenant du laboratoire d'anatomie de l'UQTR et que certains spécimens étaient parfois identiques, nous ne pensons pas que ces résultats soient attribuables à la présence de variables confondantes chez l'humain. Par exemple, l'intervalle post-mortem ou le délai entre la fixation et les traitements histologiques auraient pu influencer négativement la qualité du marquage histologique. Cependant, les cerveaux des deux autres groupes de fixateurs étaient soumis aux mêmes variables et ont généré un marquage adéquat. Nous pensons plutôt que les résultats observés

dans les spécimens de la SSS s'expliquent par une ou plusieurs des hypothèses suivantes, qui seront expliquées dans les paragraphes suivants : 1) la longue période d'entreposage des cerveaux dans la SSS entraîne des modifications qui diminuent la qualité histologique au fil du temps, 2) la SSS engendre une fixation de qualité inférieure à celle obtenue avec les deux autres solutions, et 3) les effets combinés de la fixation de moindre qualité et de la longue période d'entreposage nuisent à la pénétration de l'anticorps utilisé.

Après leur extraction, les cerveaux du laboratoire d'anatomie sont conservés dans leur solution respective jusqu'à leur utilisation, ce qui peut parfois s'étendre sur une longue période. Il est à noter que les cerveaux fixés par la SA sont entreposés dans l'éthanol 10% plutôt que dans la SA, puisque c'est la procédure standard des laboratoires d'anatomie pour les cerveaux dédiés à l'enseignement. Il est possible que les produits chimiques présents dans les trois solutions de fixation continuent d'affecter l'antigénicité du cerveau au fil du temps. D'ailleurs, ce phénomène a été étudié pour la SFA. Une étude a montré la variation de l'antigénicité de NeuN des cerveaux fixés par immersion avec la SFA et conservés depuis 1, 5, 10, 15 et 20 années (Ma et al., 2024). Les effets du temps de post-fixation n'ont cependant pas été étudiés sur les cerveaux fixés par la SSS et la SA. En revanche, une étude précédente de notre groupe de recherche (Frigon et al., 2024) a utilisé des cerveaux fixés par la SSS et la SA qui étaient conservés au laboratoire d'anatomie depuis plusieurs années. Les cerveaux ont baigné dans la SSS d'une à trois années avant d'être traités histologiquement. Pourtant, ces cerveaux ont révélé de l'antigénicité, avant et après le traitement de récupération des antigènes. En revanche, cette étude a fait une analyse qualitative seulement, c'est-à-dire que l'antigénicité et la distribution des antigènes marqués ont été évalués sans tenir compte de l'intensité du marquage. Or, l'intensité du marquage affecte grandement la capacité de recueillir des résultats quantitatifs, comme cela a été fait dans ce mémoire. De plus, la présente étude a eu lieu environ deux ans après l'étude de Frigon et al. (2024), ce qui signifie que les cerveaux utilisés ont baigné dans la SSS de trois à cinq ans avant leur traitement histologique. Bien que l'étude de Ma et al. (2024) ait été menée sur des spécimens fixés avec la SFA, les résultats ont révélé une diminution de l'antigénicité de NeuN en immunohistochimie avec le temps de post-fixation. Nous pensons que cet effet s'applique aussi sur les cerveaux fixés avec la SSS, c'est-à-dire qu'il faudrait traiter ces spécimens le plus tôt possible après leur extraction. Une étude supplémentaire devrait éventuellement être réalisée afin d'étudier longitudinalement la préservation de l'antigénicité de différents antigènes dans les cerveaux fixés avec la SSS et la SA.

Ensuite, comme la SSS contient une plus faible concentration de formaldéhyde (0.8% vs 4% et 1.42%), il se pourrait que la qualité de la fixation du tissu ne soit pas aussi bonne qu'avec les deux autres solutions. D'ailleurs, cela expliquerait pourquoi les corps fixés par cette solution se préservent moins longtemps (Balta et al., 2015). Ceci causerait des cellules moins bien conservées, surtout si un long temps de post-fixation s'écoule avant les traitements histologiques. La fixation par la SSS se fait principalement par la coagulation induite par l'alcool isopropylique, alors que la SA contient de l'éthanol. L'alcool remplace l'eau du tissu, ce qui entraîne une inversion des molécules exposées à l'environnement externe et interne des protéines du tissu (section 2.2.2.1, chapitre 1). L'alcool isopropylique (C_3H_7OH) est une molécule plus volumineuse que l'éthanol (C_2H_5OH). Elle pourrait ainsi avoir plus de difficulté à traverser les tissus et remplacer l'eau de l'environnement, causant un effet de coagulation et de fixation des tissus moins puissant que celui induit par l'éthanol présent dans la SA. La qualité de la fixation serait donc moins bonne que celle observée pour les autres solutions étudiées, ce qui donnerait des cellules moins bien préservées produisant des résultats histologiques de qualité inférieure. De plus, la SSS ne contient que 16% d'alcool isopropylique, en comparaison avec la SA qui contient 69% d'éthanol. Pour un effet antiseptique optimal, la concentration en alcool devrait être entre 60 et 90% (Yetman, 2021). Considérant les faibles concentrations de formaldéhyde (0.8%), de phénol (0.72%) et d'alcool isopropylique (16%), la SSS ne semble également pas avoir un pouvoir antiseptique aussi puissant que les deux autres solutions. Il pourrait alors rester des microorganismes pour accélérer la décomposition des tissus et des cellules, ce qui nuirait à l'antigénicité des spécimens au fil du temps. Cet effet ne serait qu'exacerbé avec un long temps de post-fixation dans la SSS. Il serait alors envisageable, et même profitable, de conserver les cerveaux fixés dans la SSS dans une autre solution, par exemple en post-fixant les spécimens dans la SFA.

Contrairement aux deux autres solutions de fixation, la SSS contient une grande quantité de chlorure de sodium (36%). Lorsque la solution est injectée, ceci crée un environnement hypertonique qui incite l'eau à sortir des cellules, ce qui entraîne des cellules avec une apparence de "raisins secs" en histologie. Ce phénomène a été rapporté par une étude antérieure de notre groupe (Frigon et al., 2024). En absence d'eau, le cytoplasme devient plus dense (Khan Academy, 2026b). Or, cela pourrait nuire au déplacement d'un anticorps ciblant des antigènes intracellulaires. Dans la présente étude, l'anticorps utilisé (NeuN) a un poids moléculaire assez élevé (46-48 kDa) (Abcam, 2026). La protéine qu'il cible est exprimée dans le noyau des neurones, ce qui signifie que

l'anticorps doit être en mesure de traverser les membranes cellulaire et nucléaire. Ainsi, la composition riche en sel de la SSS crée un environnement nuisible à l'anticorps utilisé dans ce projet. Cet environnement salin n'est pas observé dans les deux autres solutions de fixation, car elles ne contiennent pas de chlorure de sodium.

En résumé, la cellule est moins bien préservée parce que la SSS a un moins bon pouvoir de fixation et de désinfection que les deux autres solutions. La cellule est encore plus dégradée parce qu'elle a passé plusieurs années en post-fixation dans la SSS avant les traitements histologiques. La cellule est aussi rabougrie et son cytoplasme plus dense en raison de l'environnement hypertonique instauré par la haute concentration en sel de la SSS, ce qui nuit à la pénétration dans la cellule de l'anticorps utilisé. De plus, si l'anticorps arrive à se rendre à son antigène cible, ce dernier est déjà abîmé par tous les processus expliqués plus haut. Alors, malgré les traitements de récupération des antigènes appliqués au tissu, nous pensons que toutes ces raisons expliquent que l'antigénicité soit altérée dans les cerveaux fixés par la SSS, en produisant une coloration moins contrastée.

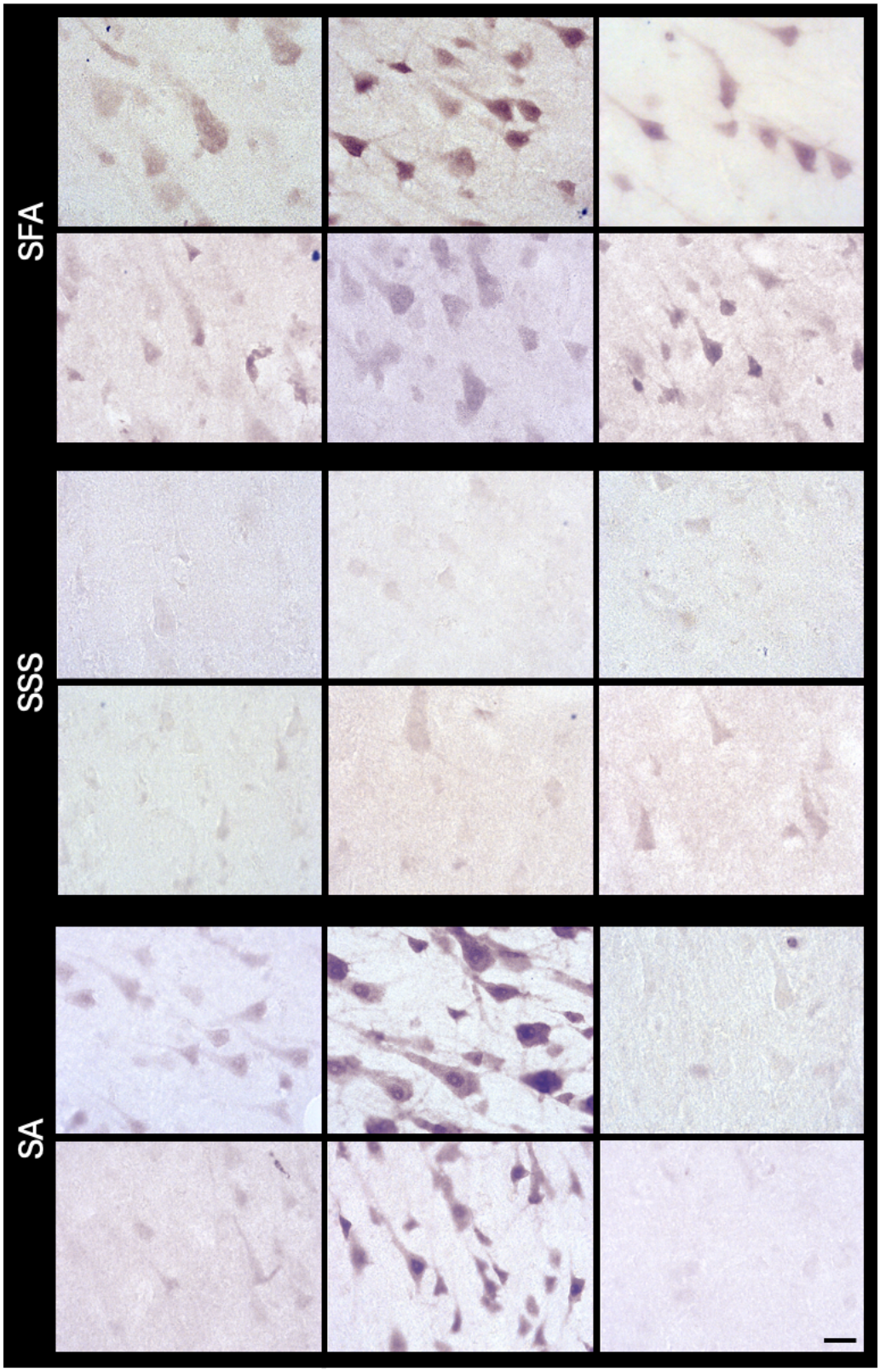

SFA
SSS
SA

Figure 15. – **Photomicrographies (60X) des régions d'intérêt dans les cerveaux humains fixés par les trois solutions de fixation**. Barre d'échelle = 25 microns; SFA = solution de formaldéhyde; SSS = solution saturée de sel; SA = solution d'alcools

2.2 Quantification de la surface cellulaire individuelle

2.2.1 Volet souris

La méthode de segmentation manuelle des cellules individuelles a été validée par le calcul de la variabilité intra- et inter-évaluateurs. Puisque la résolution des images histologiques est et sera toujours limitée, un pixel peut contenir à la fois une partie de cellule et une partie du neuropile. La décision de segmenter ou non ce pixel peut entraîner une sous- ou surestimation de la surface cellulaire. C'est ce que l'on appelle l'effet du volume partiel (Despotović et al., 2015; Gérin-Lajoie et al., 2026). La décision de l'évaluateur d'inclure ou d'exclure les pixels affectés par l'effet du volume partiel peut aussi différer d'une fois à l'autre ou d'un évaluateur à l'autre (Dadar & Duchesne, 2020; Despotović et al., 2015; Maleki et al., 2024), et ce, malgré l'établissement préalable de règles d'inclusion ou d'exclusion. Dû à la nature des images à segmenter, qui ont des intensités de marquage des cellules et de l'arrière-plan différentes ainsi que des artéfacts histologiques, la détermination des contours exacts des cellules est difficile. Donc, les règles d'inclusion sont difficiles à déterminer de façon objective et stable pour tous les spécimens. En dépit de cela, il est possible et préférable d'établir des lignes générales avant la segmentation par tous les évaluateurs, par exemple en choisissant d'être plus ou moins conservateur dans le choix d'inclusion des pixels de volume partiel. De plus, la décision est généralement biaisée pour chaque évaluateur, c'est-à-dire qu'un même évaluateur a tendance à toujours gérer le volume partiel de la même façon, que ce soit en segmentant plus ou moins de pixels. C'est d'ailleurs ce qui a été observé dans nos résultats de segmentation manuelle.

C'est pour cette raison que nous avons voulu quantifier la variabilité de la méthode utilisée dans le présent projet. Les segmentations ont d'abord été répétées par le même évaluateur, ce qui a permis de déterminer la variabilité interne. La valeur du coefficient de corrélation intra-classe (ICC) était de 0.889, ce qui révèle une bonne fiabilité selon l'échelle d'interprétation proposée par Koo and Li (2016). Ce résultat n'est pas surprenant, car un même évaluateur a tendance à prendre des décisions similaires par rapport à l'inclusion ou l'exclusion de certains pixels. Cependant, deux évaluateurs

différents ont plus de chances de gérer ce choix de façon différente, d'où la raison pour laquelle nous avons aussi calculé la variabilité inter-évaluateurs. Dans ce cas, la valeur de l'ICC était de 0.686, ce qui révèle une fiabilité modérée. C'est un moins bon résultat que la variabilité intra-évaluateur, ce qui est tout à fait normal, puisque les segmentations sont subjectives d'une personne à l'autre. Néanmoins, dans la majorité des cas, les évaluateurs sous- ou sur-segmentaient de façon constante dans tous les spécimens. Si les segmentations d'un évaluateur sous-estimaient le volume partiel, cet effet était observé pour la plupart des cas, et vice-versa. De plus, la différence moyenne entre les deux évaluateurs était de 15.29 μm^2, ce qui équivaut approximativement à une erreur d'estimation de 18%. Dans le cadre des résultats de ce mémoire, l'objectif était de comparer les mesures quantitatives entre les trois groupes de fixation. Ces comparaisons ont été effectuées avec les données provenant du même évaluateur (A.G.L.), donc l'erreur d'estimation est plus basse et reste la même pour tous les groupes. En effet, la différence moyenne entre les deux temps d'évaluation était de 7.65 μm^2, ce qui équivaut approximativement à une erreur d'estimation de 9%, soit la moitié de celle calculée pour la variabilité inter-évaluateurs. Dans le cadre d'autres études dans lesquelles une vérité biologique devrait être trouvée, l'établissement d'un étalon-argent serait plus approprié pour réduire l'erreur d'estimation entre des évaluateurs différents. Plusieurs évaluateurs produiraient alors des segmentations pour produire une moyenne constituant la meilleure approximation de la vérité biologique (Francis, 2004).

En utilisant la méthode de segmentation manuelle, la surface cellulaire individuelle de dix neurones par ROI pour les cerveaux de souris n'était pas différente entre les trois groupes de fixateurs. Ces résultats, comme ceux obtenus pour la surface cellulaire totale, montrent que les trois solutions n’ont pas d’impact différent sur le volume des cellules du tissu fixé. La réduction de la taille cellulaire induite par la concentration élevée en formaldéhyde de la SFA serait comparable à celle induite par la concentration élevée en alcool des deux autres solutions, malgré leur plus faible concentration en formaldéhyde.

La segmentation automatique produit des résultats similaires pour les estimations de la surface cellulaire individuelle. Nous avions initialement émis l'hypothèse que la segmentation automatique de la surface cellulaire individuelle serait plus variable que celle de la surface cellulaire totale, car elle est plus influencée par la présence de l'effet du volume partiel. Comme certaines cellules se superposent dans la surface cellulaire totale, il y a moins de frontières entre les contours cellulaires

et le neuropile, ce qui signifie qu'il y a moins de pixels contenant une partie de corps cellulaire et une autre partie de neuropile. Le volume partiel serait ainsi diminué par rapport à celui retrouvé dans les surfaces cellulaires individuelles, dans lesquelles il y a plus de frontières entre les profils neuronaux et le neuropile. Cette hypothèse a été confirmée, puisque les coefficients de Dice et les coefficients de corrélation entre les méthodes manuelle et automatique pour la surface cellulaire individuelle (respectivement 0.81 et $r_s = 0.454$; $p < 0.001$) étaient plus bas que ceux de la surface cellulaire totale (respectivement 0.92 et $r = 0.867$; $p < 0.001$). Cependant, ces coefficients montrent tout de même une bonne concordance entre les méthodes manuelle et automatique.

Il est intéressant de noter que les coefficients de Dice étaient plus bas dans les spécimens fixés avec la SFA. Plusieurs observations déjà mentionnées ont révélé que ces spécimens entraînaient plus d'erreurs de segmentation automatique en raison de marquage pâle ou hétérogène de certaines cellules ou de l'arrière-plan. Il semble donc que la segmentation automatique soit moins précise dans ces spécimens par rapport aux spécimens fixés avec la SSS et la SA.

2.2.2 Volet humain

Pour les cerveaux humains, la surface cellulaire individuelle des neurones n'était pas différente entre les trois solutions de fixation. Cela vient soutenir le résultat obtenu pour la surface cellulaire totale des spécimens fixés par la SSS, qui était inférieure à celle des spécimens fixés avec les deux autres solutions. Plutôt que d'avoir des cellules plus petites pour expliquer cette diminution dans la surface cellulaire totale, la SSS semble affecter le nombre de cellules marquées par ROI. Cela signifie que la SSS affecterait la qualité du marquage immunohistochimique. Nous en déduisons que la quantification du nombre de neurones marqués par ROI permettra de valider cette hypothèse, auquel cas une optimisation des protocoles histologiques pour les spécimens fixés par la SSS serait envisageable.

2.3 Quantification du nombre de neurones marqués

2.3.1 Nombre total de neurones marqués

2.3.1.1 Volet souris

Chez les spécimens de souris, le nombre de neurones marqués par ROI n'était pas différent entre les trois groupes de fixateurs. L’ensemble des résultats des variables analysées nous indique donc

que les trois solutions de fixation ont un effet assez similaire sur le volume du neuropile et des cellules du tissu de souris, sans affecter le nombre de cellules marquées.

2.3.1.2 Volet humain

Chez les spécimens humains, il y avait moins de neurones marqués dans les spécimens fixés par la SSS que dans les spécimens fixés par les deux autres solutions. Cela appuie les résultats sur la quantification de la surface cellulaire totale. Sachant que la surface cellulaire individuelle ne montrait pas de différence entre les trois solutions, il est possible d'avancer que la SSS n'affecte pas le volume des cellules elles-mêmes, mais leur détection immunohistologique. Nous pensons que la qualité histologique inférieure observée dans notre étude serait entre autres due à la plus longue période d'entreposage dans la SSS avant les traitements histologiques (section 2.1.2, chapitre 5). D'un autre côté, ces résultats pourraient aussi s'expliquer par un effet différent de la solution sur le neuropile et les cellules. L'environnement hypertonique créé par la concentration élevée en chlorure de sodium de la SSS engendre le mouvement de l'eau hors des cellules (Khan Academy, 2026b). Cela augmenterait donc le volume du neuropile. En référence aux situations décrites au chapitre 2, il y aurait alors une surface cellulaire totale et un nombre de cellules marquées plus petit dans chaque région d'intérêt, mais la surface cellulaire individuelle ne serait pas différente de celle observée dans le tissu fixé par les autres solutions. Ce sont les mêmes modulations de variables quantitatives qui ont été observées dans ce cas-ci. Par conséquent, les résultats de la SSS pourraient s'expliquer de deux manières : (1) le marquage immunohistologique est de moins bonne qualité, ou (2) le volume du neuropile augmente indépendamment de celui des cellules, ce qui nécessiterait une étude plus approfondie.

2.3.2 Nombre de neurones au focus et hors-focus

2.3.2.1 Volet souris

Chez les souris, le tissu fixé avec la SFA avait moins de cellules au focus et plus de cellules hors-focus que le tissu fixé avec la SSS et la SA. En prenant ces résultats indépendamment des résultats des autres variables, on pourrait penser que cela sous-tend des cellules plus petites dans les tissus fixés avec la SFA. Si elles sont plus petites, elles ont moins de chances d'apparaître pleinement dans le niveau de focus de la photomicrographie. Cependant, aucune des autres variables étudiées ne supporte cette conclusion. La surface cellulaire totale et individuelle ainsi que le nombre total de neurones marqués dans les cerveaux de souris ne montrent pas de différence avec les deux autres

solutions de fixation. Il est possible que notre hypothèse concernant l'effet de la grosseur des cellules sur le nombre de cellules au focus et hors-focus soit erronée. Peut-être que le nombre de cellules au focus et hors-focus n'est pas déterminé par la grosseur des cellules, mais bien par la qualité de pénétration des anticorps.

Par exemple, la qualité de pénétration des anticorps pourrait être moins bonne dans les cerveaux fixés avec la SFA, ce qui expliquerait qu'il y ait moins de cellules aux contours nets dans le milieu de l'épaisseur de la coupe histologique. La pénétration est reliée à la perméabilisation des tissus. C'est un processus pouvant être modifié selon la composition de la solution et le traitement chimique des coupes histologiques (Frigon et al., 2022b; Yuan et al., 2017). La perméabilisation des cellules est particulièrement importante pour les antigènes qui se retrouvent à l'intérieur du cytoplasme ou du noyau cellulaire (Cheng et al., 2019), comme c'est le cas pour l'antigène NeuN ciblé dans le présent projet. Pendant le protocole d'immunohistochimie, les coupes sont exposées à des solutions contenant du méthanol et du Triton X-100, qui augmentent la perméabilité des tissus et facilitent le passage des anticorps à travers la membrane cellulaire (Cheng et al., 2019; Yuan et al., 2017). De plus, les tissus sont fixés dans des solutions pouvant contenir des produits qui amorcent cette perméabilisation, par exemple les alcools présents dans la SSS et la SA. Or, contrairement aux solutions des laboratoires d'anatomie, la composition chimique de la SFA ne comporte pas d'éthanol ou d'alcool isopropylique. La perméabilité finale des cellules du tissu fixé avec la SFA pourrait alors être moindre que celle des cellules du tissu fixé avec la SSS et la SFA, ce qui entraînerait une moins bonne pénétration de l'anticorps anti-NeuN. Ce phénomène est appuyé par une étude précédente, qui a rapporté que trois spécimens de souris fixés avec la SFA sur neuf montraient une pénétration incomplète des anticorps anti-NeuN (Frigon et al., 2022b). En comparaison, seulement un spécimen de souris sur neuf fixé avec la SSS et aucun des spécimens fixés avec la SA ne montrait une pénétration incomplète du même anticorps (Frigon et al., 2022b).

2.3.2.2 Volet humain

Les cerveaux humains fixés avec la SSS avaient moins de cellules au focus et moins de cellules hors-focus que les cerveaux fixés avec la SFA et la SA. Ceci n'est pas surprenant, puisque le nombre total de neurones marqués était inférieur dans les cerveaux fixés avec la SSS comparativement à celui obtenu pour les deux autres solutions. Il est alors normal que le nombre des neurones soit également plus bas dans les deux catégories évaluées ici. C'est pourquoi nous

avons aussi calculé des ratios du nombre de cellules au focus ou hors-focus sur le nombre total de cellules pour chacune des solutions. Ces ratios étaient similaires entre les trois solutions pour les neurones au focus et hors-focus. Ainsi, contrairement aux résultats observés chez la souris, il ne semble pas y avoir de différence réelle entre les trois groupes de fixateurs pour ces deux variables.

Bien que l'objectif principal de l'étude ne soit pas de comparer les deux espèces utilisées dans le présent projet, il est tout de même intéressant de constater que les différences dans le nombre de cellules au focus et hors-focus n'étaient pas les mêmes chez la souris et chez l'humain. Chez la souris, nous pensons que la pénétration des anticorps à travers l'épaisseur du tissu était incomplète, mais cela ne semble pas avoir été le cas chez l'humain. Une possible explication repose dans l'action des variables confondantes de l'humain. Comme il y a un intervalle post-mortem relié à la perfusion de cadavres, certains processus de dégradation s'entament dans le tissu humain avant la fixation complète du corps. Il est connu que les membranes cellulaires deviennent perméables après la mort (Krassner et al., 2023), un processus qui serait plus exacerbé chez les humains en raison du long intervalle post-mortem. Sachant que la perméabilisation est un aspect important qui influence la pénétration des anticorps, cela pourrait possiblement expliquer que cette dernière se soit mieux faite dans le tissu humain que dans le tissu murin.

2.4 Quantification des diamètres cellulaires

2.4.1 Petits et grands diamètres

2.4.1.1 Volet souris

Les petits diamètres des cellules n'étaient pas différents dans les tissus fixés avec les trois solutions. Cependant, les grands diamètres des cellules du tissu fixé avec la SFA étaient inférieurs à ceux observés dans les spécimens fixés avec la SSS et la SA. En interprétant les résultats des diamètres neuronaux indépendamment des autres variables, on pourrait avancer que le tissu fixé avec la SFA a des cellules plus rondes, alors que les tissus fixés avec la SSS et la SA ont des cellules plus allongées. Cela a été analysé davantage en calculant des ratios de circularité, dont les résultats seront adressés à la section suivante. Cependant, la différence retrouvée entre les moyennes des grands diamètres est de moins d'un demi-micron. Bien que ce soit une différence statistiquement significative, la différence à l'échelle biologique ne représente que de 3 à 4% du diamètre de la cellule. De plus, si seul le grand diamètre est plus petit, mais que le petit diamètre ne change pas

d'un groupe à l'autre, la cellule au complet devrait aussi être plus petite. Or, les cellules des spécimens fixés par les trois solutions ne montraient pas de différence de surface, ce qui laisse supposer que leur taille n'était pas différente non plus. Si les cellules étaient bel et bien plus petites, comme le laisse présager la différence dans les grands diamètres, une différence aurait dû être détectée dans les autres variables. Il est possible que la petite taille de notre échantillon soit en cause ici. Avec un échantillon de petite taille, la probabilité d'occurrence d'une erreur de type II (faux négatif) est plus haute, car les tests statistiques sont moins puissants. Cela signifie qu'il y a peut-être une différence de surface cellulaire qui n'a tout simplement pas été détectée. Toutefois, une analyse rapide sur G*Power (version 3.1.9.6) a montré que l'atteinte d'une taille d'échantillon suffisamment grande pour obtenir une bonne puissance statistique aurait été infaisable avec les souris (section 5.7, chapitre 3). En revanche, la détection d'une différence ne changerait quand même pas sa faible portée à l'échelle biologique.

Les grands diamètres obtenus avec la segmentation automatique des cellules individuelles n'étaient pas différents entre les spécimens fixés avec les trois solutions de fixation. Les petits diamètres, en revanche, étaient plus grands dans les spécimens fixés avec la SSS que dans les spécimens fixés avec la SFA et la SA. Ces résultats ne sont pas cohérents avec les autres, car ils ne détectent pas les mêmes différences. Plutôt que d'obtenir des grands diamètres plus petits dans les cerveaux fixés avec la SFA comme avec la méthode manuelle, le logiciel automatique obtient des petits diamètres plus grands dans les cerveaux fixés avec la SSS. Cependant, comme mentionné au chapitre 3, nous pensons que la méthode automatique a été plus affectée dans la quantification des diamètres et que ces résultats sont plus variables. Les hétérogénéités de marquage des cellules et de l'intensité de l'arrière-plan auraient induit des erreurs de segmentation du logiciel automatique (section 5, chapitre 3). Comme les diamètres automatiques ont été mesurés à partir de ces segmentations parfois erronées, ils ne sont pas toujours aussi précis que les diamètres manuels. Nous jugeons donc que les différences entre les groupes détectées pour les diamètres automatiques ne sont pas suffisamment fiables. De surcroît, la différence entre les moyennes mesurées par les méthodes manuelle et automatique s'élève autour de 6%, ce qui suffit à expliquer les différences de fraction de microns trouvées ici.

2.4.1.2 Volet humain

Chez les spécimens humains, les grands diamètres n'étaient pas différents dans les cellules du tissu fixé avec les trois solutions. En revanche, les petits diamètres étaient plus grands dans les spécimens fixés avec la SFA que dans les spécimens fixés avec la SSS et la SA. Bien que le résultat soit inversé entre les spécimens de souris et humains, les deux cas reflètent une potentielle forme circulaire des cellules fixées avec la SFA par rapport aux deux autres solutions. Encore une fois, cependant, les différences statistiques ne se transposent pas nécessairement en différence biologique significative. De plus, les résultats n'indiquaient pas de différence de surface cellulaire individuelle entre les tissus fixés par les trois solutions, ce qui vient appuyer le fait que la différence est si petite qu'elle n'a pas d'impact sur la taille de la cellule. Cela pourrait provenir de la petite taille d'échantillon imposée par les limites de disponibilité du tissu *ex vivo* humain pour la recherche. La justification est la même que pour les cerveaux de souris.

2.4.2 Ratios de circularité

2.4.2.1 Volet souris

Les indices de circularité basés sur les ratios des diamètres mesurés manuellement n'étaient pas différents entre le tissu fixé avec les trois solutions de fixation. Il est tout de même intéressant de noter que les ratios des cellules fixées avec la SFA, malgré une absence de différence statistiquement significative, étaient plus proches de 1 que les ratios des cellules fixées avec la SSS et la SA. En parallèle avec les résultats précédents sur les grands diamètres, les spécimens fixés avec la SFA semblent ainsi avoir des cellules davantage circulaires. Toutefois, si cette différence existe bel et bien, elle est si petite qu'on ne peut pas l'observer à l'œil nu.

En revanche, les indices de circularité basés sur les ratios des diamètres mesurés automatiquement étaient différents entre les groupes. Les spécimens fixés par la SSS avaient des ratios plus grands que ceux des spécimens fixés par la SA. Bien que la différence n'était pas statistiquement significative, les ratios des spécimens fixés par la SSS étaient aussi supérieurs à ceux des spécimens fixés par la SFA. Comme il a été mentionné précédemment, nous pensons que la segmentation automatique à partir de laquelle ces indices ont été calculés n'est pas suffisamment précise. En effet, les hétérogénéités du marquage histologique auraient biaisé les résultats des diamètres automatiques, ce qui aurait à son tour biaisé les résultats des ratios mesurés. Les différences entre les groupes ne sont donc pas une préoccupation. De plus, les différences ne sont que d'une fraction

de microns, ce qui ne représente pas une différence suffisante à l'échelle biologique pour justifier un impact de la solution sur la forme cellulaire.

2.4.2.2 Volet humain

Pour le tissu humain, les ratios de circularité des cellules n'étaient pas différents entre les solutions. Or, malgré le fait que cette différence ne soit pas statistiquement significative, il convient de souligner que les spécimens fixés avec la SFA avaient des ratios un peu plus proches de 1. Ceci dénote la présence potentielle de cellules un peu plus circulaires dans le tissu fixé avec la SFA par rapport aux deux autres solutions, même si cette différence n'était pas détectable statistiquement. Cette différence pourrait éventuellement devenir significative en augmentant la taille de l'échantillon. En revanche, la différence à l'échelle biologique ne serait pas très importante, d'autant plus qu'une observation visuelle de la forme des cellules dans les trois solutions de fixation n'est pas suffisante à détecter une différence (Figure 15, section 2.1.2, chapitre 5).

2.5 Nombre de régions d'intérêt

Le nombre de ROIs à acquérir pour atteindre 30 cellules à segmenter par spécimen humain était plus grand dans les cerveaux fixés par la SSS. Cela appuie les résultats obtenus dans les spécimens fixés par la SSS pour la surface cellulaire totale et le nombre total de neurones marqués par ROI. Comme il y avait moins de cellules marquées par ROI, il fallait prendre plus de photomicrographies pour obtenir le même nombre de cellules à segmenter dans les spécimens fixés par la SSS. La SSS produirait donc un marquage immunohistochimique de moins bonne qualité. Cela s'expliquerait par les mêmes hypothèses qui ont été mentionnées plus tôt.

3. Limites de l'étude

La limite principale de l'étude est la petite taille des échantillons chez la souris et chez l'humain, qui pourrait potentiellement avoir influencé la puissance statistique. Comme nous travaillons avec des échantillons de convenance, cette limite ne peut pas être contournée en ajoutant des spécimens, car nous sommes limités par la disponibilité du matériel. Cependant, les résultats obtenus n'en sont pas moins valides. Les différences de moyennes entre les groupes ne sont pas grandes. Ainsi, les cerveaux fixés avec les solutions des laboratoires d'anatomie pourraient être utilisés sans problème dans des études cherchant à mesurer une différence claire (c.-à-d. une taille d'effet plus importante) dans le nombre ou la taille des cellules.

De plus, il aurait été possible d'évaluer davantage de variables quantitatives ou de tester divers antigènes ou colorations histologiques entre les trois fixateurs. Cependant, nous avons choisi de nous concentrer sur les variables associées au nombre et à la taille des neurones, car la perte de neurones et l'atrophie sont impliquées dans les maladies neurodégénératives (Agnello & Ciaccio, 2022). Nous pourrons éventuellement explorer d'autres avenues dans de futurs projets.

4. Directions futures

Les différences qualitatives entre les trois groupes de fixateurs ont été rapportées dans des études précédentes de notre groupe de recherche, qui se sont concentrées sur l'immunohistochimie et l'histologie de plusieurs types de cellules (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024). Le présent projet a permis d'élucider les différences quantitatives entre ces trois mêmes solutions de fixation, en poussant davantage sur l'immunohistochimie des neurones. À la lumière des découvertes faites jusqu'à maintenant, nous avançons que les cerveaux fixés avec la SSS et la SA seraient utilisables en recherche.

4.1 Solution saturée de sel

La SSS est une solution dont les effets macroscopiques sont idéaux pour la dissection et les simulations neurochirurgicales en laboratoire d'anatomie humaine. Notre groupe de recherche a prouvé que l'utilisation des cerveaux fixés par cette solution était possible dans les études utilisant l'IHC (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024). Cependant, la qualité histologique des cerveaux humains fixés par cette solution est généralement moins bonne. Le présent projet a aussi montré que la qualité du marquage des neurones dans le cortex moteur primaire humain était inférieure à celle observée sur les tissus fixés avec les deux autres solutions. Le marquage était plus pâle et moins homogène, entraînant une moins grande surface cellulaire totale et un plus petit nombre de neurones marqués par ROI. Toutefois, comme le but du projet était de comparer les trois solutions, les protocoles utilisés étaient les mêmes pour tous les groupes. Nous présumons que des ajustements de protocole histologique seraient bénéfiques pour maximiser les résultats de l'IHC sur du tissu fixé avec la SSS. Ainsi, des études supplémentaires seraient nécessaires pour optimiser les protocoles avant de pouvoir offrir ce tissu pour la recherche. Il serait également pertinent d'utiliser d'autres marqueurs neuronaux et gliaux afin de savoir si les résultats obtenus ici sont attribuables aux neurones ou à l'anticorps choisi. De plus, il est possible que la qualité inférieure des résultats

histologiques soit dépendante de la région choisie. Ainsi, l'étude d'autres régions est importante pour la suite des choses.

4.2 Solution d'alcools

La SA est une solution grandement utilisée dans les laboratoires d'anatomie humaine pour fixer les cadavres utilisés pour la dissection et l'enseignement. Des études précédentes de notre laboratoire ont montré que l'utilisation des cerveaux fixés par cette solution n'était non seulement possible, mais donnait parfois des résultats histologiques supérieurs à ceux observés dans le tissu fixé avec la SFA (Frigon et al., 2022b; Frigon et al., 2024). Le présent projet n'a fait que renforcer ces résultats. Toutefois, nous avons remarqué une certaine variabilité dans l'intensité du marquage des spécimens humains fixés avec la SA. Les variables récoltées dans le présent projet ne considéraient pas ce facteur, donc ceci n'a pas été mentionné dans l'interprétation des résultats. Ceci pourrait être abordé dans les prochaines études, en intégrant une analyse semi-quantitative de l'intensité du marquage. Cela dit, les résultats générés jusqu'à maintenant par notre groupe de recherche appuient l'utilisation des cerveaux fixés par cette solution en recherche. Comme pour la SSS, il serait intéressant d'optimiser les protocoles pour qu'ils soient encore mieux adaptés au tissu fixé avec la SA et d'agrandir les marqueurs et régions étudiés.

Somme toute, les résultats présentés dans ce mémoire sont prometteurs pour l'utilisation en recherche des spécimens fixés avec les solutions des laboratoires d'anatomie humaine. Afin de pouvoir recommander leur usage, il faudra toutefois explorer d'autres aspects de la recherche dans lesquels ces cerveaux pourraient être utilisés. Par exemple, leur usage pourrait être bénéfique en imagerie médicale ou en recalage entre les images de résonance magnétique et d'histologie. Ce travail de grande envergure a été entamé par notre laboratoire et évolue constamment (Frigon et al., 2026; Gérin-Lajoie et al., 2026). La prochaine étape majeure sera d'évaluer leur usage pour la recherche histopathologique dans d'autres régions que les hémisphères cérébraux, en évaluant entre autres les différences qualitatives et quantitatives du tronc cérébral dans le cadre d'un projet de doctorat.

Conclusion

L'objectif général de notre étude était de comparer les effets sur le cerveau de trois solutions de fixation : (1) la solution de formaldéhyde utilisée par les banques de cerveaux et en recherche, (2) la solution saturée de sel et (3) la solution d'alcools, toutes deux employées par les laboratoires d'anatomie. Nous avons évalué les effets quantitatifs de ces fixateurs sur la surface cellulaire et le nombre de neurones marqués dans une région d'intérêt ainsi que sur les diamètres cellulaires de neurones choisis aléatoirement.

Notre premier objectif consistait à analyser ces variables quantitatives sur les cerveaux de souris, car ces derniers permettent d'isoler la variable indépendante (c.-à-d., la solution utilisée) tout en évitant les variables confondantes associées aux humains. L'hypothèse prévalente était que les cerveaux fixés avec la SFA auraient des surfaces cellulaires plus petites en raison de leur forte concentration en formaldéhyde. En réalité, les résultats ont montré que les surfaces cellulaires totale et individuelle, le nombre total de neurones et les petits diamètres des neurones étaient similaires entre les spécimens fixés avec les trois solutions. Certaines différences ont été détectées au niveau du nombre de cellules au focus et hors-focus, ainsi que dans les grands diamètres neuronaux. Les spécimens fixés avec la SFA avaient moins de cellules au focus et plus de cellules hors-focus que les spécimens fixés avec les deux solutions anatomiques. Nous pensons que cela est dû à une moins bonne pénétration des anticorps dans l'épaisseur de la coupe du tissu fixé avec la SFA, causant des cellules plus floues dans l'épaisseur à laquelle les photomicrographies ont été prises. De plus, les grands diamètres des neurones fixés avec la SFA étaient plus petits que ceux des spécimens fixés avec la SSS et la SA. Cela reflète potentiellement une différence de morphologie, c'est-à-dire que les cellules fixées avec la SFA seraient de forme davantage circulaire. Ce résultat n'est pas supporté par les ratios de circularité calculés, qui ne manifestent pas de différence entre les trois solutions de fixation.

Notre second objectif consistait à répéter l'étude sur les cerveaux humains. L'hypothèse initiale était la même que pour les souris. En pratique, les résultats ont révélé que les spécimens fixés avec la SSS étaient de moins bonne qualité histologique, ce qui a entraîné une moins grande surface cellulaire totale et un moins grand nombre de neurones marqués par région d'intérêt. Malgré cela,

ces spécimens avaient des cellules de surface similaire aux spécimens fixés avec les deux autres solutions, ce qui signifie que la SSS ne diminue pas le volume du tissu de façon différente. Les grands diamètres neuronaux n'étaient pas différents entre les spécimens fixés par les trois solutions, mais les neurones fixés par la SFA avaient de plus grands petits diamètres. Cela semble encore une fois indiquer que ces cellules ont une morphologie un peu plus circulaire que celles fixées par la SSS et la SA. Ce résultat n'était pas supporté par le calcul des ratios de circularité, qui ne détectaient aucune différence entre les trois groupes. Ainsi, l'étude a démontré que les cerveaux humains fixés par la SSS étaient de qualité inférieure pour les études histologiques.

Notre troisième objectif consistait à développer une méthode automatique précise pour segmenter les neurones de façon équivalente à la méthode manuelle, qui est considérée comme la méthode de référence. L'hypothèse était que la méthode automatique serait moins précise dans les cerveaux fixés avec la SSS, car ils contiennent davantage d'artéfacts histologiques que les cerveaux fixés avec les deux autres solutions. En fait, la méthode automatique s'est révélée suffisamment précise pour détecter les surfaces cellulaires totale et individuelle de façon similaire à la méthode manuelle dans les trois solutions. Nous recommandons tout de même qu'un contrôle de qualité des images soit appliqué à la suite de la segmentation automatique.

En conclusion, nos résultats démontrent que les cerveaux humains fixés avec la SSS sont moins intéressants pour les études neuroscientifiques utilisant l'immunohistochimie pour marquer les neurones. Cependant, les cerveaux humains fixés avec la SA ont subi des effets microscopiques similaires à ceux fixés avec la SFA. Ceci est prometteur pour leur utilisation future dans les études histologiques quantitatives, dans la mesure où cela valorise l'exploitabilité des cerveaux provenant des laboratoires d'anatomie. D'autres études devront cependant être réalisées afin d'examiner en profondeur les effets de cette solution pour d'autres utilisations ou dans d'autres régions du cerveau. Nous souhaitons entre autres élargir la portée de l'étude en étudiant les effets des solutions sur les autres populations cellulaires ainsi que sur certains biomarqueurs fréquemment étudiés en neuropathologie (p. ex., la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer). De plus, les solutions pourraient avoir des effets différents sur différentes régions, y compris le tronc cérébral, qui sera étudié sous peu dans le cadre d'un projet de doctorat.

Références bibliographiques

Abcam. (2026). *Anti-NeuN antibody [ERP12763] - Neuronal Marker*. https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/neun-antibody-epr12763-neuronal-marker-ab177487

Adickes, E. D., Folkerth, R. D., & Sims, K. L. (1997). Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination. *Arch Pathol Lab Med*, *121*(11), 1199-1206.

Agnello, L., & Ciaccio, M. (2022). Neurodegenerative Diseases: From Molecular Basis to Therapy. *Int J Mol Sci*, *23*(21). https://doi.org/10.3390/ijms232112854

Ahmed, H. O. (2011). Preliminary study: Formaldehyde exposure in laboratories of Sharjah university in UAE. *Indian J Occup Environ Med*, *15*(1), 33-37. https://doi.org/10.4103/0019-5278.82997

Akbar-Khanzadeh, F., Vaquerano, M. U., Akbar-Khanzadeh, M., & Bisesi, M. S. (1994). Formaldehyde exposure, acute pulmonary response, and exposure control options in a gross anatomy laboratory. *Am J Ind Med*, *26*(1), 61-75. https://doi.org/10.1002/ajim.4700260106

Alkemade, A., Großmann, R., Bazin, P. L., & Forstmann, B. U. (2023). Mixed methodology in human brain research: integrating MRI and histology. *Brain Struct Funct*, *228*(6), 1399-1410. https://doi.org/10.1007/s00429-023-02675-2

Alma Better. (2024). *Convolutional Neural Networks (CNN): A Comprehensive Guide*. https://www.almabetter.com/bytes/articles/convolutional-neural-networks

Amodeo, A. A., & Skotheim, J. M. (2016). Cell-Size Control. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *8*(4), a019083. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019083

Anderson, S. D. (2006). Practical light embalming technique for use in the surgical fresh tissue dissection laboratory. *Clin Anat*, *19*(1), 8-11. https://doi.org/10.1002/ca.20216

Andrade, C. (2021). The Inconvenient Truth About Convenience and Purposive Samples. *Indian J Psychol Med*, *43*(1), 86-88. https://doi.org/10.1177/0253717620977000

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

Aufderheide, A. C., Muñoz, I., & Arriaza, B. (1993). Seven Chinchorro mummies and the prehistory of northern Chile. *Am J Phys Anthropol*, *91*(2), 189-201. https://doi.org/10.1002/ajpa.1330910205

Azumi, N., & Battifora, H. (1987). The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. *Am J Clin Pathol*, *88*(3), 286-296. https://doi.org/10.1093/ajcp/88.3.286

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., Cronin, M., Cryan, J. F., & O'Mahony, S. M. (2017). The utility of cadaver-based approaches for the teaching of human anatomy: A survey of British and Irish anatomy teachers. *Anat Sci Educ*, *10*(2), 137-143. https://doi.org/10.1002/ase.1629

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

Banker, L., & Tadi, P. (2025). Neuroanatomy, Precentral Gyrus. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.

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

Battifora, H., & Kopinski, M. (1986). The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J Histochem Cytochem*, *34*(8), 1095-1100. https://doi.org/10.1177/34.8.2426335

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., 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

Beard, V. R., & Burger, W. C. (2017). Change and Innovation in the Funeral Industry. *Omega (Westport)*, *75*(1), 47-68. https://doi.org/10.1177/0030222815612605

Beauchamp, A., Yee, Y., Darwin, B. C., Raznahan, A., Mars, R. B., & Lerch, J. P. (2022). Whole-brain comparison of rodent and human brains using spatial transcriptomics. *Elife*, *11*. https://doi.org/10.7554/eLife.79418

Bedino, J. H. (2003). Embalming chemistry: glutaraldehyde versus formaldehyde. *Champion Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices*, *649*, 2612-2632.

Bellizzi, A. M. (2020). Immunohistochemistry in the diagnosis and classification of neuroendocrine neoplasms: what can brown do for you? *Hum Pathol*, *96*, 8-33. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2019.12.002

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

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

Billot, B., Greve, D. N., Puonti, O., Thielscher, A., Van Leemput, K., Fischl, B., Dalca, A. V., & Iglesias, J. E. (2023). SynthSeg: Segmentation of brain MRI scans of any contrast and resolution without retraining. *Med Image Anal*, *86*, 102789. https://doi.org/10.1016/j.media.2023.102789

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

Blinkouskaya, Y., Caçoilo, A., Gollamudi, T., Jalalian, S., & Weickenmeier, J. (2021). Brain aging mechanisms with mechanical manifestations. *Mech Ageing Dev*, *200*, 111575. https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111575

Blum, F. (1896). Ueber Wesen und Wert der Formolhärtnung. *Annals of Anatomy*, *11*, 718-727. http://archive.org

Boon, M. E., & Kok, L. P. (2008). Theory and practice of combining coagulant fixation and microwave histoprocessing. *Biotech Histochem*, *83*(6), 261-277. https://doi.org/10.1080/10520290802553476

Boon, M. E., Schmidt, U., Cramer-Knijnenburg, G. I., & van Krieken, J. H. (1992). Using Kryofix as alternative for formalin results in more optimal and standardized immunostaining of paraffin sections. *Pathol Res Pract*, *188*(7), 832-835. https://doi.org/10.1016/s0344-0338(11)80240-2

Bopp, R., Holler-Rickauer, S., Martin, K. A., & Schuhknecht, G. F. (2017). An Ultrastructural Study of the Thalamic Input to Layer 4 of Primary Motor and Primary Somatosensory Cortex in the Mouse. *J Neurosci*, *37*(9), 2435-2448. https://doi.org/10.1523/jneurosci.2557-16.2017

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

Brain and Body Donation Program, B. (2026). https://www.bannerhealth.com/services/research/about-banner-research/research-programs/brain-and-body-donation-program

Brenner, E. (2014). Human body preservation - old and new techniques. *J Anat*, *224*(3), 316-344. https://doi.org/10.1111/joa.12160

Burns, D. M., Bell, I., Katchky, R., Dwyer, T., Toor, J., Whyne, C. M., & Safir, O. (2018). Saturated Salt Solution Cadaver-Embalming Method Improves Orthopaedic Surgical Skills Training. *J Bone Joint Surg Am*, *100*(15), e104. https://doi.org/10.2106/jbjs.17.01256

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

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

Cattoretti, G., Pileri, S., Parravicini, C., Becker, M. H., Poggi, S., Bifulco, C., Key, G., D'Amato, L., Sabattini, E., Feudale, E., & et al. (1993). Antigen unmasking on formalin-fixed,

paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol*, *171*(2), 83-98. https://doi.org/10.1002/path.1711710205

Cecchini, M. J., Walsh, J. C., Parfitt, J., Chakrabarti, S., Correa, R. J., MacKenzie, M. J., & Driman, D. K. (2019). CDX2 and Muc2 immunohistochemistry as prognostic markers in stage II colon cancer. *Hum Pathol*, *90*, 70-79. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2019.05.005

Ceruti, M. C. (2015). Frozen Mummies from Andean Mountaintop Shrines: Bioarchaeology and Ethnohistory of Inca Human Sacrifice. *Biomed Res Int*, *2015*, 439428. https://doi.org/10.1155/2015/439428

Chen, C., Mat Isa, N. A., & Liu, X. (2025). A review of convolutional neural network based methods for medical image classification. *Comput Biol Med*, *185*, 109507. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2024.109507

Cheng, R., Zhang, F., Li, M., Wo, X., Su, Y. W., & Wang, W. (2019). Influence of Fixation and Permeabilization on the Mass Density of Single Cells: A Surface Plasmon Resonance Imaging Study. *Front Chem*, *7*, 588. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00588

Chia, S. E., Ong, C. N., Foo, S. C., & Lee, H. P. (1992). Medical students' exposure to formaldehyde in a gross anatomy dissection laboratory. *J Am Coll Health*, *41*(3), 115-119. https://doi.org/10.1080/07448481.1992.9936310

Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol*, *37*(5), 942-946. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009

Cockburn, A., & Cockburn, E. (1980). *Mummies, disease, and ancient cultures*. Cambridge University Press.

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

Crowther, J. M. (2021). Understanding humectant behaviour through their water-holding properties. *Int J Cosmet Sci*, *43*(5), 601-609. https://doi.org/10.1111/ics.12723

Crum, W. R., Camara, O., & Hill, D. L. (2006). Generalized overlap measures for evaluation and validation in medical image analysis. *IEEE Trans Med Imaging*, *25*(11), 1451-1461. https://doi.org/10.1109/tmi.2006.880587

Dadar, M., & Collins, D. L. (2021). BISON: Brain tissue segmentation pipeline using T(1) - weighted magnetic resonance images and a random forest classifier. *Magn Reson Med*, *85*(4), 1881-1894. https://doi.org/10.1002/mrm.28547

Dadar, M., & Duchesne, S. (2020). Reliability assessment of tissue classification algorithms for multi-center and multi-scanner data. *Neuroimage*, *217*, 116928. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.116928

Dadar, M., Sanches, L., Fouquet, J., Moqadam, R., Alasmar, Z., Ruth 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*. https://doi.org/10.52294/001c.123347

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 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 Paula, R. C., Babinski, M. A., Perreira-Sampaio, M. A., Pires, L. A. S., & Fernandes, R. M. P. (2018). The use of fixative solutions throughout the ages: a comprehensive review. *Acta Scientiae Anatomica*, *1(1)*, 21-28.

de Rooy, L. (2023). The Shelf Life of Skulls: Anthropology and 'race' in the Vrolik Craniological Collection. *J Hist Biol*, *56*(2), 309-337. https://doi.org/10.1007/s10739-023-09716-w

Dell'Amore, C. (2014). Who Were the Ancient Bog Mummies? Surprising New Clues. *National Geographic*. https://www.nationalgeographic.com/history/article/140718-bog-bodies-denmark-archaeology-science-iron-age#:~:text=Ongoing%20research%20suggests%20at%20least,accumulated%20layers%20of%20dead%20moss.

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

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

Donczo, B., & Guttman, A. (2018). Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. *J Pharm Biomed Anal*, *155*, 125-134. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.065

Donoghue, J. P., & Wise, S. P. (1982). The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. *J Comp Neurol*, *212*(1), 76-88. https://doi.org/10.1002/cne.902120106

Douglas-Bell Canada Brain Bank, D. (2026). https://douglasbrainbank.ca

Doyle, C. T., & O'Leary, J. J. (1992). The search for the universal fixative or 'magic juice'. *J Pathol*, *166*(4), 331-332. https://doi.org/10.1002/path.1711660403

Durell, S. R., & Ben-Naim, A. (2017). Hydrophobic-hydrophilic forces in protein folding. *Biopolymers*, *107*(8). https://doi.org/10.1002/bip.23020

Eichenbaum, K. D., Eichenbaum, J. W., Fadiel, A., Miller, D. C., Demir, N., Naftolin, F., Stern, A., & Pevsner, P. H. (2005). Minimally invasive method for murine brain fixation. *Biotechniques*, *39*(4), 487-488, 490. https://doi.org/10.2144/000112003

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., Mahendran, S., Majumdar, S., Smith, D., & Soames, R. W. (2011). A comparison of Thiel and formalin embalmed cadavers for thyroid surgery training. *Surgeon*, *9*(3), 142-146. https://doi.org/10.1016/j.surge.2010.09.001

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/https://doi.org/10.1179/his.2001.24.3.173

Engber, D. (2011). The trouble with black-6, a tiny alcoholic takes over the lab. *Slate*(2), 1-17. https://www.slate.com/articles/health_and_science/the_mouse_trap/2011/11/black_6_lab_mice_and_the_history_of_biomedical_research.html

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

Ezugworie, J., Anibeze, C., & Ozoemena, F. (2008). Trends In The Development Of Embalming Methods. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, *7(2)*.

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

Fischer, D. L., Grinberg, L. T., Ahrendsen, J. T., Beach, T. G., Bieniek, K. F., Castellani, R. J., Chkheidze, R., Cobos, I., Cohen, M., Crary, J. F., Dickson, D. W., Dugger, B. N., Dunlop, S. R., Farrell, K., Ghetti, B., Haeri, M., Harrison, W., Head, E., Hiniker, A.,…Lee, E. B. (2025). Celebrating neuropathology's contributions to Alzheimer's Disease Research Centers. *Alzheimers Dement*, *21*(10), e70734. https://doi.org/10.1002/alz.70734

Fischer, M. H. (1905). THE TOXIC EFFECTS OF FORMALDEHYDE AND FORMALIN. *J Exp Med*, *6*(4-6), 487-518. https://doi.org/10.1084/jem.6.4-6.487

Fox, C. H., & Benton, C. (1987). Formaldehyde: The Fixative. *Journal of Histotechnology*, *10*(3), 199-201.

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., & Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*, *33*(8), 845-853. https://doi.org/10.1177/33.8.3894502

Francis, S. J. (2004). *Automatic Lesion Identification in MRI of Multiple Sclerosis Patients* McGill University]. https://escholarship.mcgill.ca/concern/theses/qz20st101

Frigon, E. M. (2025). *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 ?* Université du Québec à Trois-Rivières].

Frigon, E. M., Dadar, M., Boire, D., & Maranzano, J. (2022a). *Antigenicity is preserved in mice brains fixed with three different solutions used in human gross anatomy laboratories* Society for Neuroscience, San Diego.

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

Frigon, E. M., Gérin-Lajoie, A., Dadar, M., Boire, D., & 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. https://doi.org/10.3389/fnana.2024.1372953

Frigon, E. M., Gérin-Lajoie, A., Fouquet, J. P., 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*, *6*. https://doi.org/https://doi.org/10.52294/001c.154293

Gadhave, D. G., Sugandhi, V. V., Jha, S. K., Nangare, S. N., Gupta, G., Singh, S. K., Dua, K., Cho, H., Hansbro, P. M., & Paudel, K. R. (2024). Neurodegenerative disorders: Mechanisms of degeneration and therapeutic approaches with their clinical relevance. *Ageing Res Rev*, *99*, 102357. https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102357

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

García-Cabezas, M., & Barbas, H. (2014). Area 4 has layer IV in adult primates. *Eur J Neurosci*, *39*(11), 1824-1834. https://doi.org/10.1111/ejn.12585

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

Gérin-Lajoie, A., Adame-Gonzalez, W., Frigon, E. M., Guerra Sanches, L., Nayouf, A., Boire, D., Dadar, M., & Maranzano, J. (2026). Ex vivo human brain volumetry: Validation of MRI measurements. *Magn Reson Med*, *95*(2), 853-867. https://doi.org/10.1002/mrm.70083

Giger, U., Frésard, I., Häfliger, A., Bergmann, M., & Krähenbühl, L. (2008). Laparoscopic training on Thiel human cadavers: a model to teach advanced laparoscopic procedures. *Surg Endosc*, *22*(4), 901-906. https://doi.org/10.1007/s00464-007-9502-7

Glaser, J., Greene, G., & Hendricks, S. (2007). *Stereology for Biological Research With a Focus on Neuroscience*. MBF Press.

Gown, A. M. (2004). Unmasking the mysteries of antigen or epitope retrieval and formalin fixation. *Am J Clin Pathol*, *121*(2), 172-174. https://doi.org/10.1309/9g5f-y3u3-qb4r-15dr

Grad, L. I., Rouleau, G. A., Ravits, J., & Cashman, N. R. (2017). Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Cold Spring Harb Perspect Med*, *7*(8). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024117

Gray, P. (1958). *Handbook of Basic Microtechnique* (2nd ed.). New York, McGraw-Hill.

Grigorev, I. P., & Korzhevskii, D. E. (2018). Current Technologies for Fixation of Biological Material for Immunohistochemical Analysis (Review). *Sovremenye technologii v medicine*, *10(2)*, 156. https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19

Gros, R., Rodríguez-Núñez, O., Felger, L., Moriconi, S., McKinley, R., Pierangelo, A., Novikova, T., Vassella, E., Schucht, P., Hewer, E., & Maragkou, T. (2023). Effects of formalin fixation on polarimetric properties of brain tissue: fresh or fixed? *Neurophotonics*, *10*(2), 025009. https://doi.org/10.1117/1.NPh.10.2.025009

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

Haga, Y., Hata, J., Uematsu, A., Seki, F., Komaki, Y., Mizumura, M., Nishio, M., Kaneko, T., Kishi, N., Okano, H., & Furukawa, A. (2019). MR Imaging Properties of ex vivo Common Marmoset Brain after Formaldehyde Fixation. *Magn Reson Med Sci*, *18*(4), 253-259. https://doi.org/10.2463/mrms.mp.2018-0086

Hammer, N. (2022). Thirty years of Thiel embalming-A systematic review on its utility in medical research. *Clin Anat*, *35*(7), 987-997. https://doi.org/10.1002/ca.23936

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

Hammer, R. P., Jr., Tomiyasu, U., & Scheibel, A. B. (1979). Degeneration of the human Betz cell due to amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*, *63*(2), 336-346. https://doi.org/10.1016/0014-4886(79)90129-8

Hatton, I. A., Galbraith, E. D., Merleau, N. S. C., Miettinen, T. P., Smith, B. M., & Shander, J. A. (2023). The human cell count and size distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *120*(39), e2303077120. https://doi.org/10.1073/pnas.2303077120

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 (Baltimore)*, *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

Hayes, R. B., Blair, A., Stewart, P. A., Herrick, R. F., & Mahar, H. (1990). Mortality of U.S. embalmers and funeral directors. *Am J Ind Med*, *18*(6), 641-652. https://doi.org/10.1002/ajim.4700180603

Helander, K. G. (1994). Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem*, *69*(3), 177-179. https://doi.org/10.3109/10520299409106282

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.

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

Hoffmann, C., Cho, E., Zalesky, A., & Di Biase, M. A. (2024). From pixels to connections: exploring in vitro neuron reconstruction software for network graph generation. *Commun Biol*, *7*(1), 571. https://doi.org/10.1038/s42003-024-06264-9

Holmes, H. E., Powell, N. M., Ma, D., Ismail, O., Harrison, I. F., Wells, J. A., Colgan, N., O'Callaghan, J. M., Johnson, R. A., Murray, T. K., Ahmed, Z., Heggenes, M., Fisher, A., Cardoso, M. J., Modat, M., O'Neill, M. J., Collins, E. C., Fisher, E. M., Ourselin, S., & Lythgoe, M. F. (2017). Comparison of In Vivo and Ex Vivo MRI for the Detection of Structural Abnormalities in a Mouse Model of Tauopathy. *Front Neuroinform*, *11*, 20. https://doi.org/10.3389/fninf.2017.00020

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

Hopkins, E., Sanvictores, T., & Sharma, S. (2026). Physiology, Acid Base Balance. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

Copyright © 2026, StatPearls Publishing LLC.

Hopwood, D. (1985). Cell and tissue fixation, 1972-1982. *Histochem J*, *17*(4), 389-442. https://doi.org/10.1007/bf01003203

Howat, W. J., & Wilson, B. A. (2014). Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*, *70*(1), 12-19. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.022

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

Hunter, A., Eisma, R., & Lamb, C. (2014). Thiel embalming fluid--a new way to revive formalin-fixed cadaveric specimens. *Clin Anat*, *27*(6), 853-855. https://doi.org/10.1002/ca.22392

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

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

IBM Technology. (2021). *What are Convolutional Neural Networks (CNNs)?* https://www.youtube.com/watch?v=QzY57FaENXg&t=39s

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

Ino, H. (2003). Antigen retrieval by heating en bloc for pre-fixed frozen material. *J Histochem Cytochem*, *51*(8), 995-1003. https://doi.org/10.1177/002215540305100803

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. *Front Neuroanat*, *17*, 1149674. https://doi.org/10.3389/fnana.2023.1149674

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

Jaung, R., Cook, P., & Blyth, P. (2011). A comparison of embalming fluids for use in surgical workshops. *Clin Anat*, *24*(2), 155-161. https://doi.org/10.1002/ca.21118

Johnson, E. C., Johnson, G. R., & Johnson, M. (2012). *The origin and history of embalming. In: Embalming, Theory, and Practice* (R. G. Mayer, Ed.). New York: McGraw-Hill.

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

Kasukurthi, R., Brenner, M. J., Moore, A. M., Moradzadeh, A., Ray, W. Z., Santosa, K. B., Mackinnon, S. E., & Hunter, D. A. (2009). Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Methods*, *184*(2), 303-309. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.08.019

Khaliq, F., & Tripathi, P. (2009). Acute effects of formalin on pulmonary functions in gross anatomy laboratory. *Indian J Physiol Pharmacol*, *53*(1), 93-96.

Khan Academy. (2026a). *Orders of protein structure: primary, secondary, tertiary, and quaternary. Alpha helix and beta pleated sheet*. https://en.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/orders-of-protein-structure

Khan Academy. (2026b). *Osmosis and tonicity. Hypertonic, isotonic, and hypotonic solutions and their effect on cells*. https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-structure-and-function/mechanisms-of-transport-tonicity-and-osmoregulation/a/osmosis

Kiernan, J. A. (2000). Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. *Microscope Today*, *8(1)*, 8-13. https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S1551929500057060

Kim, H., Kim, Y. D., & Cho, S. H. (1999). Formaldehyde exposure levels and serum antibodies to formaldehyde-human serum albumin of Korean medical students. *Arch Environ Health*, *54*(2), 115-118. https://doi.org/10.1080/00039899909602245

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

Klaubert, W., Schönbauer, R., Gilg, T., Gollwitzer, R., Hafter, R., Graeff, H., Spann, W., & Wilmanns, W. (1988). The role of coagulation, fibrinogenolysis and fibrinolysis in the development of fluid and clotted cadaver plasma. *Thromb Res*, *50*(1), 53-63. https://doi.org/10.1016/0049-3848(88)90174-0

Koo, T. K., & Li, M. Y. (2016). A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med*, *15*(2), 155-163. https://doi.org/10.1016/j.jcm.2016.02.012

Kornilov, A., Safonov, I., & Yakimchuk, I. (2022). A Review of Watershed Implementations for Segmentation of Volumetric Images. *J Imaging*, *8*(5). https://doi.org/10.3390/jimaging8050127

Korogod, N., Petersen, C. C., & Knott, G. W. (2015). Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation. *Elife*, *4*. https://doi.org/10.7554/eLife.05793

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

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

Kriebel, D., Myers, D., Cheng, M., Woskie, S., & Cocanour, B. (2001). Short-term effects of formaldehyde on peak expiratory flow and irritant symptoms. *Arch Environ Health*, *56*(1), 11-18. https://doi.org/10.1080/00039890109604049

Krieg, W. J. (1946). Connections of the cerebral cortex; the albino rat; structure of the cortical areas. *J Comp Neurol*, *84*, 277-323. https://doi.org/10.1002/cne.900840302

Kristiansen, S. L., & Nyengaard, J. R. (2012). Digital stereology in neuropathology. *Apmis*, *120*(4), 327-340. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02889.x

Lakchayapakorn, K., & Watchalayarn, P. (2010). Formaldehyde exposure of medical students and instructors and clinical symptoms during gross anatomy laboratory in Thammasat University. *J Med Assoc Thai*, *93 Suppl 7*, S92-98.

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

LaPelusa, A., & Kaushik, R. (2026). Physiology, Proteins. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

Copyright © 2026, StatPearls Publishing LLC.

Lee, C., Kim, Y., & Kaang, B. K. (2022). The Primary Motor Cortex: The Hub of Motor Learning in Rodents. *Neuroscience*, *485*, 163-170. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.01.009

Leong, A. S., & Gilham, P. N. (1989). The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology*, *21*(4), 266-268. https://doi.org/10.3109/00313028909061071

Lindenbach, D., & Bishop, C. (2013). Critical involvement of the motor cortex in the pathophysiology and treatment of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*, *37*(10 Pt 2), 2737-2750. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.09.008

Liu, L., Kakiuchi-Kiyota, S., Arnold, L. L., Johansson, S. L., Wert, D., & Cohen, S. M. (2013). Pathogenesis of human hemangiosarcomas and hemangiomas. *Hum Pathol*, *44*(10), 2302-2311. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.05.012

Logan, B. (1983). The long-term preservation of whole human cadavers destined for anatomical study. *Ann R Coll Surg Engl*, *65*, 333.

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

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

Lynnerup, N. (2007). Mummies. *Am J Phys Anthropol*, *Suppl 45*, 162-190. https://doi.org/10.1002/ajpa.20728

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. *Front Neuroanat*, *18*, 1477973. https://doi.org/10.3389/fnana.2024.1477973

MacIntyre, N. (2018). *Fixation: History and Speed*. https://www.nsh.org/blogs/neil-macintyre/2018/08/10/fixation-history-and-speed

Maleki, F., Moy, L., Forghani, R., Ghosh, T., Ovens, K., Langer, S., Rouzrokh, P., Khosravi, B., Ganjizadeh, A., Warren, D., Daneshjou, R., Moassefi, M., Avval, A. H., Sotardi, S., Tenenholtz, N., Kitamura, F., & Kline, T. (2024). RIDGE: Reproducibility, Integrity, Dependability, Generalizability, and Efficiency Assessment of Medical Image Segmentation Models. *J Imaging Inform Med*. https://doi.org/10.1007/s10278-024-01282-9

Mann, D. M., Yates, P. O., & Hawkes, J. (1983). The pathology of the human locus ceruleus. *Clin Neuropathol*, *2*(1), 1-7.

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

Marceaux, J. C., Dilks, L. S., & Hixson, S. (2008). Neuropsychological effects of formaldehyde use. *J Psychoactive Drugs*, *40*(2), 207-210. https://doi.org/10.1080/02791072.2008.10400632

Marciniewicz, E., Podgórski, P., Sąsiadek, M., & Bladowska, J. (2019). The role of MR volumetry in brain atrophy assessment in multiple sclerosis: A review of the literature. *Adv Clin Exp Med*, *28*(7), 989-999. https://doi.org/10.17219/acem/94137

Marquet, P. A., Santoro, C. M., Latorre, C., Standen, V. G., Abades, S. R., Rivadeneira, M. M., Arriaza, B., & Hochberg, M. E. (2012). Emergence of social complexity among coastal hunter-gatherers in the Atacama Desert of northern Chile. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(37), 14754-14760. https://doi.org/10.1073/pnas.1116724109

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

Mattei, G., Cristiani, I., Magliaro, C., & Ahluwalia, A. (2015). Profile analysis of hepatic porcine and murine brain tissue slices obtained with a vibratome. *PeerJ*, *3*, e932. https://doi.org/10.7717/peerj.932

Mayer, R. G. (2006). *Embalming: History, Theory, and Practice* (4th ed.). New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division.

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

McKenzie, A. T., Woodoff-Leith, E., Dangoor, D., Cervera, A., Ressler, H. W., Whitney, K., Dams-O'Connor, K., Wu, Z., Hillman, E. M. C., Seifert, A. C., & Crary, J. F. (2022). Ex situ perfusion fixation for brain banking: a technical report. *Free Neuropathol*, *3*. https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2022-4368

McLachlan, J. C., & Patten, D. (2006). Anatomy teaching: ghosts of the past, present and future. *Med Educ*, *40*(3), 243-253. https://doi.org/10.1111/j.1365-2929.2006.02401.x

Mehrabi, N. F., Singh-Bains, M. K., Waldvogel, H. J., & Faull, R. L. M. (2018). Stereological Methods to Quantify Cell Loss in the Huntington's Disease Human Brain. *Methods Mol Biol*, *1780*, 1-16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7825-0_1

Messmer, C., Kellogg, R. T., Zhang, Y., Baiak, A., Leiweke, C., Marcus, J. R., Levin, L. S., Zenn, M. R., & Erdmann, D. (2010). A technique to perfuse cadavers that extends the useful life of fresh tissues: the Duke experience. *Anat Sci Educ*, *3*(4), 191-194. https://doi.org/10.1002/ase.159

Meyer, G. (1987). Forms and spatial arrangement of neurons in the primary motor cortex of man. *J Comp Neurol*, *262*(3), 402-428. https://doi.org/10.1002/cne.902620306

Meyer, G., González-Gómez, M., Pueyo Morlans, M., & Carrillo Padillo, F. J. (2014). Betz Cells. In M. J. Aminoff & R. B. Daroff (Eds.), *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)* (pp. 417-419). Elsevier Ltd. https://www.sciencedirect.com/science/chapter/referencework/abs/pii/B9780123851574011209

Mezzapesa, D. M., D'Errico, E., Tortelli, R., Distaso, E., Cortese, R., Tursi, M., Federico, F., Zoccolella, S., Logroscino, G., Dicuonzo, F., & Simone, I. L. (2013). Cortical thinning and clinical heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, *8*(11), e80748. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080748

Mirabelli, M. C., Holt, S. M., & Cope, J. M. (2011). Anatomy laboratory instruction and occupational exposure to formaldehyde. *Occup Environ Med*, *68*(5), 375-378. https://doi.org/10.1136/oem.2010.059352

Mizuki, M., & Tsuda, T. (2001). [Relationship between atopic factors and physical symptoms induced by gaseous formaldehyde exposure during an anatomy dissection course]. *Arerugi*, *50*(1), 21-28.

Moelans, C. B., ter Hoeve, N., van Ginkel, J. W., ten Kate, F. J., & van Diest, P. J. (2011). Formaldehyde substitute fixatives. Analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol*, *136*(4), 548-556. https://doi.org/10.1309/ajcphh1b0cocbgom

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

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 vertebrates. *Development*, *116*(1), 201-211. https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201

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.

Muzi, G., dell'Omo, M., Murgia, N., & Abbritti, G. (2004). [Chemical pollution of indoor air and its effects on health]. *G Ital Med Lav Ergon*, *26*(4), 364-369. (Inquinanti chimici dell'aria interna ed effetti sulla salute.)

National Society for Histotechnology. (2021). *Fluorophic vs Chromogenic Labeling*. https://www.nsh.org/blogs/natalie-paskoski/2021/03/12/fluorophoric-vs-chromogenic-labeling

Newton, S., Aguilar, C., & Bowl, M. R. (2025). C57BL/6-derived mice and the Cdh23(ahl) allele - Background matters. *Hear Res*, *462*, 109278. https://doi.org/10.1016/j.heares.2025.109278

Nicholson, H. D., Samalia, L., Gould, M., Hurst, P. R., & Woodroffe, M. (2005). A comparison of different embalming fluids on the quality of histological preservation in human cadavers. *Eur J Morphol*, *42*(4-5), 178-184. https://doi.org/10.1080/09243860500473306

Nick Pace, C., Scholtz, J. M., & Grimsley, G. R. (2014). Forces stabilizing proteins. *FEBS Lett*, *588*(14), 2177-2184. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.006

Nolan, M., Scott, C., Hof, P. R., & Ansorge, O. (2024). Betz cells of the primary motor cortex. *J Comp Neurol*, *532*(1), e25567. https://doi.org/10.1002/cne.25567

O'Rourke, M. B., & Padula, M. P. (2016). Analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue via proteomic techniques and misconceptions of antigen retrieval. *Biotechniques*, *60*(5), 229-238. https://doi.org/10.2144/000114414

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.

Ohmichi, K., Komiyama, M., Matsuno, Y., Takanashi, Y., Miyamoto, H., Kadota, T., Maekawa, M., Toyama, Y., Tatsugi, Y., Kohno, T., Ohmichi, M., & Mori, C. (2006). Formaldehyde exposure in a gross anatomy laboratory--personal exposure level is higher than indoor concentration. *Environ Sci Pollut Res Int*, *13*(2), 120-124. https://doi.org/10.1065/espr2005.06.265

Oliveira, V. C., Carrara, R. C., Simoes, D. L., Saggioro, F. P., Carlotti, C. G., Jr., Covas, D. T., & Neder, L. (2010). Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histol Histopathol*, *25*(8), 1017-1024. https://doi.org/10.14670/hh-25.1017

Omran, A., Menor-Salvan, C., Springsteen, G., & Pasek, M. (2020). The Messy Alkaline Formose Reaction and Its Link to Metabolism. *Life (Basel)*, *10*(8). https://doi.org/10.3390/life10080125

Otsuka, S., Kawata, S., Nanizawa, E., Hatayama, N., Hayashi, S., Itoh, M., Hirai, S., & Naito, M. (2022). Efficacy of urea solution reperfusion to a formalin-embalmed cadaver for surgical skills training. *Anat Sci Int*, *97*(3), 264-272. https://doi.org/10.1007/s12565-022-00653-y

Ozawa, H. (2019). [Principles and basics of immunohistochemistry]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, *154*(4), 156-164. https://doi.org/10.1254/fpj.154.156

Pabst, R. (1987). Exposure to formaldehyde in anatomy: an occupational health hazard? *Anat Rec*, *219*(2), 109-112. https://doi.org/10.1002/ar.1092190202

Paletzki, R. F., & Gerfen, C. R. (2019). Basic Neuroanatomical Methods. *Curr Protoc Neurosci*, *90*(1), e84. https://doi.org/10.1002/cpns.84

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

Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates [Hardcover]* (3rd ed.). Elsevier.

Paxinos, G., & Mai, J. K. (2004). *The Human Nervous System*.

Pearse, A. G. E. (1980). *Histochemistry, theoretical and applied* (4th ed., Vol. 1 Preparative and Optical Technology). Edinburgh: Churchill Livingstone.

Perry, C., Chung, J. Y., Ylaya, K., Choi, C. H., Simpson, A., Matsumoto, K. T., Smith, W. A., & Hewitt, S. M. (2016). A Buffered Alcohol-Based Fixative for Histomorphologic and Molecular Applications. *J Histochem Cytochem*, *64*(7), 425-440. https://doi.org/10.1369/0022155416649579

Pini, L., Pievani, M., Bocchetta, M., Altomare, D., Bosco, P., Cavedo, E., Galluzzi, S., Marizzoni, M., & Frisoni, G. B. (2016). Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Res Rev*, *30*, 25-48. https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.01.002

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

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

Rahman, S. M. N., Alam, T., & Alam, N. N. (2021). Preservation of Histology by Phenol-Based Fixative: Mini Review of Recent Findings. *International Journal of Morphology*, *39(1)*, 50-56.

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.

Rajkowska, G., Selemon, L. D., & Goldman-Rakic, P. S. (1998). Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry*, *55*(3), 215-224. https://doi.org/10.1001/archpsyc.55.3.215

Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, *42*(4), 405-426. https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405

Rana, A., Massa, P. T., & Chen, X. J. (2022). A Gravity-Fed Transcardial Perfusion Method for Histologic Analysis of the Mouse Central Nervous System. *J Vis Exp*(179). https://doi.org/10.3791/63386

RANDOM.ORG. (2026). *True Random Number Service*. https://www.random.org

Rangan, A., Reinig, E., McPhail, E. D., & Rech, K. L. (2022). Immunohistochemistry for LEF1 and SOX11 adds diagnostic specificity in small B-cell lymphomas. *Hum Pathol*, *121*, 29-35. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2022.01.001

Regelsberger, J., Eicker, S., Siasios, I., Hänggi, D., Kirsch, M., Horn, P., Winkler, P., Signoretti, S., Fountas, K., Dufour, H., Barcia, J. A., Sakowitz, O., Westermaier, T., Sabel, M., & Heese, O. (2015). In vivo porcine training model for cranial neurosurgery. *Neurosurg Rev*, *38*(1), 157-163; discussion 163. https://doi.org/10.1007/s10143-014-0572-4

Richins, C. A., Roberts, E. C., & Zeilmann, J. A. (1963). IMPROVED FLUIDS FOR ANATOMICAL EMBALMING AND STORAGE. *Anat Rec*, *146*, 241-243. https://doi.org/10.1002/ar.1091460309

Rinne, J. O., Paljärvi, L., & Rinne, U. K. (1987). Neuronal size and density in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, *79*(1-2), 67-76. https://doi.org/10.1016/0022-510x(87)90260-7

Rivara, C. B., Sherwood, C. C., Bouras, C., & Hof, P. R. (2003). Stereologic characterization and spatial distribution patterns of Betz cells in the human primary motor cortex. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, *270*(2), 137-151. https://doi.org/10.1002/ar.a.10015

Rodríguez, E. M. (1969). Fixation of the central nervous system by perfusion of the cerebral ventricles with a threefold aldehyde mixture. *Brain Res*, *15*(2), 395-412. https://doi.org/10.1016/0006-8993(69)90163-2

Ronnerberger, O., Fischer, P., & Brox, T. (2015). U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. In N. Navab, J. Hornegger, W. Wells, & A. Frangi (Eds.), *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI 2015. MICCAI 2015. Lecture Notes in Computer Science()* (Vol. 9351). Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28

Sadeghipour, A., & Babaheidarian, P. (2019). Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. *Methods Mol Biol*, *1897*, 253-268. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_22

Schacht, V., & Kern, J. S. (2015). Basics of immunohistochemistry. *J Invest Dermatol*, *135*(3), 1-4. https://doi.org/10.1038/jid.2014.541

Schwarzmaier, S. M., Knarr, M. R. O., Hu, S., Ertürk, A., Hellal, F., & Plesnila, N. (2022). Perfusion pressure determines vascular integrity and histomorphological quality following perfusion fixation of the brain. *J Neurosci Methods*, *372*, 109493. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2022.109493

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

Shepherd, C. E., Alvendia, H., & Halliday, G. M. (2019). Brain Banking for Research into Neurodegenerative Disorders and Ageing. *Neurosci Bull*, *35*(2), 283-288. https://doi.org/10.1007/s12264-018-0326-3

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., 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. *J Histochem Cytochem*, *39*(6), 741-748. https://doi.org/10.1177/39.6.1709656

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

Skoglund, T. S., Pascher, R., & Berthold, C. H. (1997). The existence of a layer IV in the rat motor cortex. *Cereb Cortex*, *7*(2), 178-180. https://doi.org/10.1093/cercor/7.2.178

Smart, A., Tisca, C., Huszar, I. N., Kor, D., Ansorge, O., Tachrount, M., Smart, S., Lerch, J. P., Miller, K. L., & Martins-Bach, A. B. (2023). Protocol for tissue processing and paraffin embedding of mouse brains following ex vivo MRI. *STAR Protoc*, *4*(4), 102681. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102681

Song, Y. K., & Jo, D. H. (2022). Current and potential use of fresh frozen cadaver in surgical training and anatomical education. *Anat Sci Educ*, *15*(5), 957-969. https://doi.org/10.1002/ase.2138

Souchon, E. (1908). Embalming of bodies for teaching purposes. *The Anatomical Record*, *2*, 244-247.

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

Sun, Q. (2022). The Hydrophobic Effects: Our Current Understanding. *Molecules*, *27*(20). https://doi.org/10.3390/molecules27207009

Suruda, A. (2003). *Morticians. In: Occupational, Industrial, and Environmental Toxicology* (M. I. Greenberg, R. J. Hamilton, S. D. Phillips, & G. J. McCluskey, Eds.). Philadelphia, PA: Mosby Inc.

Suthipintawong, C., Leong, A. S., & Vinyuvat, S. (1996). Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol*, *15*(2), 167-174. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0339(199608)15:2<167::Aid-dc17>3.0.Co;2-f

Takahashi, S., Tsuji, K., Fujii, K., Okazaki, F., Takigawa, T., Ohtsuka, A., & Iwatsuki, K. (2007). Prospective study of clinical symptoms and skin test reactions in medical students exposed to formaldehyde gas. *J Dermatol*, *34*(5), 283-289. https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2007.00274.x

Tan, W. C. C., Nerurkar, S. N., Cai, H. Y., Ng, H. H. M., Wu, D., Wee, Y. T. F., Lim, J. C. T., Yeong, J., & Lim, T. K. H. (2020). Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun (Lond)*, *40*(4), 135-153. https://doi.org/10.1002/cac2.12023

Tanaka, K., Nishiyama, K., Yaginuma, H., Sasaki, A., Maeda, T., Kaneko, S. Y., Onami, T., & Tanaka, M. (2003). [Formaldehyde exposure levels and exposure control measures during an anatomy dissecting course]. *Kaibogaku Zasshi*, *78*(2), 43-51.

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

ThermoFisher. *Overview of Neural Cell Types and Related Antibody Targets*. https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/overview-neural-cell-antibody-targets.html

Toledo-Pereyra, L. H. (2015). Medical Renaissance. *J Invest Surg*, *28*(3), 127-130. https://doi.org/10.3109/08941939.2015.1054747

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

Troiano, N. W., Ciovacco, W. A., & 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*(1), 27-31. https://doi.org/10.1179/his.2009.32.1.27

Trompette, P., & Lemonnier, M. (2009). Funeral embalming: the singular evolution of a medical innovation. *Science & Technology Studies*, *22(2)*, 3-23.

Trujillo, R., & Lindell, K. F. (1973). New formaldehyde base disinfectants. *Appl Microbiol*, *26*(1), 106-110. https://doi.org/10.1128/am.26.1.106-110.1973

Udoaka, A. I., Oghenemavwe, L., & Ebenezer, T. (2009). Ancient Embalming Techniques Amongst The Ogoni Tribe In Southern Nigeria. *Journal of Experimental and Clinical Anatomy*, *8(2)*, 7-9.

Unboxing Big Data. (2025). *Understanding CNN (Part - 3) | Pooling in CNN | Types of Pooling | Max Pooling* https://www.youtube.com/watch?v=azRi6Bz7yc0

Unhale, S. A., Skubitz, A. P., Solomon, R., & Hubel, A. (2012). Stabilization of tissue specimens for pathological examination and biomedical research. *Biopreserv Biobank*, *10*(6), 493-500. https://doi.org/10.1089/bio.2012.0031

UQTR. (1993). https://oraprdnt.uqtr.uquebec.ca/portail/gscw031?owa_no_site=1313

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

Vasung, L., Charvet, C. J., Shiohama, T., Gagoski, B., Levman, J., & Takahashi, E. (2019). Ex vivo fetal brain MRI: Recent advances, challenges, and future directions. *Neuroimage*, *195*, 23-37. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.03.034

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

Viegas, S., Ladeira, C., Nunes, C., Malta-Vacas, J., Gomes, M., Brito, M., Mendonca, P., & Prista, J. (2010). Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: A study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production. *J Occup Med Toxicol*, *5*(1), 25. https://doi.org/10.1186/1745-6673-5-25

Vielkind, U., & Swierenga, S. H. (1989). A simple fixation procedure for immunofluorescent detection of different cytoskeletal components within the same cell. *Histochemistry*, *91*(1), 81-88. https://doi.org/10.1007/bf00501916

Vogels, O. J., Broere, C. A., ter Laak, H. J., ten Donkelaar, H. J., Nieuwenhuys, R., & Schulte, B. P. (1990). Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *11*(1), 3-13. https://doi.org/10.1016/0197-4580(90)90056-6

Vohra, M. S. (2011). Personal formaldehyde exposure level in the gross anatomy dissecting room at College of Medicine King Saud University Riyadh. *Int J Occup Med Environ Health*, *24*(1), 108-113. https://doi.org/10.2478/s13382-011-0004-4

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

Ward, J. M., & Rehg, J. E. (2014). Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting. *Vet Pathol*, *51*(1), 88-101. https://doi.org/10.1177/0300985813503571

Warren, J. D., Schott, J. M., Fox, N. C., Thom, M., Revesz, T., Holton, J. L., Scaravilli, F., Thomas, D. G., Plant, G. T., Rudge, P., & Rossor, M. N. (2005). Brain biopsy in dementia. *Brain*, *128*(Pt 9), 2016-2025. https://doi.org/10.1093/brain/awh543

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

Weiglein, A. H. (2002). Preservation and plastination. *Clin Anat*, *15*(6), 445. https://doi.org/10.1002/ca.10038

Weisbecker, V. (2012). Distortion in formalin-fixed brains: using geometric morphometrics to quantify the worst-case scenario in mice. *Brain Struct Funct*, *217*(2), 677-685. https://doi.org/10.1007/s00429-011-0366-1

Welniarz, Q., Dusart, I., & Roze, E. (2017). The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. *Dev Neurobiol*, *77*(7), 810-829. https://doi.org/10.1002/dneu.22455

Williams, C., Pontén, F., Moberg, C., Söderkvist, P., Uhlén, M., Pontén, J., Sitbon, G., & Lundeberg, J. (1999). A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol*, *155*(5), 1467-1471. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65461-2

Wolf, H. K., Buslei, R., Schmidt-Kastner, R., Schmidt-Kastner, P. K., Pietsch, T., Wiestler, O. D., & Blümcke, I. (1996). NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*, *44*(10), 1167-1171. https://doi.org/10.1177/44.10.8813082

Wolkoff, P., & Nielsen, G. D. (2010). Non-cancer effects of formaldehyde and relevance for setting an indoor air guideline. *Environ Int*, *36*(7), 788-799. https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.05.012

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, X., Deng, C., Su, Y., Zhang, C., Chen, M., Tian, K., Wu, H., & Xu, S. (2022). The effect of prolonged formalin fixation on the expression of proteins in human brain tissues. *Acta Histochem*, *124*(4), 151879. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2022.151879

Yamashita, S., & Okada, Y. (2005). Application of heat-induced antigen retrieval to aldehyde-fixed fresh frozen sections. *J Histochem Cytochem*, *53*(11), 1421-1432. https://doi.org/10.1369/jhc.4A6579.2005

Yetman, D. (2021). *What's the Difference Between Ethyl and Isopropyl Alcohol?* https://www.healthline.com/health/ethyl-alcohol-vs-isopropyl-alcohol#solutions-vs-100-alcohol

Yuan, F., Xiong, G., Cohen, N. A., & Cohen, A. S. (2017). Optimized Protocol of Methanol Treatment for Immunofluorescent Staining in Fixed Brain Slices. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *25*(3), 221-224. https://doi.org/10.1097/pai.0000000000000293

Zimmermann, M., Lampe, J., Lange, S., Smirnow, I., Königsrainer, A., Hann-von-Weyhern, C., Fend, F., Gregor, M., Bitzer, M., & Lauer, U. M. (2009). Improved reproducibility in preparing precision-cut liver tissue slices. *Cytotechnology*, *61*(3), 145-152. https://doi.org/10.1007/s10616-009-9246-4