



UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE EMSTU

UMR Inserm U 930 Imagerie et Cerveau - Equipe 5

THÈSE présentée par :

Ilyess ZEMMOURA

soutenue le : 25 juin 2015

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Science de la Vie et de la Santé

**Reconstruction des fibres blanches cérébrales à partir
de la dissection et recalage dans l'IRM post-mortem
pour la comparaison à la tractographie cérébrale par IRM de diffusion**

THÈSE dirigée par :

Pr. DESTRIEUX Christophe

PU-PH, Université François – Rabelais de Tours

Co-dirigée par :

Pr. VENTURINI Gilles

PU, Université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M. MANGIN Jean-François

Ingénieur-Chercheur (HDR), CEA Neurospin, Gif-sur-Yvette

Dr. SEIZEUR Romuald

MCU-PH (HDR), Université de Bretagne Occidentale

JURY :

Pr. DESTRIEUX Christophe

PU-PH, Université François – Rabelais de Tours

Pr. DUFFAU Hugues

PU-PH, Université Montpellier 1

M. MANGIN Jean-François

Ingénieur-Chercheur (HDR), CEA Neurospin, Gif-sur-Yvette

Dr. SEIZEUR Romuald

MCU-PH (HDR), Université de Bretagne Occidentale

Pr. VELUT Stéphane

PU-PH, Université François – Rabelais de Tours

Pr. VENTURINI Gilles

PU, Université François – Rabelais de Tours

*À mon épouse adorée, Bénédicte, qui me soutient et m'encourage au quotidien
dans mon choix de vie.*

À ma fille, Jeanne, et son petit frère à venir, sans qui tout cela serait vain.

À mes parents, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

*À mon frère, Adlane, sa compagne Caroline, et leurs enfants, qui malgré
l'éloignement resteront toujours aussi importants pour moi.*

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent aux personnes qui ont fait don de leur corps à la science et l'ont confié au Laboratoire d'Anatomie de Tours. Sans eux, ce travail n'aurait pu voir le jour.

Je remercie mon directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Christophe Destrieux, pour m'avoir guidé et soutenu tout au long de ce travail, mais également pour m'avoir inculqué la rigueur et la réactivité qu'imposent la recherche et la rédaction scientifique, et ce depuis mes premières années d'internat jusqu'à ce jour.

Je remercie mon co-directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Gilles Venturini, pour son soutien moral, pour avoir apporté un point de vue extérieur aux Neurosciences lors de l'avancement de ce travail, et avoir ainsi contribué au caractère transdisciplinaire de cette thèse.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Hugues Duffau, avec qui j'ai eu le privilège de travailler l'année passée et qui a accepté de présider le jury de cette thèse. Cette année dans votre service m'aura non seulement permis de perfectionner ma technique chirurgicale et mes connaissances neuro-anatomiques mais aussi et surtout transmis votre passion pour la médecine et votre ambition d'excellence qui me donnent la force et l'opiniâtreté que demandent mes objectifs. Aujourd'hui, vous jugez ce travail qui, j'espère, contribuera à la continuité des travaux que vous avez initiés dans ce domaine passionnant qu'est la connectivité cérébrale.

Je remercie également Monsieur le Professeur Stéphane Velut, qui m'a ouvert les portes du laboratoire d'Anatomie et qui m'a ouvert les yeux devant la beauté qui peut (parfois, si l'on y porte l'attention nécessaire) naître d'une représentation du corps humain. En tant que membre du jury de ce travail, j'espère vous y reconnaître un peu de ce que vous essayer de m'enseigner.

J'exprime ma reconnaissance envers Monsieur Jean-François Mangin et Monsieur le Docteur Romuald Seizeur pour l'attention et le temps qu'ils auront consacré à évaluer ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs et de participer au jury.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, c'est-à-dire à l'ensemble des membres du groupe Neuroanatomie-NeuroImagerie de l'Equipe 5 de l'unité Inserm U930 Imagerie et Cerveau - Frédéric Andersson, Laurent Barantin, Isabelle Filipiak et Jean-Philippe Cottier – et aussi tout particulièrement Barthélémy Serres avec qui nous avons avancé de front, lui sur le versant informatique et moi sur le versant anatomique, dans la réalisation de ce travail. Je remercie Carine Rougeron pour son aide logistique et administrative. Je remercie également Daniel Bourry pour toute la partie "prise de vue" de ce travail, ainsi que pour la "création" du poste de travail d'acquisitions photographiques de notre méthode de suivi de dissection.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans Cécilia Rousselot-Denis, Emmanuelle Blanchard et Pierre-Ivan Raynal qui se sont impliqués dans la partie microscopie électronique de ce travail, ainsi que sans l'aide technique de Julien Gaillard et scientifique du Professeur Philippe Roingard.

Pour conclure, j'adresse toute ma sympathie à l'équipe de Neurochirurgie de Tours qui m'a soutenu tout au long de mon cursus et pendant ce travail. Mes pensées vont plus particulièrement au Professeur Patrick François, aux Docteurs Louis-Marie Terrier et Jean-Edouard Loret, qui ont su me remonter le moral dans les moments difficiles, et avec qui il est toujours agréable non seulement de travailler mais aussi de se retrouver autour d'un café pour s'évader. Je pense également aux Montpellierains Guillaume Herbet, Sylvie Moritz-Gasser, Jérôme Cochereau et Guillaume Gras-Combes avec qui il a été un véritable plaisir de travailler.

Résumé

La connaissance de la morphologie des faisceaux de fibres blanches, qui connectent des régions cérébrales distantes, est indispensable à la compréhension du fonctionnement cérébral. La tractographie par IRM de diffusion reconstruit indirectement cette anatomie à partir d'algorithmes mathématiques complexes. Après une revue des méthodes proposées pour la validation de la tractographie, nous proposons une méthode originale basée sur la reconstruction 3D de faisceaux disséqués. Notre méthode, FIBRASCAN, utilise des acquisitions itératives de surface en cours de dissection. Les faisceaux étaient segmentés sur chaque surface puis reconstruits par empilement. Un support rigide permettait le recalage entre surfaces puis vers l'IRM. Nous avons démontré la précision de chaque étape de reconstruction, et sa faisabilité sur plusieurs faisceaux. Dans la dernière partie de ce travail, la structure des fibres blanches et les modifications induites par la préparation et la dissection sont explorées en microscopie électronique. Nous avons montré que la dissection préservait la structure des axones et peut ainsi être considérée comme un outil de validation de la tractographie.

Résumé en anglais

The knowledge of the morphology of white matter fiber tracts, which connect distant cerebral areas, is essential to better understand brain functions. Diffusion MR tractography indirectly reconstructs this anatomy using complex mathematical algorithms. After a review of the existing methods for tractography validation, we propose an original method based on 3D reconstruction of dissected tracts. Our method, FIBRASCAN, used iterative surface acquisitions during dissection. The tracts were segmented on each surface and then reconstructed by stacking these surfaces. A rigid support allowed registration between surfaces and then registration to MRI. We demonstrated the accuracy of each reconstructing step, and the feasibility of our method on several tracts. In the last part of this work, the structure of white matter fibers and the changes induced by preparation and dissection were investigated using electron microscopy. We showed that dissection preserves the structure of axons and can thus be considered as a validation tool for tractography.

Liste des abréviations

ADC : Apparent Diffusion Coefficient (anglais)

CCD : Charged-Coupled Device

CSD : Constrained Spherical Deconvolution

DNG : Digital Negative (Format Raw standardisé)

DSI : Diffusion Spectrum Imaging

DTI : Diffusion Tensor Imaging

FA : Fraction d'Anisotropie

HARDI : High Angular Resolution Diffusion Imaging

HES : Hematoxyline Éosine Safran

ICP : Iterative Closest Point

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

JPG ou JPEG : Joint Photographic Expert Group (format d'enregistrement photographique)

LCS : Liquide Cérébro-Spinal

ME : Microscopie Électronique

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

MET : Microscopie Électronique en Transmission

OBJ : Format de fichier contenant la description d'une géométrie.

OCT : Optical Coherence Tomography

ODF : Orientation Distribution Function

PLI : Polarized Light Imaging

PVC : Polychlorure de vinyle (PolyVinyl Chloride en anglais)

RGB : Red Green Blue (pour Rouge Vert Bleu, codage informatique des couleurs)

ROI : Region of Interest

STL : Format de logiciel utilisé en stéréolithographie.

USB : Universal Serial Bus

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	4
Résumé en anglais	5
Liste des abbréviations	6
Table des matières	7
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des annexes	13
Introduction générale	14
I. Première partie - Histoire des théories cognitives et des méthodes d'exploration de l'anatomie cérébrale	17
1. De l'Antiquité à la Renaissance	18
2. Le XIX^{ème} siècle : apparition des modèles cognitifs	21
2.1. Phrénologie contre holisme.....	21
2.2. Le localisationnisme	21
2.3. L'associationnisme	23
2.4. L'apport des travaux anatomiques de Jules Dejerine	25
3. Le début du XX^{ème} siècle : vers la méthode de Klingler et le néo-associationnisme de Geschwind	28
3.1. Une méthode méconnue, la méthode de Klingler.....	28
3.2. Le néo-associationnisme de Geschwind.....	30
4. La fin du XX^{ème} siècle : l'ère du marquage axonal	32
4.1. Marquage axonal antérograde et rétrograde chez le macaque	32
4.2. Marquage post mortem des fibres blanches cérébrales	34
5. Le début du XXI^{ème} siècle : l'avènement de la tractographie cérébrale de diffusion	36
5.1. La diffusion de l'eau en IRM	36
5.2. Le tenseur de diffusion	38
5.3. Les limites du tenseur et les techniques HARDI	39
5.4. Les algorithmes de tractographie	40
5.5. Les limites de la tractographie cérébrale.....	42
II. Deuxième Partie - État de l'art Les méthodes de validation de la tractographie	
IRM	44
Introduction	45

6. Approches par objets tests et simulation numérique	46
6.1. Objets tests biologiques	46
6.2. Objets tests synthétiques.....	46
6.3. Approches numériques	47
7. Méthodes utilisant une action <i>in vivo</i>, non utilisables chez l'Homme	49
7.1. Marquage axonal rétrograde chez le macaque.....	49
7.2. Marquage axonal au manganèse.....	50
8. Méthodes utilisables chez l'Homme.....	52
8.1. Comparaison indirecte aux travaux anatomiques et histologiques.....	52
8.2. Imagerie en lumière polarisée.....	55
8.3. Tomographie en cohérence optique	57
8.4. Comparaison directe dissection - tractographie <i>post mortem</i>	57
Conclusion.....	60
III. Troisième partie Reconstruction 3D des fibres blanches à partir de la	
dissection : FIBRASCAN	63
Introduction.....	64
9. FIBRASCAN : Méthode de suivi de dissection et de reconstruction 3D dans l'IRM ..	67
9.1. Préparation de Klingler	67
9.2. Support rigide.....	67
9.3. IRM <i>post mortem</i>	68
9.4. Dissection de Klingler et acquisitions de surfaces itératives.....	69
9.5. Projection de texture.....	71
9.6. Recalage Surface-Surface.....	72
9.7. Segmentation interactive.....	73
9.8. Reconstruction tridimensionnelle	73
9.9. Recalage Surface-IRM.....	74
10. Evaluation de FIBRASCAN	77
10.1. Évaluation du recalage surface-surface et de la reproductibilité de l'acquisition de surface	77
10.2. Évaluation de la déformation du spécimen en cours de dissection	79
10.3. Évaluation de la distance entre deux étapes de dissection.....	80
10.4. Évaluation de la reconstruction 3D des faisceaux.....	81
10.5. Évaluation du recalage surface-IRM.....	82
10.6. Précision globale de la méthode	83
11. Discussion.....	85

IV. Quatrième partie Impact de la méthode de Klingler sur la structure	
microscopique de la substance blanche cérébrale.....	87
Introduction.....	88
12. Effet de la congélation-décongélation sur l'histologie de la substance blanche	90
12.1. Méthode	90
12.2. Résultat.....	90
13. Effet combiné de la congélation-décongélation et de la fixation sur l'ultrastructure	
de la substance blanche	92
13.1. Méthode	92
13.1. Résultats.....	93
13.1.1. Effet de la fixation au formol sur l'ultrastructure de la substance blanche.....	93
13.1.2. Effet de la congélation-décongélation : altération des espaces extra-axonaux mais	
préservation des gaines de myéline	95
14. Effets de la dissection sur l'ultrastructure des fibres blanches	96
14.1. Méthode	96
14.2. Résultat : la dissection de Klingler préserve la structure axonale.....	97
15. Discussion	99
15.1. De nouvelles preuves sur les effets de la préparation et de la dissection de Klingler	
sur la substance blanche.....	99
15.2. La spécificité du processus de congélation de Klingler	100
15.3. La microscopie électronique, une méthode sous-utilisée pour explorer la matière	
blanche ultrastructure.....	101
Conclusion.....	103
Conclusion générale	105
Résumé.....	158
Abstract.....	158

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison synthétique des avantages et inconvénients de chacune des méthodes de validation de la tractographie, par rapport à la tractographie in vivo_____	61
Tableau 2. Évaluation de la reconstruction de faisceau à partir d'un objet test (œuf dur). _____	82
Tableau 3. Précision de la méthode FIBRASCAN. _____	84

Liste des figures

Figure 1. Illustration provenant de l'œuvre de Raymond de Vieussens, <i>Neurographia Universalis</i> (1684).	19
Figure 2. Planche XXV du <i>Traité d'Anatomie et de Physiologie</i> de Félix Vicq d'Azyr, publié en 1786. .	20
Figure 3. Le réseau du langage, tel qu'illustré dans la thèse de médecine de Carl Wernicke en 1874.	23
Figure 4. Illustrations du cas de Monsieur C., patient de Jules Dejerine (1849-1917) atteint de cécité verbale sans agraphie, publié en 1892.	24
Figure 5. Illustrations de 1895 par H. Gillet dans l'ouvrage de Dejerine (1849-1917) intitulé <i>Anatomie des centres nerveux</i> .	27
Figure 6. Extraits de l' <i>Atlas Humani Cerebri</i> de Ludwig et Klingler, 1956.	29
Figure 7. Illustrations issues de <i>Fiber Pathways of the Brain</i> , l'ouvrage de Schmahmann et Pandya basé sur l'autoradiographie de cerveaux de macaques rhésus.	33
Figure 8. Composition des fibres blanches cérébrales et impact sur la diffusion des molécules d'eau.	37
Figure 9. Forme de l'ellipsoïde en fonction du type de diffusion.	39
Figure 10. Principe des modèles HARDI.	40
Figure 11. Deux critères de terminaison d'algorithme de tractographie déterministe.	41
Figure 12. Exemple de tractographie déterministe.	41
Figure 13. Objet-test synthétique.	47
Figure 14. Représentation de la diffusion sous forme d'ellipsoïde.	48
Figure 15. Comparaison Tractographie / Marquage axonal rétrograde chez le macaque.	49
Figure 16. Comparaison entre marquage au manganèse et tractographie probabiliste d'un même cerveau de <i>minipig</i> .	51
Figure 17. Comparaison entre le cas de J. Dejerine publié en 1892 et le cas d'Epelbaum et al. [2008].	52
Figure 18. Comparaison entre étude du trajet des fibres du faisceau arqué de macaque par autoradiographie et par tractographie sur des données de Diffusion Spectrum Imaging (DSI).	53
Figure 19. Études comparant tractographie IRM et dissection de Klingler.	54
Figure 20. Principe de l'Imagerie en lumière polarisée.	55
Figure 21. Reconstruction de fibres au sein d'un voxel de $5 \times 5 \times 1$ mm dans la région pontique, à partir de l'acquisition en imagerie en lumière polarisée d'une coupe de cerveau humain.	56
Figure 22 Tomographie en cohérence optique de cerveau de rat.	57
Figure 23. Méthode proposée pour localiser un faisceau mis en évidence en dissection sur l'IRM du même spécimen. D'après Kier et al. [2004a].	59
Figure 24. Segmentation des faisceaux formant le pédoncule temporal.	65
Figure 25. Platine-support.	68
Figure 26. Acquisition IRM volumique pondérée en T1 en Inversion-Récupération, voxels cubiques $1 \times 1 \times 1$ mm, d'un hémisphère cérébral dans sa platine-support avec repères, avant dissection.	69
Figure 27. Six des 61 étapes de dissection de cet hémisphère gauche, en prise de vue orthogonale.	70
Figure 28. Poste de travail pour les acquisitions de surface en cours de dissection.	71

Figure 29. Résultat de la projection de texture sur la surface initiale de l'hémisphère.	72
Figure 30. Segmentation de la surface 26 d'un hémisphère gauche (capture d'écran de la plateforme logicielle dédiée).	73
Figure 31. Voxellisation des données surfaciques.	74
Figure 32. Translation nécessaire au recalage surface-IRM liée à la distance d existant entre les points repères surfaciques (vert) et le centre des sphères repères IRM.	75
Figure 33. Résultat final du recalage des données surfaciques dans l'IRM.	75
Figure 34. Reconstruction de plusieurs faisceaux d'association dans le référentiel de l'IRM avec FIBRASCAN.	76
Figure 35. Recalage surface-surface et reproductibilité de l'acquisition de surface.	78
Figure 36. Évaluation de la déformation induite par dissection.	79
Figure 37. Résolution spatiale de la méthode, évaluée par la distance entre étapes consécutives de dissection.	80
Figure 38. Recalage surface-IRM.	83
Figure 39. Exemple de gestion d'un croisement de fibres lors d'une dissection de Klingler.	85
Figure 40. Microscopie optique à faible grossissement ($\times 10$) d'échantillons de cerveau humain fixés et colorés à l'hématoxyline éosine safran (HES).	91
Figure 41. Microscopie électronique en transmission de prélèvements de cingulum.	94
Figure 42. Microscopie électronique en transmission à très fort grossissement d'échantillons de cingulum humain.	94
Figure 43. Localisation des échantillons réalisés pour les observations en microscopie électronique.	96
Figure 44. Microscopie électronique à balayage d'échantillons de corps calleux fixés au formol.	98
Figure 45. Microscopie électronique à balayage d'échantillons de corps calleux fixés au formol.	98

Liste des annexes

Annexe 1 : Première contribution – FIBRASCAN: A novel method for 3D white matter tract reconstruction in MR space from cadaveric dissection (2014) <i>NeuroImage</i> .	120
Annexe 2 : Deuxième contribution – How Klingler's dissection permits exploration of brain structural connectivity? An electron microscopy study of human white matter (2015) <i>Brain Structure and Function</i> .	134
Annexe 3 : Plan expérimental du projet FIBRATLAS	147
Annexe 4 : Article scientifique publié en tant que collaborateur – Brain virtual dissection and white matter 3D visualization. Serres B, Zemmoura I , Andersson F, Tauber C, Destrieux C, Venturini G. <i>Studies in Health Technology and Informatics 2013;184:392-396</i> .	149
Annexe 5 : Présentation de poster dans un congrès scientifique – FIBRASCAN: a novel method for 3D white matter tract reconstruction in MR space from cadaveric dissection. Zemmoura I , Serres B, Andersson F, Tauber C, Barantin L, Filipiak I, Venturini G, Destrieux C. <i>ISMRM Workshop on Diffusion as a Probe of Neural Tissue Microstructure in Podstrana, Croatia 14-18 October 2013</i>	155

Introduction générale

Les processus cognitifs peuvent être définis comme les processus mentaux dont la fonction est la connaissance. On distingue habituellement les processus dits "de haut niveau" – tels que le raisonnement, la mémoire, le langage, la prise de décision, ou l'attention – des fonctions plus élémentaires telles que la perception et la motricité. Les émotions, bien que se rapportant à la fonction affective classiquement opposée aux processus cognitifs, sont indissociables du raisonnement et de la prise de décision et peuvent ainsi être également considérées comme appartenant au champ des fonctions cognitives. Chacune de ces fonctions met en jeu différentes régions cérébrales qui communiquent entre elles. Le cerveau est ainsi organisé en réseaux plus ou moins vastes et complexes selon la tâche à accomplir. La structure de ces réseaux est sous-tendue par l'anatomie, c'est-à-dire l'architecture des fibres blanches cérébrales, véritables câbles regroupés en faisceaux connectant les corps neuronaux, eux-mêmes regroupés au sein de la substance grise cérébrale en aires corticales (sur l'écorce cérébrale) ou noyaux profonds. Avant d'aboutir à nos connaissances actuelles sur le fonctionnement cérébral, et sur le rôle majeur des fibres blanches dans l'accomplissement des processus cognitifs, de nombreuses théories ont été développées pour tenter d'identifier le siège de l'âme et son fonctionnement.

La *première partie* de notre travail retrace le cheminement des concepts fonctionnels neuro-cognitifs, qui ont avancé de front avec les concepts anatomiques et les progrès techniques. Nous détaillons dans cette partie les interactions complexes et non linéaires qui se sont créées au fil du temps entre les trois domaines : technique, anatomique et fonctionnel. Nous montrons ainsi que l'intérêt anatomique pour les fibres blanches cérébrales est allé de pair avec celui porté à la connectivité cérébrale, ces deux champs d'études motivant et étant soutenus à la fois par les méthodes d'études développées simultanément. Ainsi, dès la découverte des méthodes de dissection des fibres blanches, leur utilisation a été limitée par une utilisation *ex vivo* exclusive et par un intérêt de la communauté des neurosciences alors surtout focalisé sur le cortex cérébral. Un regain d'intérêt pour l'organisation morpho-fonctionnelle de la substance blanche cérébrale humaine n'est survenu que récemment avec l'apparition de la tractographie cérébrale de diffusion, une technique d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) utilisable *in vivo*. Néanmoins, bien que les résultats de la tractographie soient globalement cohérents avec les données anatomiques, le besoin de validation de la tractographie cérébrale s'est très tôt fait ressentir et de nombreuses approches ont été développées pour permettre une comparaison des résultats de la tractographie IRM à la réalité sous-jacente.

Dans la *seconde partie* de notre travail, nous faisons l'état de l'art des multiples tentatives de validation de la tractographie de diffusion IRM qui ont été proposées, aucune n'étant pleinement satisfaisante. Nous développons ensuite l'intérêt de l'utilisation de la dissection selon la méthode de Klingler pour cette validation, en argumentant ses avantages et inconvénients.

Dans la *troisième partie*, nous présentons une méthode originale de suivi de dissection permettant la reconstruction tridimensionnelle des faisceaux disséqués selon la méthode de Klingler et leur recalage dans le référentiel de l'IRM. Cette méthode, FIBRASCAN, est un pré-requis au projet FIBRATLAS, ayant pour objectif la validation de la tractographie par comparaison à l'anatomie sous-jacente chez les mêmes individus.

Dans la *quatrième partie*, nous nous intéressons à l'impact de la préparation de Klingler et de la dissection sur la structure microscopique des fibres blanches cérébrales. Ce travail est original car, bien que la méthode de dissection de Klingler ait été régulièrement utilisée pour décrire les faisceaux de fibres blanches, le mécanisme n'en a jamais clairement été établi. La compréhension de ce mécanisme est également un pré-requis indispensable à l'utilisation de la dissection en tant qu'outil de validation de la tractographie cérébrale.

I. Première partie -
**Histoire des théories cognitives et des
méthodes d'exploration de l'anatomie
cérébrale**

1. De l'Antiquité à la Renaissance

Dans l'antiquité et au moyen âge, les conceptions anatomiques et physiologiques étaient centrées sur une division morpho-fonctionnelle tripartite du corps en « ventres », chacun correspondant à une cavité : ventre inférieur (l'abdomen et le pelvis, siège de l'esprit naturel associé à la reproduction et de l'alimentation), ventre moyen (le thorax, siège de l'esprit vital), et ventre supérieur (le crâne, siège de l'esprit animal, capable d'animer le corps, de le faire bouger). Dans cette conception, ces esprits se transformaient l'un en l'autre ; ainsi, l'esprit vital, thoracique, cheminait par les artères, supposées remplies d'air, jusqu'au ventre supérieur qu'il pénétrait via le *rete mirabile*, un réseau vasculaire complexe situé à la base du cerveau décrit par Galien. Ce réseau admirable était le lieu de transformation de l'esprit vital en esprit animal au niveau du *rete mirabile*. L'esprit animal était alors logé non dans le parenchyme mais dans des « cellules » qui lui offraient des cavités dont la spécialisation fonctionnelle a été conservée au moyen âge et à la renaissance : cette théorie cellulaire décrivait ainsi des cellules dévolues à la mémoire, à l'intelligence... L'anatomie ventriculaire, composée de plusieurs compartiments offrait alors un substrat morphologique à cette théorie fonctionnelle.

Lorsque l'anatomiste flamand André Vésale (1514-1564) a montré que le *rete mirabile* décrit par Galien chez l'animal n'existait pas chez l'homme, il a néanmoins conservé cette conception de « cerveau réceptacle » de l'esprit animal ; le point de transformation des esprits vital à animal s'est alors simplement déplacé du *rete mirabile* au plexus choroïde. Il faut préciser que les travaux anatomiques de Vésale, qui opérait sur cadavre frais, étaient limités par la consistance molle du tissu cérébral frais. Ainsi, bien que Vésale fut le premier à différencier, dans son œuvre *De humani corporis fabrica* (1543), la substance blanche cérébrale de la substance grise, et bien qu'il ait suggéré que la substance blanche n'était pas uniforme en la désignant comme connectant les deux hémisphères, ce sont Thomas Willis (1621-1675) et Sylvius qui au XVII^{ème} siècle ont les premiers localisé la fonction dans le parenchyme cérébral.

Thomas Willis, Marcello Malpighi (1628-1686) puis Raymond de Vieussens (1641-1716) ont prouvé l'organisation de la substance blanche en faisceaux de fibres. Leurs travaux ont bénéficié d'avancées méthodologiques telles que l'usage du microscope et la cuisson dans

l'eau ou dans l'huile pour obtenir un durcissement suffisant du cerveau permettant la mise en évidence de l'organisation de la substance blanche en fibres. Marcello Malpighi a montré à l'aide d'un microscope que la substance blanche médullaire prolongeait celle du cerveau ; Thomas Willis a montré que la moelle allongée était organisée en *tracti* ; tandis que Raymond de Vieussens (Figure 1), anatomiste et médecin français sous le règne de Louis XIV, a été le premier à parler de *centre ovale* pour définir l'organisation des fibres blanches hémisphériques.

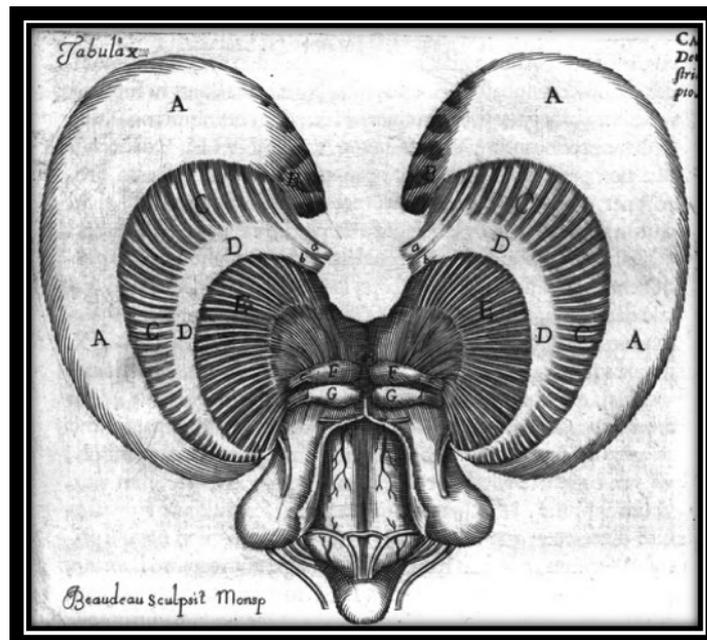


Figure 1. Illustration provenant de l'œuvre de Raymond de Vieussens, *Neurographia Universalis* (1684). Les fibres de projection du centre ovale (A) traversent le corps strié (C et E) pour former les pédoncules cérébraux.

Au cours du XVIII^{ème} siècle, les progrès dans la compréhension de l'organisation morphologique du cerveau furent limités. Félix Vicq d'Azyr (1748-1794), médecin, anatomiste et naturaliste français considéré comme le fondateur de l'anatomie comparée, a le premier utilisé en 1786, dans son *Traité d'Anatomie et de Physiologie*, une technique de durcissement par l'alcool. Malgré l'imperfection de cette méthode, ses dissections s'en sont trouvées facilitées. Il a ainsi mis en évidence le *centre ovale* qu'il a renommé *centre semi-ovale*, la capsule interne, et suivi les fibres du faisceau pyramidal depuis les pyramides du myelencéphale jusqu'aux noyaux lenticulaires, et ainsi que des structures extrêmement fines telles le faisceau mamillo-thalamique (Figure 2).

Par la suite, Johann Christian Reil (1759-1813), anatomiste et psychiatre allemand surtout connu pour avoir décrit l'insula, a introduit le terme de *corona radiata* et décrit la capsule interne, la capsule externe, les pédoncules cérébraux, le corps calleux, la commissure antérieure et le faisceau unciné.

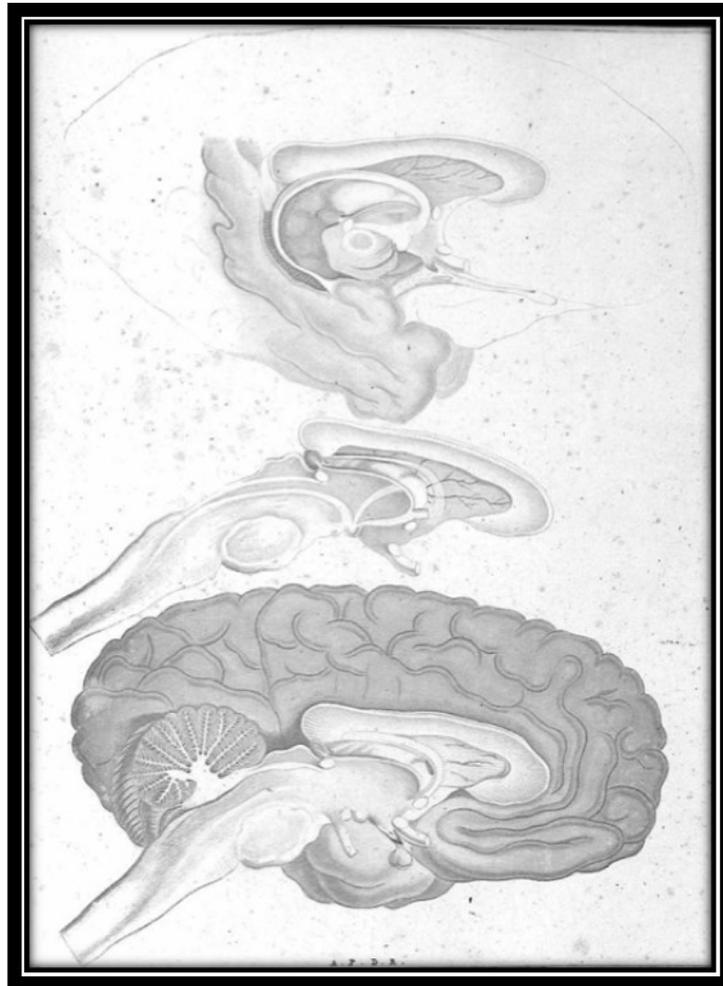


Figure 2. Planche XXV du *Traité d'Anatomie et de Physiologie* de Félix Vicq d'Azyr, publié en 1786, et montrant une vue oblique inférieure d'un hémisphère cérébral gauche permettant d'individualiser les différentes structures du faisceau mamillo-thalamique.

2. Le XIXème siècle : apparition des modèles cognitifs

2.1. Phrénologie contre holisme

Si Franz Joseph Gall (1758-1828), anatomiste et physiologiste allemand, a été l'un des premiers à proposer que la substance blanche hémisphérique connecte des régions corticales distantes, il est plus connu pour avoir diffusé, avec son disciple Johan Gaspar Spurzheim (1776-1832), les préceptes de la phrénologie. Cette théorie énoncée dans l'ouvrage : *Anatomie et physiologie du système nerveux en général, et du cerveau en particulier, avec des observations sur la possibilité de reconnaître plusieurs dispositions intellectuelles et morales de l'homme et des animaux par la configuration de leur tête* [Gall and Spurzheim, 1810] considérait que les fonctions cérébrales étaient localisées dans des régions précises du cerveau. Or, le développement du cerveau influençant la forme du crâne, Gall émit l'hypothèse qu'une fonction cérébrale particulièrement développée inscrivait sa "trace" sur le crâne, et tenta de valider cette hypothèse en fondant une discipline baptisée la crânioscopie, mesurant avec précision la taille et la localisation des bosses crâniennes et les corrélant aux traits psychologiques des sujets.

Parallèlement à la phrénologie, s'est développée une théorie holistique du cerveau critiquant sévèrement les méthodes des phrénologistes. Pierre Flourens (1794-1867), figure majeure de ce courant, considérait, sur la base d'observations des oiseaux, que le cerveau était un organe indifférencié qui fonctionnait comme un tout dans la production de la pensée.

2.2. Le localisationnisme

Finalement, du fait de nombreux biais méthodologiques, la phrénologie déclina rapidement pour disparaître dans les années 1840 et céda sa place à la théorie localisationniste, portée notamment par le neurologue et chirurgien de l'hôpital de Bicêtre, Paul Pierre Broca (1824-1880).

Du point de vue méthodologique, les travaux de Stilling, commencés en 1842, ont permis l'application de l'histologie à l'étude du système nerveux par la méthode des *coupes en séries*. Cette méthode de Stilling est basée sur l'examen histologique et à un faible

grossissement, de coupes minces et sériées, pratiquées sur des pièces préalablement durcies au moyen de l'alcool. L'apport considérable de cette méthode a rendu possible le développement des théories cognitives présentées ci-dessous, toutes basées sur des observations cliniques couplées à une étude anatomique autopsique de patients porteurs de lésions cérébrales plus ou moins circonscrites.

Le localisationnisme est né de ce type d'observations anatomo-cliniques. Il est un modèle, qui avance l'idée de centres individualisés dans le cerveau, spécialisés dans une fonction précise. Bien que Marc Dax (1770-1837), médecin français ayant servi comme chirurgien des armées de Napoléon, a probablement le premier décrit l'hémisphère gauche comme siège du langage dans une communication orale (dont il ne reste aucune trace écrite) présentée en 1836 au *Congrès Méridional de Montpellier*, Paul Broca a affirmé avoir découvert le centre du langage articulé et a défendu sa thèse à partir de la célèbre observation de M. Leborgne, présentée en 1861 à la *Société Anatomique* [Broca, 1861a; Broca, 1861b]. Ce patient avait développé une aphasie suite à une lésion cérébrale due à la syphilis. Cette lésion, localisée suite à l'examen *post mortem* du cerveau de M. Leborgne, était centrée sur le gyrus frontal inférieur gauche. M. Leborgne ayant majoritairement développé un trouble de production du langage articulé (il ne pouvait prononcer que la syllabe "Tan"), Paul Broca en avait conclu qu'une lésion de la troisième circonvolution frontale gauche provoquait une aphasie de production du langage sans trouble de compréhension, trouble appelé par Broca "aphémie", dit plus tard aphasie motrice ou "aphasie de Broca".

L'essor du localisationnisme dans la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle a contribué aux descriptions de plus en plus fidèles du cortex cérébral, comme notamment les travaux de Pierre-Louis Gratiolet (1815-1865), anatomiste, anthropologue et zoologiste français, qui a établi la nomenclature des lobes et gyri cérébraux telle qu'elle est encore utilisée de nos jours. Cet intérêt pour l'anatomie corticale ne laissa que peu de place aux travaux des quelques anatomistes qui ont réalisé des découvertes pourtant majeures sur l'anatomie morphologique des fibres blanches cérébrales. Ainsi, Gratiolet est également connu pour avoir étudié en détail les radiations optiques et leur avoir attribué une fonction sensorielle, la vue ; Karl Friedrich Burdach (1776-1847), anatomiste allemand, a identifié le tapetum, le cingulum, et le faisceau longitudinal inférieur ; et Theodor Hermann Meynert (1833-1892), anatomiste et psychiatre allemand, a systématisé de manière détaillée les faisceaux de substance blanche et a établi la classification des fibres en trois groupes : les fibres de projection (connectant le cortex cérébral et cérébelleux aux noyaux gris centraux ou à la moelle épinière), les fibres

d'association (connectant des régions corticales distantes au sein d'un même hémisphère), et les fibres commissurales (connectant les deux hémisphères cérébraux entre eux).

2.3. L'associationnisme

Peu de temps après la démonstration de Broca, Carl Wernicke (1848-1905), neurologue et psychiatre allemand, élève de Meynert, décrit en 1874 le premier modèle de réseau du langage, qui sera à l'origine des hypothèses associationnistes. Ses travaux identifièrent une forme d'aphasie fluente ou aphasie sensorielle ou aphasie de Wernicke. Cette forme d'aphasie était, selon les observations de Wernicke, dominée par des troubles de compréhension, sans difficulté de production de langage mais avec de nombreuses paraphrasies¹ voire une jargonaphasie.² Dans sa démonstration, il décrit le *centre des images auditives du langage*, situé à la partie postérieure de la première circonvolution temporale gauche, qu'il définit comme étant l'aire "sensorielle" du langage, qui sera plus tard appelée "aire de Wernicke". Si cette démonstration émanait du localisationnisme, il élaborait dans le même temps l'hypothèse d'une connexion entre le *centre moteur du langage* (l'aire de Broca) et le *centre des images auditives du langage* (l'aire de Wernicke), matérialisée par les fibres sous insulaires, et dont la lésion pouvait à elle seule provoquer une aphasie dite de conduction (Figure 3). Dans ce travail, il ne décrivait toutefois pas le support anatomique permettant cette connexion.

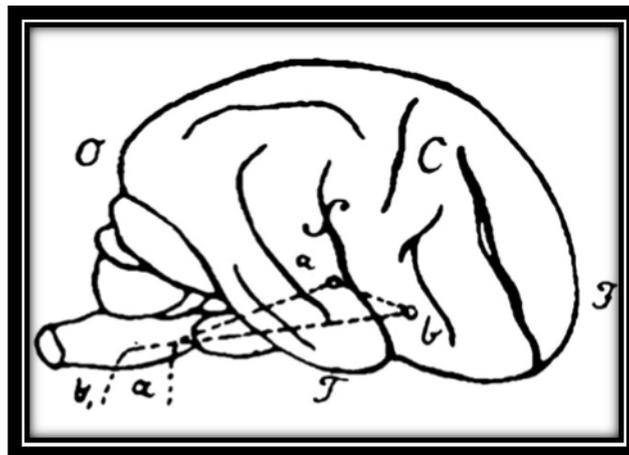


Figure 3. Le réseau du langage, tel qu'illustré dans la thèse de médecine de Carl Wernicke en 1874.

¹ Une paraphrasie est un trouble du langage oral constitué par des transformations de phonèmes ou de mots.

² Une jargonaphasie est un trouble du langage caractérisé par la substitution de termes inintelligibles ou inadéquats aux mots appropriés.

La fin du XIX^{ème} siècle a vu la publication des travaux de Joseph Jules Dejerine (1849-1917), anatomiste et neurologue français d'origine polonaise, détailler la morphologie et argumenter la fonction des structures cérébrales, y compris des fibres blanches cérébrales. Dans une publication de 1892 intitulée *Contribution à l'étude anatomo-pathologique et clinique des différentes variétés de cécité verbale* [Dejerine, 1892], Jules Dejerine décrit le cas d'un patient atteint de cécité verbale (ou alexie) sans agraphie,³ et a ainsi été le premier à montrer qu'une lésion d'un faisceau de fibres blanches, en l'occurrence un infarctus du faisceau longitudinal inférieur gauche et du splénium du corps calleux, pouvait être à l'origine d'un syndrome dit "de déconnexion" (Figure 4) : selon Dejerine, bien que le *centre visuel des lettres* (*pli courbe* ou *gyrus angulaire gauche*) soit intact et que les images des lettres puissent être perçues par les aires visuelles du lobe occipital droit intact, elles ne pouvaient être décryptées en termes linguistiques par le *centre visuel des lettres* du fait d'un défaut de transmission par le splénium calleux. En revanche, le *centre visuel des lettres* étant intact le patient ne présentait pas d'agraphie associée. Il a ainsi été l'un des pionniers, avec Carl Wernicke (1848-1905), de la théorie connexionniste du fonctionnement cérébral, aujourd'hui largement admise.

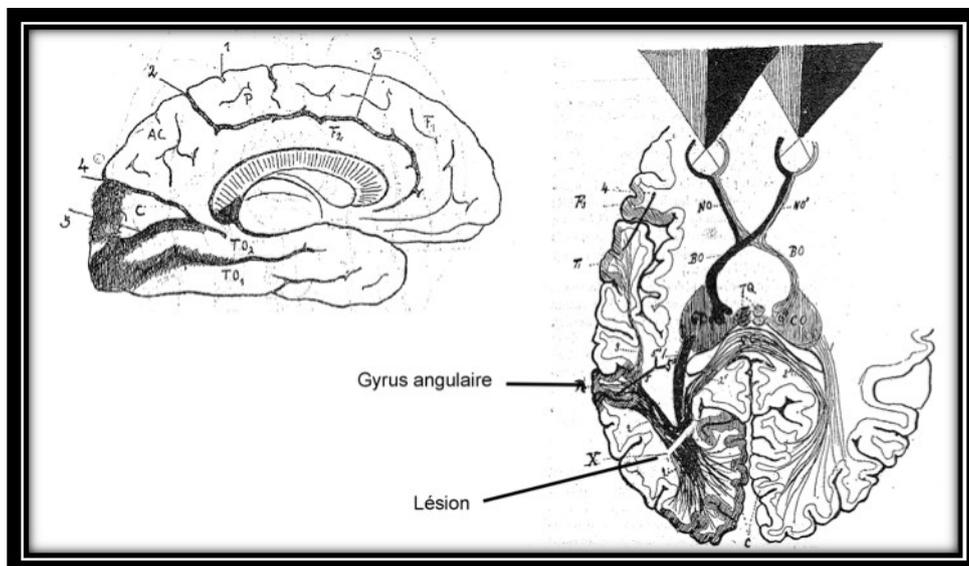


Figure 4. Illustrations du cas de Monsieur C., patient de Jules Dejerine (1849-1917) atteint de cécité verbale sans agraphie, publié en 1892. La lésion retrouvée à l'autopsie intéressait le cunéus gauche (C, image de gauche), le gyrus lingual gauche (TO₂), la substance blanche profonde des ces deux gyri, et la portion antéro-inférieure du splénium du corps calleux, tandis que le gyrus angulaire était intact.

³ Alexie sans agraphie (ou alexie pure) : perte de la capacité de lire, tout en conservant la capacité d'écrire et de parler.

Dejerine explique l'alexie par une interruption de la connexion entre le centre visuel commun (cuneus et pôle occipital) et le centre des images optiques des lettres, qu'il situe à l'époque dans le gyrus angulaire. L'absence d'agraphie est expliquée par non seulement l'absence de perte du centre de l'image optique des lettres (gyrus angulaire) mais également et l'absence de déconnexion entre centre visuel des lettres et zones motrices.

2.4. L'apport des travaux anatomiques de Jules Dejerine

Jules Dejerine a ensuite publié en 1895 avec son épouse, Augusta Dejerine-Klumpke, *Anatomie des centres nerveux* [Dejerine and Dejerine-Klumpke, 1895], ouvrage détaillant la structure du système nerveux humain et les techniques permettant son exploration (cf. infra).

À l'époque de Dejerine, la méthode des coupes sériées de Stilling avait déjà été perfectionnée tant pour la méthode de durcissement des pièces, qui ne se faisait plus au moyen de l'alcool mais des bichromates, que grâce à la découverte du microtome qui simplifiait la confection des séries. Enfin, différentes méthodes de coloration des gaines de myéline (notamment la méthode de Weigert, 1884) ont donné à la méthode de Stilling une précision remarquable. Cependant, Dejerine le reconnaissait lui-même, bien que cette méthode ait donné des résultats remarquables pour l'étude de la moelle épinière et du tronc cérébral, son emploi pour l'étude du cerveau se heurtait à de nombreuses difficultés. En effet, appliquée au cerveau humain, cette méthode était longue et pénible, du fait de la grande surface des coupes de cerveau.

Dejerine ne s'en est toutefois pas tenu uniquement à cette méthode de Stilling, qu'il a contrôlée avec d'autres méthodes telles que :

- *l'Anatomie pathologique* et la méthode des dégénérescences secondaires. Cette méthode se basait sur la découverte par Waller, en 1852, dans ses travaux sur les nerfs périphériques, de l'apparition, après section, d'une dégénérescence des fibres nerveuses en distalité de leur centre trophique. Cette méthode a ensuite été appliquée au cerveau où il a été constaté, de la même manière, une dégénérescence des faisceaux sur toute leur longueur à la suite de lésions cérébrales corticales ou centrales.

- *l'Anatomie de développement*, ou l'étude de l'apparition de la myéline dans tel ou tel faisceau, ou méthode de Fleshsig. Elle reposait sur le fait que les différents systèmes de fibres du système nerveux central se « recouvrent » de myéline, à une époque déterminée et variable suivant les faisceaux.

- la *Pathologie expérimentale* ou méthode de Gudden, qui nécessitait de pratiquer sur des animaux nouveau-nés des lésions du système nerveux et d'observer la dégénérescence Wallerienne qui était beaucoup plus prononcée et plus rapide que s'il s'agissait d'un animal adulte.

- et enfin l'*Embryologie* et la *Tératologie*, basées sur l'exploration de la conformation du névraxe à différentes périodes de son développement, ou, pour la tératologie, en cas d'arrêt de développement ou de malformation.

Ainsi, concernant la dissection des fibres blanches cérébrales, Dejerine fait état de ses limitations, l'ayant conduit à proposer une approche combinée, en ces termes :

"L'entre-croisement des trois systèmes [d'association, de projection et commissural] de fibres est très intime, leur dissociation est souvent extrêmement difficile, et il est aisé de prévoir que l'on peut obtenir, suivant le plus ou moins d'habileté de l'anatomiste, certains aspects absolument artificiels. Ainsi, pour la détermination du trajet des fibres d'association, en particulier des longs faisceaux d'association, est-il absolument nécessaire d'avoir recours aux coupes microscopiques sériées pratiquées en différents sens".

Et il constate plus loin que :

"s'il est vrai qu'il n'existe dans la substance blanche, pour ainsi dire, pas de faisceaux qui ne soient dissociés ou entre-croisés par d'autres fibres, il n'existe par contre que bien peu de régions où l'on ne puisse constater nettement, par la direction des fibres, la prédominance de tel ou tel faisceau de fibres".

La qualité des descriptions anatomiques du Système Nerveux Central présentes dans les travaux de Dejerine fait encore aujourd'hui de l'ouvrage *Anatomie des centres nerveux* une référence. Toutefois, du fait de la complexité du trajet des fibres blanches cérébrales hémisphériques, et de la complexité des rapports tridimensionnels qu'ils entretiennent entre-eux, la représentation des faisceaux d'association dans le manuel de Dejerine est limitée à quelques illustrations demi-schématiques et ne précisent que rarement et de manière imprécise leurs terminaisons corticales (Figure 5). Malgré ces limitations, il a défini quelques

conclusions générales que les raffinements des techniques d'imagerie du XXI^{ème} siècle n'ont pu encore confirmer ou infirmer :

" (...) que les radiations du corps calleux et les fibres de la couronne rayonnante naissent de préférence du sommet ou de la crête des circonvolutions et le système d'association des parois latérales de ces dernières ;

Que chaque fibre suit en général le trajet le plus direct pour se rendre à son lieu de destination ;

Que les fibres du système d'association occupent les couches les plus périphériques de la substance blanche ; qu'elles sont d'autant plus courtes qu'elles sont superficielles, plus voisines de l'écorce, et qu'elles s'entre-croisent toutes, avec les fibres calleuses ou les fibres de projection ;

Que les fibres calleuses et de projection se présentent dans une certaine partie de leur trajet à l'état de faisceaux compactes (sic), isolés pour ainsi dire, et non entre-croisés par d'autres fibres.

Que les fibres calleuses et de projection affectent toutes la forme de rayons (grand soleil de Reil), qui convergent le long du bord externe du noyau caudé et de l'angle externe du ventricule latéral."

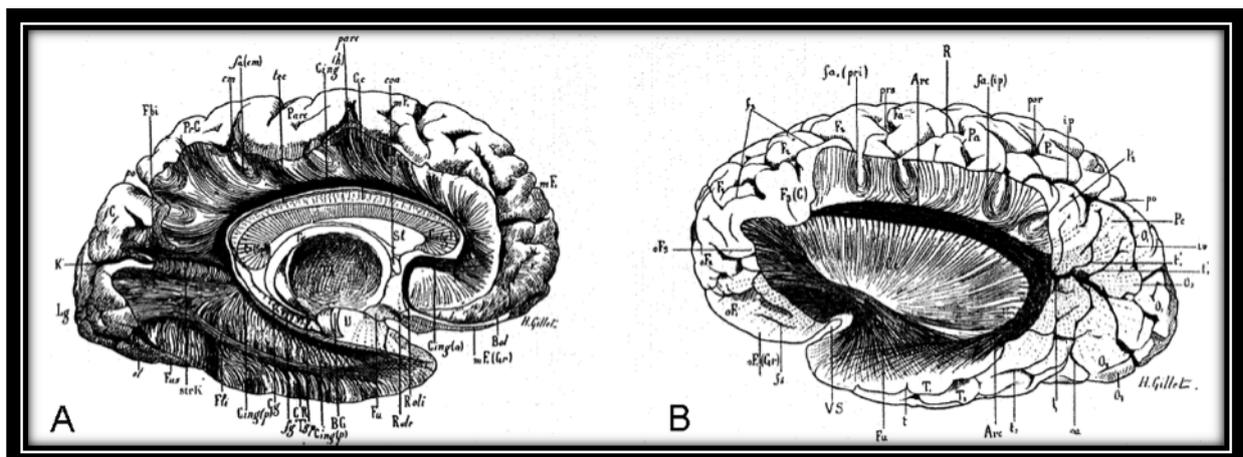


Figure 5. Illustrations de 1895 par H. Gillet dans l'ouvrage de Dejerine (1849-1917) intitulé *Anatomie des centres nerveux*. **A.** Représentation demi-schématique d'après la dissection de la face interne d'un hémisphère cérébral gauche durci dans l'alcool, montrant les structures limbiques, notamment le cingulum. **B.** Représentation demi-schématique de la face externe d'un hémisphère gauche montrant les fibres de la capsule externe, du faisceau unciné et du faisceau arqué.

3. Le début du XX^{ème} siècle : vers la méthode de Klingler et le néo-associationnisme de Geschwind

Le début du XX^{ème} siècle fut marqué par une querelle célèbre entre Pierre Marie (1853-1940) et Jules Dejerine. Le premier était opposé à la théorie de Broca, ce qui lui fit publier en 1906 un article intitulé : "*La troisième circonvolution frontale gauche ne joue aucun rôle spécial dans la fonction du langage*" [Marie, 1906]. Il s'y attachait à démontrer que l'aphasie de Broca était une aphasie de Wernicke associée à une anarthrie,⁴ et situait la lésion à l'origine de ce type d'aphasie dans un quadrilatère comprenant le striatum, le pallidum et la capsule interne. Jules Dejerine accusa en retour Pierre Marie d'avoir rayé d'un trait de plume tous les travaux accumulés sur l'aphasie depuis 1825 et insista sur la distinction entre aphasie motrice et aphasie sensorielle. Finalement, les victimes de la première guerre mondiale forcèrent Pierre Marie à réviser sa position (certains cas d'aphasie de Broca ne présentant pas de lésion de l'aire de Wernicke) et Dejerine à étendre la "zone de Broca" à l'opercule frontal et à la partie antérieure de l'insula.

Entre-temps, le mouvement globaliste ou holistique initié par Pierre Flourens puis porté notamment par Kurt Goldstein (1878-1965), rejetait toujours l'idée localisationniste d'une relation directe entre une région cérébrale et une fonction donnée. Pour Goldstein, les fonctions cérébrales étaient intégrées, et un symptôme reflétait donc des réactions, normales ou anormales, de l'organisme face à un dommage. S'appuyant sur ses observations de patients cérébro-lésés de la Première Guerre mondiale, il a insisté dans son ouvrage majeur *Organisme*, paru en 1934, sur la mise en œuvre de stratégies de compensation de l'organisme entier, malgré la persistance de déficits, pour se réajuster à l'environnement.

3.1. Une méthode méconnue, la méthode de Klingler

C'est dans ce contexte d'opposition entre courant localisationniste et holistique que Josef Klingler (1888-1963), technicien au laboratoire d'Anatomie de Bâle, découvrit une nouvelle technique de dissection qui allait devenir une référence. Bien que n'ayant jamais fini ses études de médecine, Klingler qui s'intéressait aux méthodes de préparation et de

⁴ Anarthrie : Impossibilité d'émettre des sons liée à un trouble majeur de la commande cérébrale de l'articulation, donc malgré l'intégrité des organes de la phonation.

dissection, obtint un poste de préparateur au laboratoire d'Anatomie de Bâle, alors dirigé par Eugen Ludwig. Il se forma auprès de Ferdinand Hochstetter à Vienne et de Henri Rouvière à Paris avant de développer sa propre méthode de dissection des fibres blanches cérébrales basée sur la congélation-décongélation. Cette amélioration technique permit, dans les mains de Klingler [Klingler, 1935; Ludwig and Klingler, 1956], de préciser la morphologie des principaux faisceaux de substance blanche tout en conservant leurs rapports anatomiques tridimensionnels avec les faisceaux adjacents et les noyaux gris profonds (Figure 6).

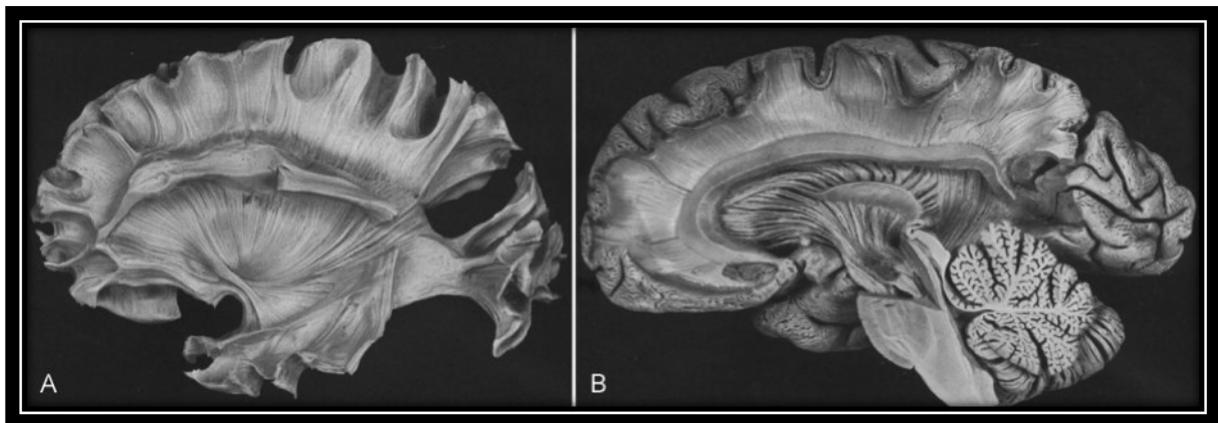


Figure 6. Extraits de l'*Atlas Humani Cerebri* de Ludwig et Klingler, 1956. A. Planche 8 de l'Atlas montrant la face externe d'un hémisphère cérébral gauche. Les fibres des principaux faisceaux d'association (arqué, unciné, occipitofrontal inférieur) ainsi que les fibres de la capsule externe y sont facilement reconnaissables. B. Planche 46 de l'Atlas représentant la face interne d'un hémisphère cérébral droit, et illustrant le niveau de détail atteint par la méthode de Klingler permettant d'individualiser de très minces faisceaux tels que ceux formant le pédoncule cérébral

Aucun travail n'avait démontré le mécanisme physico-chimique permettant à cette méthode de préparation d'obtenir de tels résultats, y compris sur des faisceaux extrêmement fins telles les voies afférentes et efférentes du complexe amygdaloïde [Klingler and Gloor, 1960]. Cependant, Klingler avait émis l'hypothèse, lors de la publication de ses travaux [Ludwig and Klingler, 1956], que :

"la solution aqueuse de formol ne pénètre pas ou peu dans les fibres à gaine de myéline, mais elle s'infiltré entre celles-ci. C'est donc là que se forme la plus grande quantité de glace. Or, le volume de la glace étant supérieur d'environ 10 % à celui de l'eau, il se produit

une légère dissociation qui non seulement facilite l'isolement des faisceaux très grêles, mais est même la condition indispensable à cet isolement".

La méthode de Klingler est encore aujourd'hui une méthode de référence pour les Neuro-anatomistes impliqués dans l'étude morpho-fonctionnelle des faisceaux de substance blanche. Toutefois, plusieurs limites ont contribué à la non reconnaissance de cette méthode par la communauté Neuroscientifique comme moyen fiable d'exploration de la structure des faisceaux de fibres blanches cérébrales. Les principales limites de la méthode de Klingler sont les suivantes : (1) la difficulté technique de la préparation et de la dissection ; (2) l'absence de démonstration à l'échelle microscopique du rôle de la congélation sur la structure des fibres ; (3) la difficulté croissante d'accessibilité à des spécimens humains ; (4) l'impossibilité d'appréhender directement la fonction des fibres par leur étude *ex vivo* ; ainsi que (5) l'absence de mise en application clinique neurologique ou neurochirurgicale évidente d'une meilleure connaissance de cette anatomie. Nous verrons plus loin pour quelle raison nous avons choisi cette méthode d'exploration comme outil de référence dans le cadre de ce travail.

3.2. Le néo-associationnisme de Geschwind

Peu après les travaux de Klingler, à partir des années 1950, la théorie holistique a peu à peu laissé place à l'approche néo-associationniste proposée par Norman Geschwind (1926-1984), une réactualisation des modèles associationnistes qui a bénéficié des avancées méthodologiques de la neuropsychologie et de la neuroanatomie. Les deux principes fondamentaux du mouvement néo-associationniste sont en fait hérités des théories classiques développées au XIX^{ème} siècle par les neurologues et anatomistes français et allemands : le premier veut que les fonctions cérébrales soient localisées au sein de régions corticales ; le second que ces régions soient informées ou informent d'autres aires corticales, où d'autres analyses prennent place. Cette approche est exposée dans l'article désormais classique de Geschwind intitulé *Disconnexion syndromes in animals and man* publié en 1965 [Geschwind, 1965a; Geschwind, 1965b]. Le néo-associationnisme a permis la réintroduction de l'approche anatomo-fonctionnelle et une reformulation des modèles cognitifs empruntant à la fois aux théories holistiques et localisationnistes. Les réflexions issues de cette approches ont dans le même temps bénéficié des avancées techniques notamment en Neuro-imagerie, et ont ainsi permis de reconnaître que les fonctions mentales ne sont pas localisées au sein de régions corticales spécifiques mais représentées dans un système plus largement distribué, contraint

cependant par l'anatomie. Cette idée place les moyens de communication entre régions corticales distantes, c'est-à-dire les faisceaux de fibres blanches cérébrales, au cœur des modèles connexionnistes expliquant aujourd'hui le fonctionnement cérébral, y compris pour les tâches cognitives de haut niveau telles que la cognition sociale ou la mentalisation [Herbet et al., 2014a; Herbet et al., 2014b].

4. La fin du XX^{ème} siècle : l'ère du marquage axonal

Les travaux de Dejerine, bien qu'étant au XX^{ème} siècle les seuls, avec ceux de Klingler, apportant une compréhension de l'anatomie des faisceaux de fibres blanches cérébrales, ne permettent malheureusement pas de déterminer avec fiabilité l'origine ou la terminaison des fibres. Dejerine dira lui-même :

"Mais nous tenons à le faire remarquer, s'il est possible et souvent même facile, de suivre à l'aide de cette méthode [des dégénérescences secondaires de Waller, note de l'auteur], le trajet d'un système dégénéré, par contre il n'est pas toujours très aisé, il s'en faut même de beaucoup, de suivre les fibres qui se détachent du système envisagé pour se rendre dans des systèmes voisins."

Différentes méthodes d'exploration des connexions corticales ont ainsi été développées dès le début du XX^{ème} siècle. Il s'agissait pour les plus connues, des méthodes de Marchi et de Bielschowsky, basées sur la réalisation d'une lésion corticale induisant une dégénérescence Wallerienne secondaire, et de l'imprégnation à l'argent permettant la visualisation de cette dégénérescence. Ces méthodes étaient toutefois difficiles et capricieuses, et ne permettaient pas, de surcroît, de visualiser directement le corps neuronal dont l'axone avait été détruit car l'imprégnation argentique permettait rarement de pénétrer la totalité du trajet axonal. Dans les années 1950 et 1960, des améliorations de cette méthode, comme la méthode de Nauta-Gygax ou double imprégnation à l'argent, ont permis de mieux identifier les terminaisons corticales et sous-corticales, tandis que le trajet des faisceaux restait toujours peu visible.

4.1. Marquage axonal antérograde et rétrograde chez le macaque

Au début des années 1970, la méthode d'autoradiographie développée par Cowan et al. [1972] a permis une nouvelle approche "physiologique" du traçage axonal. Le principe de cette méthode est l'injection d'un isotope radioactif, la leucine tritiée (L-[4,5-³H]leucine), incorporée dans une protéine qui est transportée à partir du site d'injection cortical à proximité du corps cellulaire, le long de l'axone, jusqu'à la terminaison axonale. Il s'agit donc d'une méthode de traçage *antérograde*. La connaissance de la vitesse de transport de l'isotope et de la longueur du trajet permet de déterminer la quantité de traceur à injecter et le délai entre

injection et sacrifice de l'animal afin d'observer *ex vivo* sur des coupes sériées le trajet axonal et le site de terminaison axonal.

Fiber Pathways of the Brain [Schmahmann and Pandya, 2009] est l'ouvrage de Jeremy D. Schmahmann et Deepak N. Pandya faisant référence pour l'étude de l'anatomie des fibres blanches cérébrales par cette technique antérograde d'autoradiographie. Utilisant la méthode d'autoradiographie sur 36 macaques rhésus adultes, ils ont étudié l'anatomie des faisceaux d'association intra-hémisphérique (Figure 7).

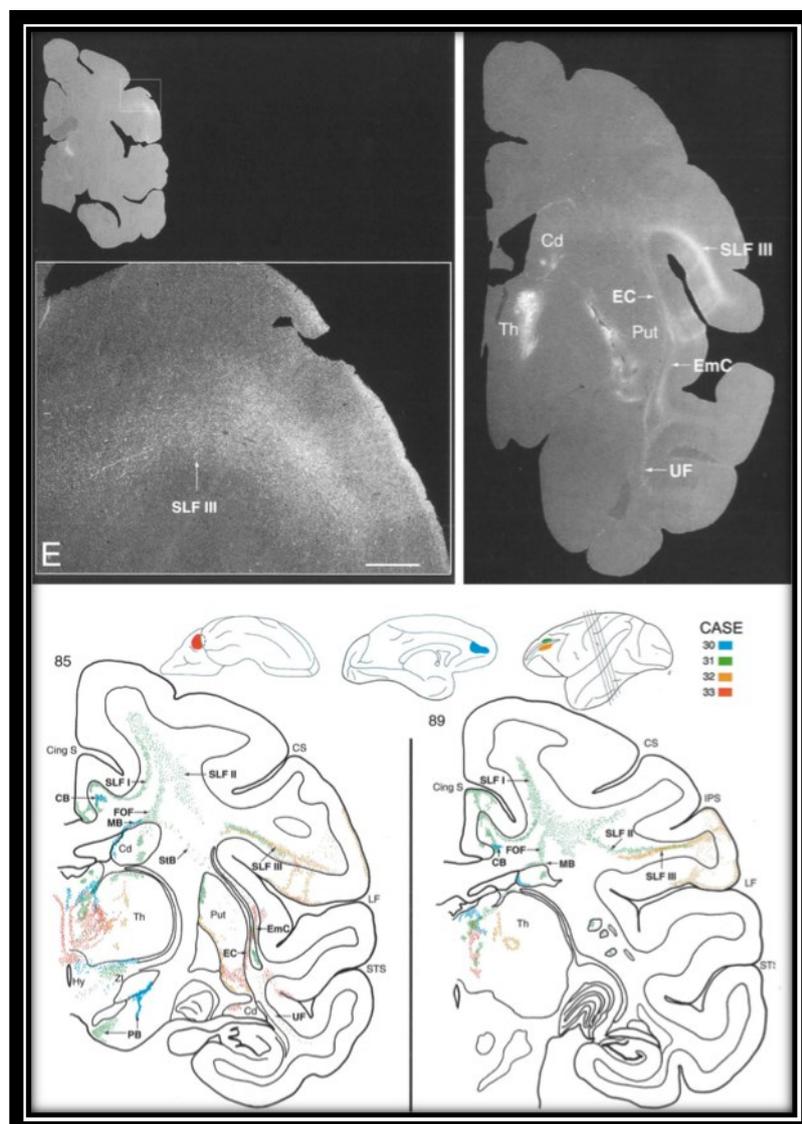


Figure 7. Illustrations issues de *Fiber Pathways of the Brain*, l'ouvrage de Schmahmann et Pandya basé sur l'autoradiographie de cerveaux de macaques rhésus. En haut à gauche, le site d'injection du traceur isotopique pour le cas 32 et le début de diffusion/transport antérograde le long du III^{ème} segment du Faisceau Longitudinal Supérieur (SLFIII). En haut à droite, le résultat final pour le cas 32 sur une coupe coronales passant par la capsule extrême (EmC). En bas, la représentation schématique

des diffusions de traceur observées à partir de 4 cas différents (30 à 33) avec pour chacun des cas le site d'injection et la diffusion du traceur d'une couleur différente.

Bien que la méthode soit d'une précision remarquable et permette une étude indirecte de la physiologie des fibres, car basée sur le transport actif antérograde *in vivo* du traceur, deux limitations majeures peuvent être identifiées. La première est la diffusion du traceur autour du site d'injection, entraînant une identification non sélective des faisceaux d'associations, commissuraux et de projection connectés à cette région "d'origine", finalement assez large. Cette limitation est en partie résolue par le nombre de cas étudiés qui permet un recoupement des informations, mais nécessite une analyse parfois interprétative des résultats. Le second problème soulevé par la méthode est la différence non négligeable entre l'anatomie du cerveau de macaque et du cerveau humain. Pour remédier à ce problème, les auteurs ont extrapolé les données issues du macaque en déterminant des régions corticales *homologues* humaines selon la cytoarchitectonique corticale. Toutefois, ce modèle simien reste imparfait notamment pour l'étude des faisceaux impliqués dans des fonctions cognitives complexes et spécifiques de l'être humain – notamment le langage - qui ne peuvent être extrapolées à partir de modèles animaux parce que possiblement sous-tendues par des différences anatomiques.

D'autres marqueurs ont été utilisés, certains ayant un transport *rétrograde*, comme par exemple la peroxydase de raifort conjuguée à l'agglutinine de germe de blé [Harper et al., 1980], avec les mêmes limitations que la méthode décrite ci-dessus, et notamment la limite liée à l'utilisation animale exclusive.

Comme nous le verrons plus loin, certains auteurs [Lin et al., 2001; Pautler et al., 1998] ont tenté de coupler ces méthodes de marquage avec l'IRM pour obtenir une représentation tridimensionnelle des faisceaux de fibres blanches.

4.2. Marquage post mortem des fibres blanches cérébrales

Les méthodes de marquage axonal présentées ci-dessus impliquent le sacrifice de l'animal et sont évidemment inutilisables chez l'homme. Le marquage *post mortem* chez l'humain a été décrit par Mesulam [1979]. Il utilise un marquage à l'argent ou au Di-I (1,1'didodecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate). Cependant, dans la

méthode originale, le colorant ne diffuse passivement que de quelques millimètres en plusieurs mois depuis le point d'injection. Plus tard, une amélioration de la technique utilisant le marquage au Di-I a été décrite [Sparks et al., 2000]. Elle permet la diffusion du colorant sur 20 à 40 mm en quelques jours, ce qui reste néanmoins insuffisant pour étudier les faisceaux de fibres blanches cérébrales sur toute leur longueur.

5. Le début du XXI^{ème} siècle : l'avènement de la tractographie cérébrale de diffusion

Les méthodes décrites plus haut ont permis, à l'aide d'un faisceau d'arguments variés, une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral normal et du rôle primordial des fibres blanches cérébrales. Malgré tout, l'organisation macroscopique de la substance blanche cérébrale humaine à l'échelle d'un hémisphère cérébral, et le rôle des connexions assurées par les fibres blanches restait incomplètement connues.

Au début des années 2000, une nouvelle méthode d'exploration *in vivo* en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et de représentation graphique de la structure et de l'organisation de ces fibres, a révolutionné le monde des Neurosciences. Il s'agit de la tractographie cérébrale de diffusion qui est, à ce jour, la seule technique non invasive qui permette l'étude *in vivo* de la trajectoire des fibres blanches cérébrales [Mori and van Zijl, 2002]. Toutefois, la tractographie ne visualise pas directement l'anatomie, mais repose sur les techniques d'acquisition des données IRM et sur des outils mathématiques complexes utilisés pour leur traitement.

5.1. La diffusion de l'eau en IRM

La diffusion est un processus physique définissant les mouvements aléatoires des molécules du fait de leur énergie thermique. Elle est modifiée par la structure des tissus qui composent les milieux biologiques, par exemple dans le système nerveux central : liquide cérébro-spinal, substance grise et substance blanche. Ainsi, le liquide cérébro-spinal peut être assimilé à un milieu homogène de faible viscosité, où le coefficient de diffusion est important (environ $3,2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) et identique dans toutes les directions de l'espace (le LCS est dit isotrope). La substance grise et la substance blanche sont plus visqueuses et leurs coefficients de diffusion moins importants (entre $0,6$ et $0,8 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) [Helenius et al., 2002]. La diffusion dans la substance grise, bien que restreinte, est isotrope tandis que dans la substance blanche, elle est fortement anisotrope. En effet, la substance blanche est composée de trois structures longitudinales susceptibles de restreindre la diffusion perpendiculaire aux fibres : il s'agit de la membrane axonale, de la myéline, et des neurofibrilles (Figure 8). Initialement, la myéline était supposée jouer un rôle prépondérant, mais la comparaison des propriétés de

diffusion de fibres myélinisées et non myélinisées chez le même animal ont montré qu'elle jouait en fait un rôle limité par rapport aux membranes et ne faisait que moduler l'anisotropie [Beaulieu, 2002; Le Bihan et al., 1993; Moseley et al., 1991].

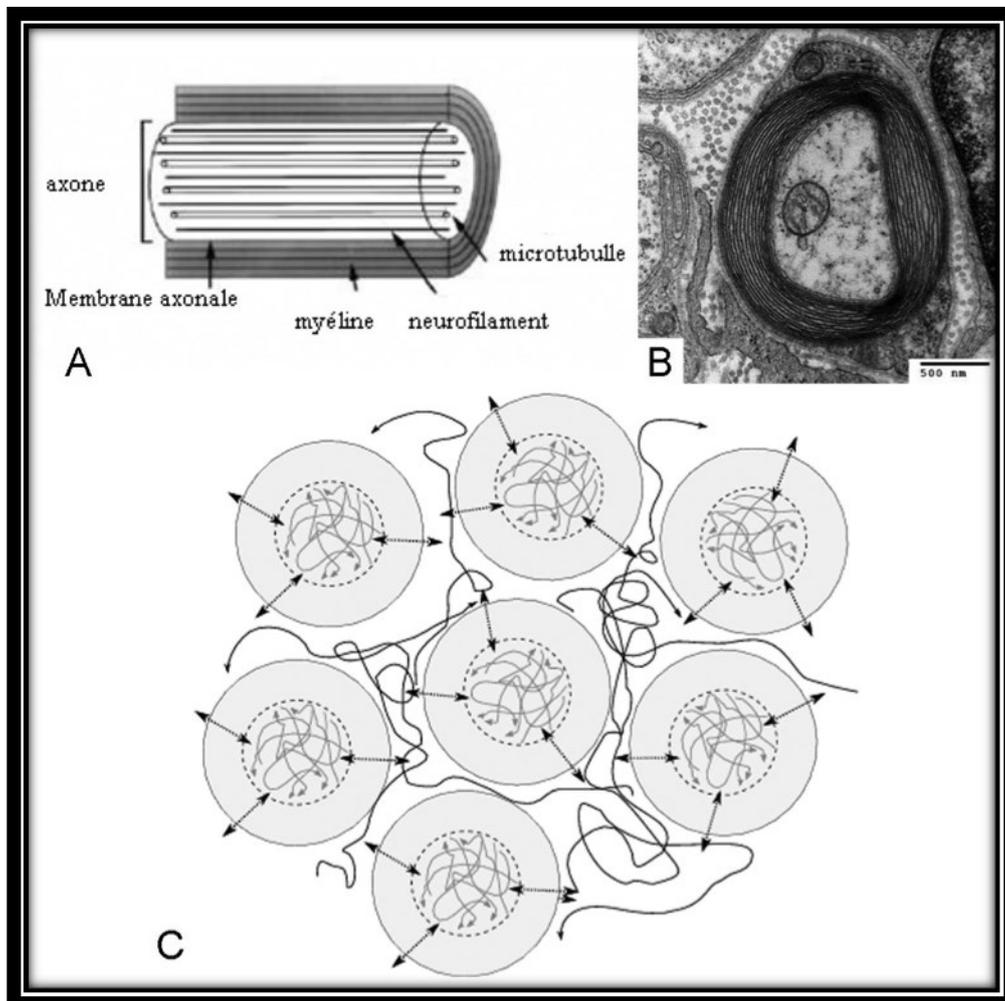


Figure 8. Composition des fibres blanches cérébrales et impact sur la diffusion des molécules d'eau. **A.** Représentation schématique d'un axone cérébral myélinisé. D'après Beaulieu [2002]. **B.** Microphotographie d'un axone myélinisé observé en microscopie électronique à transmission, montrant la structure "multi-couches" des gaines de myéline intracérébrales provenant des oligodendrocytes. **C.** Représentation schématique de la diffusion des molécules d'eau dans la substance blanche : intra-axonales, extracellulaires, et échanges entre ces deux compartiments. D'après Fieremans, 2008.

L'IRM de diffusion utilise deux gradients magnétiques bipolaires pour mesurer le coefficient de diffusion. Le premier gradient introduit un déphasage des spins qui se manifeste par une diminution du signal mesuré. Le deuxième gradient compense le déphasage des protons restés immobiles et élimine cette atténuation de signal. En revanche, pour les protons

mobiles pendant le temps t_{diff} , entre l'application des deux gradients, cette compensation est imparfaite. Plus la diffusion dans la direction d'application des gradients, et donc la dispersion des angles de phase des spins, a été importante pendant le temps t_{diff} , plus le vecteur d'aimantation diminue et donc le signal mesuré est atténué. La diminution de l'amplitude du signal permet de calculer le coefficient de diffusion [Le Bihan et al., 1986] qui rend compte de la diffusion moyenne dans la seule direction d'application de la paire de gradients [Basser et al., 1994]. Ce coefficient est exprimé sous la forme du Coefficient Apparent de Diffusion (ou ADC pour Apparent Diffusion Coefficient *en Anglais*).

5.2. Le tenseur de diffusion

La méthode la plus répandue pour représenter la direction préférentielle de diffusion est le tenseur de diffusion ou DTI (Diffusion Tensor Imaging), qui modélise la diffusion de l'eau pendant le temps de diffusion t_{diff} par un ellipsoïde. Le tenseur est évalué à partir de l'acquisition d'au moins six directions de gradients non colinéaires, et d'une référence sans application de gradient [Basser et al., 1994]. L'ellipsoïde peut prendre trois aspects : une sphère si la diffusion est isotrope, une galette (ou pancake) si elle s'effectue principalement dans un plan, une forme de cigare si elle s'effectue principalement selon une seule direction [Tournier et al., 2003] (Figure 9).

La fraction d'anisotropie (FA) est un indice scalaire dérivé du tenseur, qui permet de caractériser le degré d'anisotropie. La direction de diffusion préférentielle dans chaque voxel est représentée par un code couleur (RGB) qui permet d'obtenir une carte de FA colorée selon le système suivant :

- la direction droite-gauche (axe des x dans le référentiel de l'IRM) est codée en rouge,
- la direction antéro-postérieure (axe des y) est codée en vert,
- la direction supéro-inférieure (axe des z) est codée en bleu.

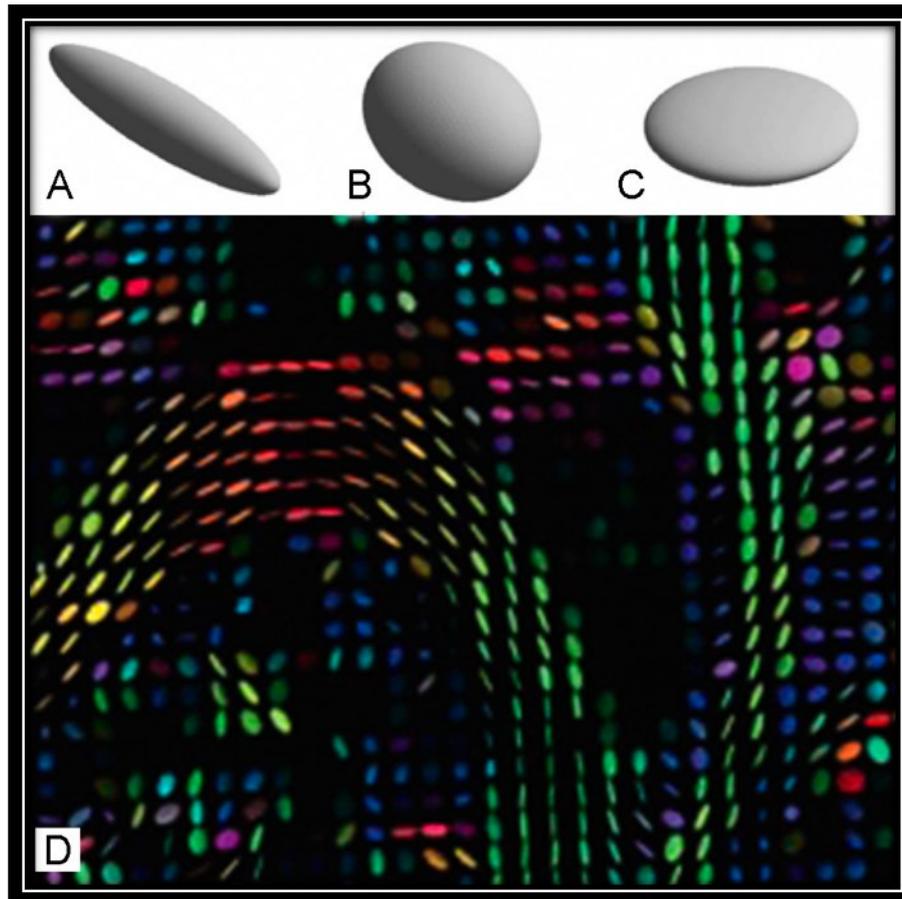


Figure 9. Forme de l'ellipsoïde en fonction du type de diffusion. **A.** diffusion anisotrope, ellipsoïde en forme de cigare, **B.** diffusion isotrope, ellipsoïde sphérique, **C.** diffusion privilégiée dans un plan, ellipsoïde en forme de galette. D'après Tournier et al. [2003]. **D.** Représentation des tenseurs sur une carte de fraction d'anisotropie colorée. Pour chaque voxel de cette coupe axiale centrée sur le splénium du corps calleux et l'atrium ventriculaire, un ellipsoïde montre la taille, la forme, et la direction (facilitée par un code couleur) du tenseur de diffusion. D'après Cottier et al. [2005].

5.3. Les limites du tenseur et les techniques HARDI

Le modèle DTI suppose l'existence d'une direction de diffusion unique au sein d'un voxel donné. Or, dans les régions de croisement de fibres et du fait de la taille des voxels (de l'ordre de quelques mm^3) largement supérieure à celle des fibres, les voxels contiennent plusieurs populations de fibres. La direction unique mesurée en DTI est donc la résultante de ces directions multiples : la fraction d'anisotropie moyenne, à l'échelle du voxel, s'approchera de zéro, perturbant les algorithmes de tractographie et donc la reconstruction des fibres (cf. infra). Les méthodes HARDI (High Angular Resolution Diffusion Imaging) proposent de résoudre ce problème en augmentant la résolution d'échantillonnage par l'augmentation du nombre d'application des gradients de diffusion (jusqu'à plus de 100 au lieu des 6 nécessaires dans le modèle DTI). Il en résulte des temps d'acquisition plus longs, difficilement applicables

en routine clinique. Ces méthodes, au lieu d'estimer un tenseur qui représente la direction préférentielle au sein du voxel, vont estimer la fonction de distribution des orientations (ODF, Orientation Distribution Function) qui représente la probabilité de diffusion des molécules d'eau à l'intérieur d'un voxel (Figure 10).

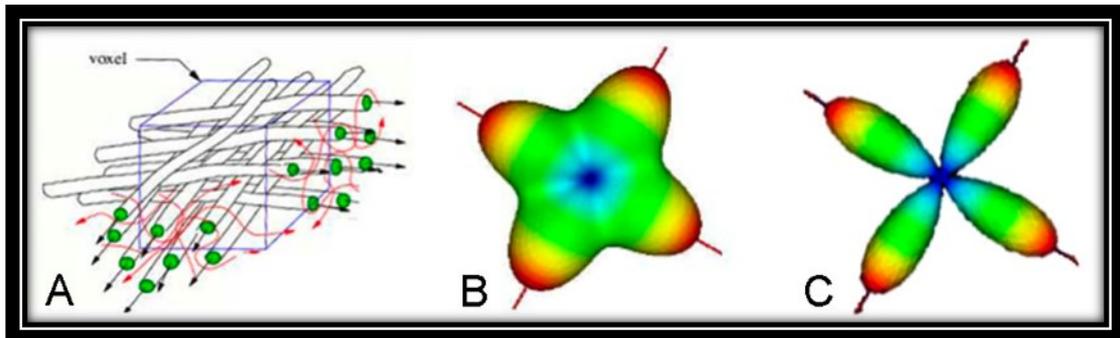


Figure 10. Principe des modèles HARDI. Schéma d'un croisement de fibres perpendiculaires au sein d'un voxel (A) et sa représentation avec une méthode HARDI sous forme d'un ODF de diffusion ou dODF (B) ou d'un ODF de fibres ou fODF (C). D'après Descoteaux [2010].

L'intérêt de cette méthode est donc de pouvoir représenter différents pics de diffusion pour détecter plusieurs directions de diffusion au sein d'un même voxel dans les régions anatomiques de croisement de fibres. De nombreuses méthodes basées sur le modèle HARDI ont ainsi été développées comme l'imagerie Q-ball (QBI ; Q-ball imaging), l'imagerie de diffusion spectrale (DSI ; Diffusion spectrum imaging), ou la déconvolution sphérique (CSD ; Constrained Spherical Deconvolution).

5.4. Les algorithmes de tractographie

À partir des données du tenseur pour la DTI ou de l'ODF pour les méthodes HARDI, les faisceaux de fibres blanches peuvent alors être calculés par des algorithmes de tractographie, selon trois étapes schématiques. La première est la détermination d'une zone de départ de l'algorithme (région "germe", ou "seed region"). La seconde est la reconstruction tractographique, répondant à plusieurs critères de propagation et d'arrêt de l'algorithme, définis a priori par l'utilisateur : fraction d'anisotropie, angle, longueur minimale du faisceau... (Figure 11). La troisième étape est la représentation graphique des résultats (Figure 12).

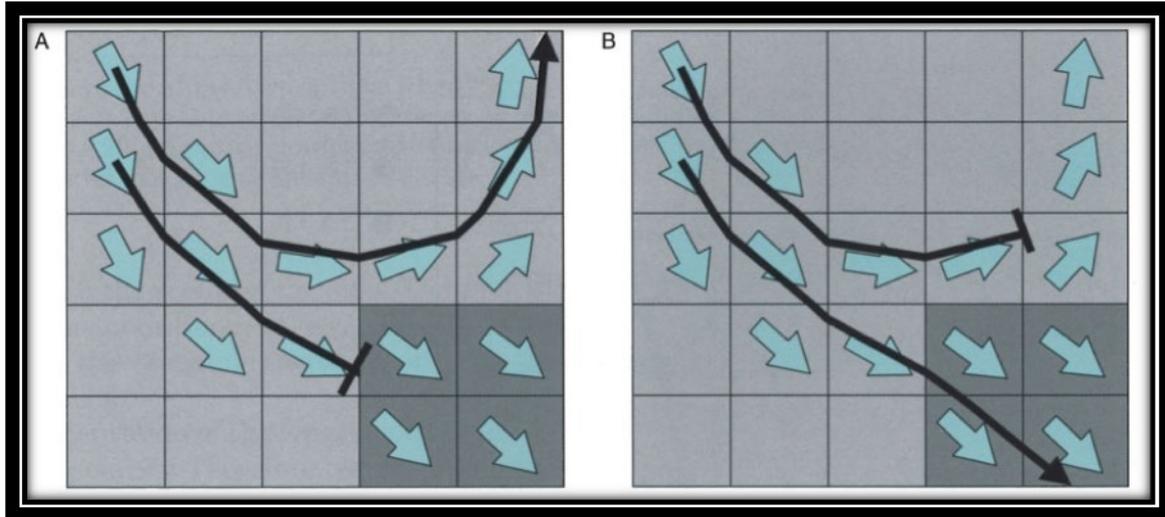


Figure 11. Deux critères de terminaison d'algorithme de tractographie déterministe. A) faible anisotropie et B) angle de courbure trop important. Les flèches bleues représentent l'orientation des fibres dans chaque voxel et le niveau de gris représente le degré d'anisotropie. D'après Mori [2007].

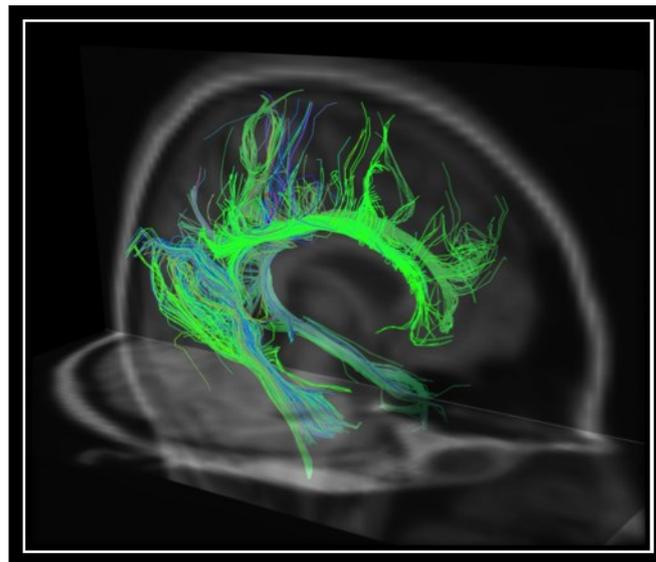


Figure 12. Exemple de tractographie déterministe. Représentation graphique des deux cingulum en vue oblique antérieure droite. Illustration réalisée avec le logiciel TrackVis®.

Cette méthode générale varie, selon que l'on fait appel à des algorithmes de tractographie déterministes ou probabilistes. Les méthodes *déterministes* consistent à démarrer une fibre ou un faisceau à partir d'un point germe ou d'une région d'intérêt (ou ROI pour Region Of Interest *en Anglais*). Cette ROI est habituellement positionnée manuellement selon des règles anatomiques [Catani and Thiebaut de Schotten, 2008; Wakana et al., 2007].

La fibre ou le faisceau est ensuite propagé(e) pas à pas dans la direction du vecteur propre principal du tenseur de diffusion au sein du (des) voxel(s). Lors d'un positionnement manuel de ROIs, des opérateurs booléens ET, SAUF et OU (AND, NOT et OR *en Anglais*) sont utilisés pour coordonner les ROIs entre elles et sélectionner spécifiquement les faisceaux passant par les ROIs connectées par l'opérateur (AND), ou obtenir tous les faisceaux passant par les ROIs connectées (OR). L'opérateur NOT est un opérateur d'exclusion.

Les méthodes déterministes ont pour principal inconvénient, notamment avec la méthode du tenseur de diffusion, de dépendre d'une information locale ; si les fibres se croisent au sein d'un même voxel, le tenseur de diffusion devient isotrope. Il en résulte une direction de diffusion erronée et un tracé de fibre dévié de sa trajectoire.

Pour tenter d'améliorer le traitement des croisements de fibres, d'autres méthodes ont été développées. Il s'agit des méthodes *probabilistes* qui consistent à propager des fibres le long de directions non pas fixes, mais suivant une loi de probabilité. Les résultats sont alors donnés sous forme d'une cartographie de probabilité où, pour chaque voxel, est indiquée la probabilité de contenir le faisceau étudié. Les méthodes probabilistes permettent également d'autres améliorations telles que l'automatisation du positionnement des ROIs [Yendiki et al., 2011].

5.5. Les limites de la tractographie cérébrale

L'intérêt de la tractographie cérébrale a été montré dans de nombreuses pathologies impliquant la substance blanche parmi lesquelles la sclérose en plaques [Audoin et al., 2007; Pagani et al., 2005] et les tumeurs cérébrales [Nimsky et al., 2006]. Elle a même été utilisée dans la planification pré-opératoire et la visualisation per-opératoire chez des patients atteints de tumeurs cérébrales [Nimsky et al., 2006; Yu et al., 2005], malgré la démonstration d'un manque de fiabilité [Kinoshita et al., 2005].

Or, comme nous l'avons montré plus haut, la tractographie cérébrale n'est pas une méthode anatomique de visualisation directe des fibres blanches cérébrales, mais une méthode très indirecte reposant sur (1) des techniques d'acquisition IRM complexes sujettes à de nombreux artefacts (bruit, distorsion géométrique, susceptibilité magnétique...), sur (2) des post-traitements eux aussi complexes représentant imparfaitement la réalité anatomique par une carte de tenseurs ou d'ODF, et sur (3) des algorithmes mathématiques pour reconstruire les fibres à partir de ces cartes de tenseurs ou d'ODF. Il résulte de ce nombre d'étapes un

risque élevé d'erreurs qui peuvent conduire, soit à des *faux positifs*, c'est-à-dire la création de faisceaux de fibres qui n'existent pas anatomiquement, soit à des *faux négatifs*, c'est-à-dire l'absence de détection de faisceaux existants.

II. Deuxième Partie - État de l'art

**Les méthodes de validation de la
tractographie IRM**

Introduction

La confiance que l'on peut accorder à la tractographie, en tant qu'outil permettant de représenter l'anatomie des fibres blanches cérébrales est à ce jour difficile à quantifier. L'algorithme de tractographie utilisé, les critères définis par l'utilisateur de l'algorithme (FA limite, angle limite, longueur de fibre limite...), le positionnement des régions d'intérêt, les paramètres de la séquence d'acquisition IRM (nombre de répétitions, nombre de directions, facteur de pondération B...) le bruit, les artéfacts de mouvement et de distorsion... sont autant de paramètres influençant le résultat final de la tractographie d'un faisceau.

De ce fait, l'utilisation de la tractographie en pratique clinique est limitée, en particulier en neuroradiologie et neurochirurgie. Or, la connaissance de l'anatomie normale de la substance blanche et de ses modifications en pathologie est un élément majeur de la prise en charge des maladies neurologiques et neuropsychiatriques. La validation de la tractographie constitue donc un enjeu médical de tout premier plan.

Toutes les méthodes d'exploration de la structure des fibres blanches cérébrales décrites dans la première partie de ce travail ont fait l'objet de développements méthodologiques en vue de leur utilisation comme outil de validation de la tractographie. D'autres méthodes, comme l'imagerie en lumière polarisée et la tomographie en cohérence optique, ont été appliquées au cerveau dans cet objectif. Dans cette partie, nous détaillons les multiples tentatives de validation de la tractographie qui ont été proposées :

- approches par objets tests et simulation numérique,
- méthodes utilisant une action *in vivo*, non réalisables chez l'Homme,
- méthodes utilisables chez l'Homme,
 - la comparaison indirecte aux travaux anatomiques et histologiques,
 - l'imagerie en lumière polarisée,
 - la tomographie en cohérence optique,
 - la comparaison directe de la dissection à la tractographie *post mortem*.

6. Approches par objets tests et simulation numérique

Dans l'application qui nous intéresse, le principe d'un objet test est de simplifier l'anatomie de la substance blanche cérébrale afin de maîtriser parfaitement la structure réelle (ou vérité terrain) de l'objet testé, tout en prenant en compte certaines contraintes spécifiques à la substance blanche et notamment sa structure fibreuse, à l'origine de l'anisotropie. Le rôle des objets tests est donc principalement de reproduire les conditions physiques qui conduisent à l'anisotropie de la substance blanche, de tester l'efficacité des méthodes d'acquisition IRM et/ou des algorithmes de tractographie pour reconstruire la structure fibrillaire de l'objet, et enfin de comparer le résultat de la tractographie à la vérité terrain.

Bien qu'ils restent très simples par rapport à la micro anatomie cérébrale et ne permettent qu'une validation partielle, de nombreux objets tests biologiques ou synthétiques ont été proposés. Les simulations numériques ne permettent pas, elles, de valider l'acquisition IRM mais seulement les algorithmes de tractographie.

6.1. Objets tests biologiques

Les objets tests biologiques qui ont été utilisés pour "reproduire" les caractéristiques physico-chimiques de la substance blanche cérébrale humaine sont l'asperge [Boujraf et al., 2001; Latt et al., 2007], le céleri [Özarslan et al., 2011] et les tissus animaux comme la moelle épinière de porc ou de rat [Campbell et al., 2005; Yeh et al., 2010].

L'intérêt d'utiliser des objets tests biologiques est qu'ils apportent la richesse des structures qui composent les tissus biologiques comme les cellules et les vaisseaux sanguins. Leurs principaux inconvénients sont leur instabilité dans le temps et l'impossibilité de choisir leur forme, donc une réalité terrain qui n'est qu'imparfaitement connue.

6.2. Objets tests synthétiques

Les objets tests formés de capillaires ou de fibres textiles de directions et de calibres connus [Lin et al., 2003; Perrin et al., 2005; Poupon et al., 2008] visent à simuler les propriétés de diffusion des tissus. Ils sont, à l'inverse des objets tests biologiques, stables dans

le temps et de forme reproductible et connue mais reproduisent moins bien la richesse des tissus biologiques. Les capillaires peuvent être en verre ou en plastique, de diamètre variant de 23 à 82 μm [Lin et al., 2003; Tournier et al., 2008; Yanasak and Allison, 2006]. Les fibres textiles de diamètre comparable à celui des axones (10 à 20 μm) sont les fibres de polyester [Pullens et al., 2010], polyamide [Laun et al., 2009], dyneema® [Fieremans et al., 2008a] et acrylique [Poupon et al., 2008]. Contrairement aux capillaires, les fibres textiles peuvent reproduire des formes géométriques complexes comme des angles, des croisements, des divisions, des fusions (Figure 13).

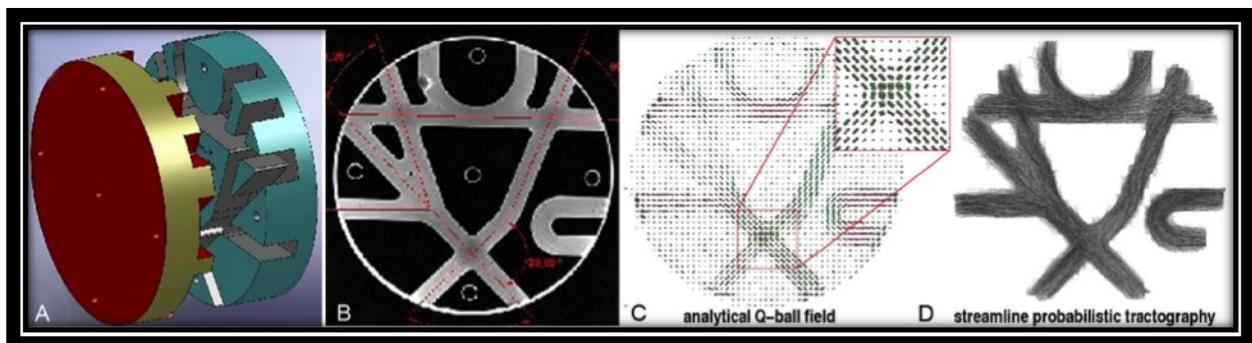


Figure 13. Objet test synthétique (structure en polyuréthane, faisceaux en fibres acryliques) imitant une coupe coronale de cerveau humain (A et B). Représentation de la carte des ODF (C), et tractographie probabiliste montrant une corrélation satisfaisante avec la vérité terrain. D'après Poupon et al. [2010].

6.3. Approches numériques

Enfin, plus éloignés encore de l'anatomie que les objets tests biologiques et synthétiques, des modèles numériques ont été développés. Ainsi, des données reproduisant le processus de diffusion de l'eau dans la substance blanche cérébrale peuvent être simulées numériquement [Fieremans et al., 2008b; Leemans et al., 2005]. Ces travaux de modélisation permettent de tester la robustesse des algorithmes de tractographie mais pas les étapes d'amont que sont l'acquisition IRM et l'estimation du tenseur (Figure 14).

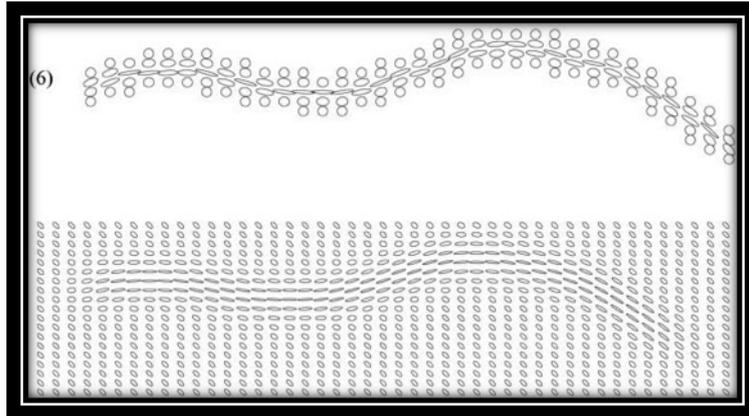


Figure 14. Représentation de la diffusion sous forme d'ellipsoïde, avec ou sans simulation d'un tissu environnant, par une fonction mathématique. D'après Fieremans et al. [2008b].

7. Méthodes utilisant une action *in vivo*, non utilisables chez l'Homme

7.1. Marquage axonal rétrograde chez le macaque.

Une méthode élégante, de comparaison *directe* entre autoradiographie et tractographie chez un même individu, a été proposée par Dauguet et al. [2007] chez le macaque; après acquisition IRM pondérée en diffusion et tractographie déterministe, ils ont injecté un traceur (agglutinine de germe de blé couplée à la peroxydase de raifort) *in vivo* dans le cortex du même animal. Le transport actif du traceur dans les axones a permis, après sacrifice de l'animal, la visualisation des fibres partant de la zone d'injection. Pour permettre une comparaison à la tractographie et corriger les déformations liées à la préparation histologique, les fibres ont été reconstruites en trois dimensions à partir de coupes histologiques, à l'aide d'une transformation en trois étapes : construction d'un volume photographique, recalage rigide des coupes histologiques dans le volume photographique, puis recalage élastique du volume histologique dans le volume IRM (Figure 15).

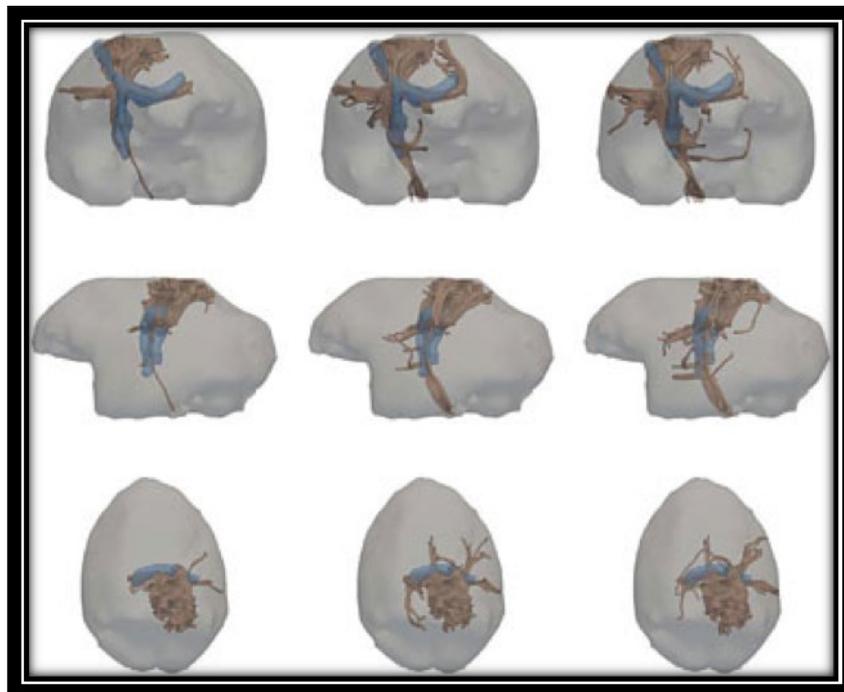


Figure 15. Comparaison Tractographie / Marquage axonal rétrograde chez le macaque. Les résultats du marquage axonal apparaissent en bleu, les résultats de la tractographie DTI en marron. Chaque colonne représente les meilleurs résultats de la tractographie selon la variable testée, à savoir

respectivement de gauche à droite la fraction d'anisotropie, l'angle et la longueur des fibres. On peut observer une concordance imparfaite entre marquage axonal et tractographie, et également une forte variabilité des résultats DTI selon la variable testée sur l'algorithme de tractographie. D'après Dauguet et al. [2007].

Des erreurs non négligeables de concordance avec la tractographie ont été observées, possiblement en raison d'une reconstruction imparfaite du volume à partir des coupes histologiques et des difficultés de diffusion du traceur à distance du point d'injection. La mauvaise concordance pouvait également provenir d'erreurs liées à la tractographie, d'autant plus que les résultats de celle-ci différaient significativement selon les critères d'arrêt de l'algorithme déterministe utilisé.

7.2. Marquage axonal au manganèse

Le marquage axonal au manganèse (Figure 16) a été proposé pour éviter la perte de la structure 3D liée à la réalisation de coupes histologiques après marquage rétrograde. Déposé *in vivo* au contact du cortex, le manganèse se comporte comme un traceur qui suit les axones et leur confère des propriétés paramagnétiques. Les fibres marquées apparaissent ainsi en hypersignal en pondération T1, ce qui permet la comparaison directe de l'IRM pondérée en T1 aux résultats de la tractographie, sans recours à la dissection ni aux coupes histologiques. Malgré un concept séduisant, la diffusion de la molécule dans le cortex cérébral marque une vaste région [Lin et al., 2001; Lin et al., 2003] qui rend difficile la comparaison avec la tractographie [Dyrby et al., 2007].

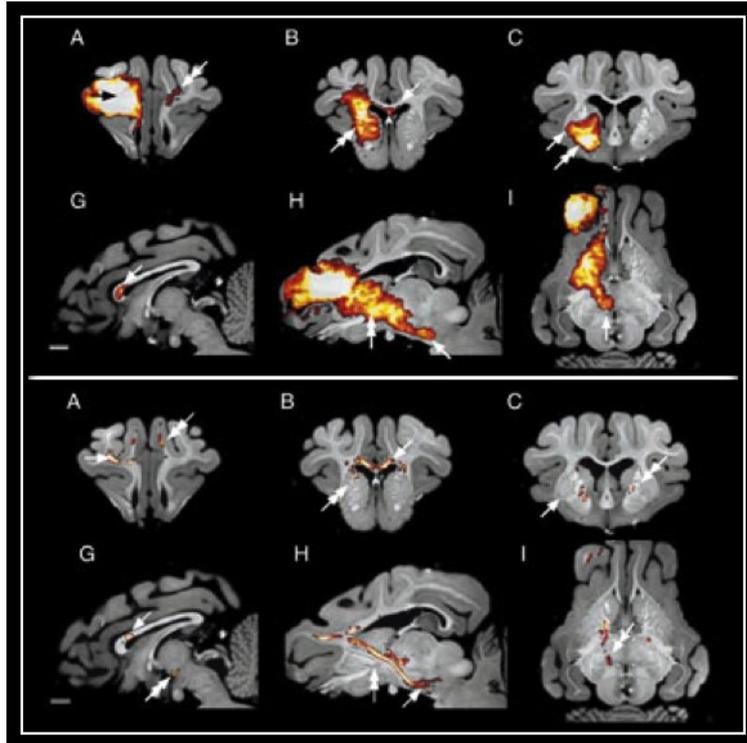


Figure 16. Comparaison entre marquage au manganèse (en haut) et tractographie probabiliste (en bas) d'un même cerveau de *minipig*. Le site d'injection ainsi que le point de départ de la tractographie sont situés dans le cortex somatosensoriel de l'hémisphère droit (flèches sur les images A). La tractographie donne des résultats globalement superposables au marquage axonal bien que ce dernier diffuse fortement, rendant la comparaison imprécise. D'après Dyrby et al. [2007].

Même s'il est envisageable à l'avenir d'obtenir de meilleurs résultats par l'amélioration de ces méthodes de marquage axonal, la limite majeure est l'impossibilité de les appliquer chez l'être humain. Ces méthodes ne permettront donc jamais de reproduire fidèlement les conditions d'acquisition IRM utilisées en routine chez les patients humains, ni de s'assurer que l'algorithme de tractographie utilisé est capable de reconstruire les fibres cérébrales dont l'organisation diffère d'une espèce à l'autre.

8. Méthodes utilisables chez l'Homme

8.1. Comparaison indirecte aux travaux anatomiques et histologiques

De nombreux auteurs ont comparé les résultats de la tractographie IRM à ceux des travaux anatomiques réalisés chez l'homme [Dejerine and Dejerine-Klumpke, 1895; Klingler and Gloor, 1960; Ludwig and Klingler, 1956] et l'animal [D'Arceuil et al., 2007; Lin et al., 2001; Lin et al., 2003; Paxinos and Watson, 2007]. Par exemple, dans leur article sur l'alexie sans agraphie, syndrome de déconnexion décrit par Dejerine [1892], Epelbaum et al. [2008] comparent les résultats de leurs données de tractographie à ceux obtenus à l'autopsie du cas du patient de J. Dejerine, M. C., pour confirmer l'hypothèse émise par Dejerine mais également pour montrer la possibilité de visualiser une déconnexion avec la tractographie (Figure 17).

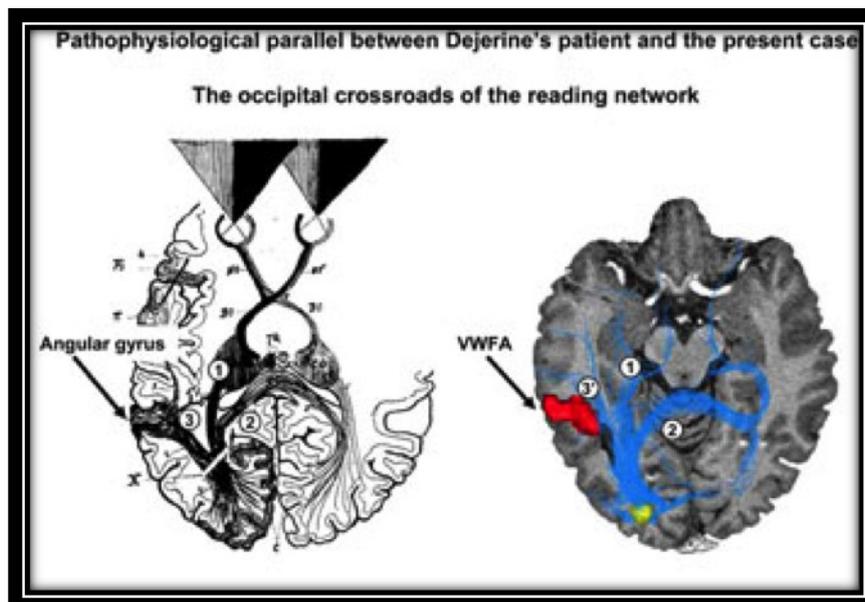


Figure 17. Comparaison entre le cas de J. Dejerine publié en 1892 et le cas d'un patient de 46 ans ayant subi une cortectomie pour une épilepsie ayant développé secondairement une alexie sans agraphie. L'étude en tractographie de diffusion a trouvé une section des fibres du faisceau longitudinal inférieur. D'après Epelbaum et al. [2008].

D'autres auteurs ont tenté de démontrer la précision de la tractographie de diffusion en la comparant à l'autoradiographie chez le macaque. C'est par exemple le cas de Schmahmann et al. [2007] qui ont réalisé une tractographie *in vivo* avec la technique de Diffusion Spectrum Imaging (DSI) sur des cerveaux de macaques et ont comparé les résultats de cette

tractographie aux données de leur atlas Fiber Pathways of the Brain, publié l'année précédente à partir d'autoradiographie de cerveaux de macaques (Figure 18). Bien évidemment, cette comparaison était indirecte puisque portant sur des individus différents.

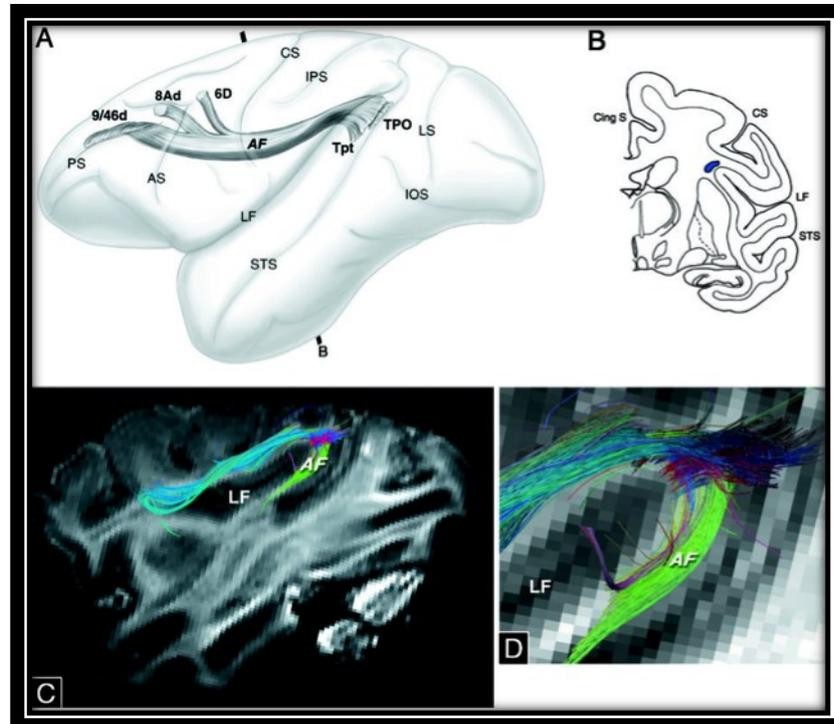


Figure 18. Comparaison entre étude du trajet des fibres du faisceau arqué de macaque par autoradiographie et par tractographie sur des données de Diffusion Spectrum Imaging (DSI). Bien que les résultats soient globalement satisfaisants, les auteurs n'ont pu réaliser qu'une comparaison qualitative entre des données issues de plusieurs individus différents tant en ce qui concerne l'autoradiographie que la tractographie DSI. D'après Schmahmann et al. [2007].

Enfin, d'autres travaux ont proposé une comparaison entre dissection de Klingler et tractographie (Figure 19), soit pour démontrer que les images issues de la tractographie correspondaient à une réalité anatomique visualisable avec la méthode de Klingler [Kinoshita et al., 2012; Maldonado et al., 2013; Martino et al., 2013; Sarubbo et al., 2013], ou au contraire pour montrer que certains faisceaux retrouvés avec la tractographie ne l'étaient pas en dissection [Maldonado et al., 2012].

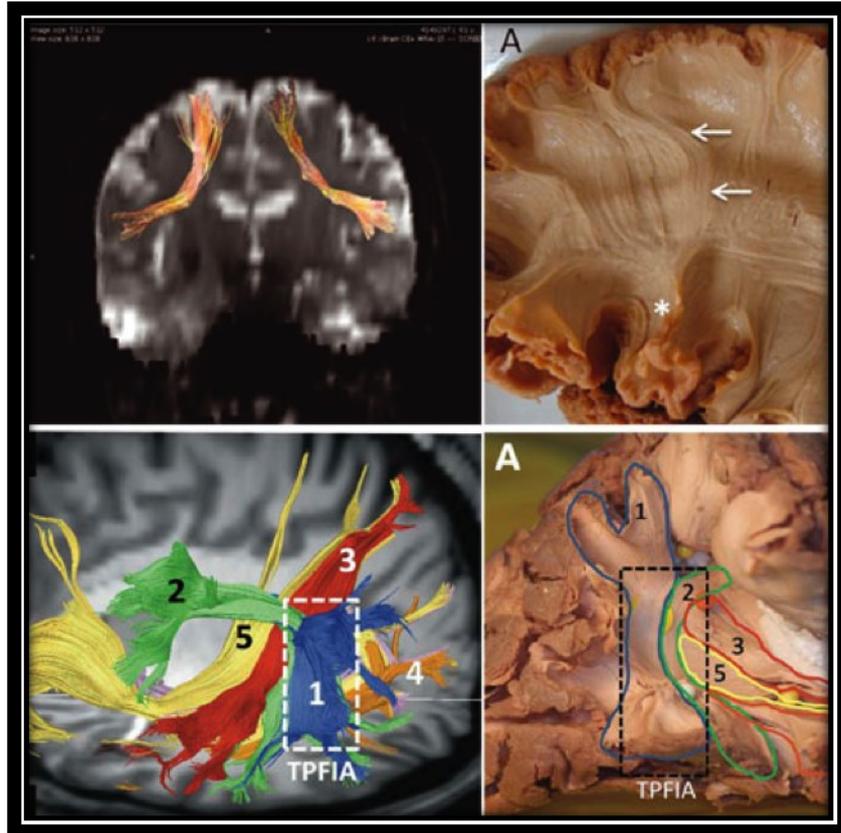


Figure 19. Études comparant tractographie IRM et dissection de Klingler. En haut, Kinoshita et al. [2012] ont démontré l'existence d'un faisceau d'association connectant le gyrus frontal supérieur au gyrus frontal inférieur, dénommé *frontal aslant tract*. En bas, Martino et al. [2013] ont étudié les faisceaux d'association présents dans le carrefour temporo-pariétal.

Malgré une concordance habituellement satisfaisante, ces comparaisons portent sur des individus différents, situés dans des espaces anatomiques eux aussi différents, ne permettant qu'une évaluation qualitative, assez peu précise, des rapports qu'entretiennent les faisceaux les uns par rapport aux autres. Ces travaux ne permettent donc pas de valider la précision de la tractographie pour représenter un faisceau donné chez un individu donné, et ne sont donc pas suffisants pour autoriser l'usage de la tractographie en routine médicale, où il est important de connaître la spécificité et sensibilité d'une méthode avant d'en faire un outil diagnostique.

Pour une validation rigoureuse, il est nécessaire d'obtenir (1) des données quantitatives, (2) chez les mêmes individus – donc à partir d'une étude longitudinale – et, (3) de disposer d'une technique permettant de mettre les données de dissection et de tractographie dans un espace anatomique commun permettant des comparaisons numériques.

8.2. Imagerie en lumière polarisée

Cette technique utilise une propriété optique des gaines de myéline, la biréfringence, qui résulte de l'agencement régulier des lipides et protéines au sein de la myéline [Martenson, 1992]. Cette biréfringence est à l'origine d'une propagation anisotrope de la lumière au travers de la myéline. Dans un milieu biréfringent, l'indice de réfraction dépend de la polarisation du rayon lumineux. Chaque fibre myélinisée possédant un axe optique unique, il est possible de quantifier la biréfringence dite *uniaxe*. Ainsi la transmission de la lumière polarisée au travers d'une coupe histologique dépend des directions relatives de la polarisation lumineuse et des fibres (Figure 20).

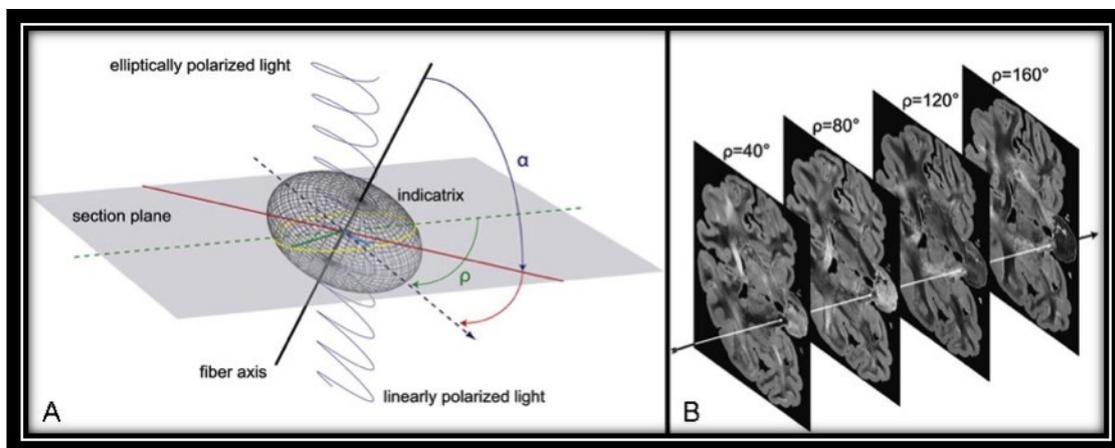


Figure 20. Principe de l'imagerie en lumière polarisée. Les tissus optiquement anisotropes (biréfringents) peuvent être caractérisés par un indice de réfraction, défini comme le ratio entre la vitesse de propagation du rayon lumineux polarisé rectilignement dans le vide et dans le tissu. **A.** L'indice de réfraction hétérogène ou indicatrix, représenté par l'ellipse jaune, transforme la polarisation linéaire du rayon lumineux en polarisation elliptique. **B.** Chaque coupe cérébrale est imagée selon 18 angles de rotation (de 0° à 170°) pour permettre le calcul de la direction des fibres au sein de chaque pixel. D'après Axer et al. [2011].

L'imagerie en lumière polarisée (PLI, Polarized Light Imaging *en Anglais*) évalue la direction des fibres avec une résolution proche de 0,1 mm sur des coupes histologiques. Son extension récente à un dispositif de microscopie automatisée permet d'augmenter cette résolution spatiale à l'échelle du micromètre [Dammers et al., 2010].

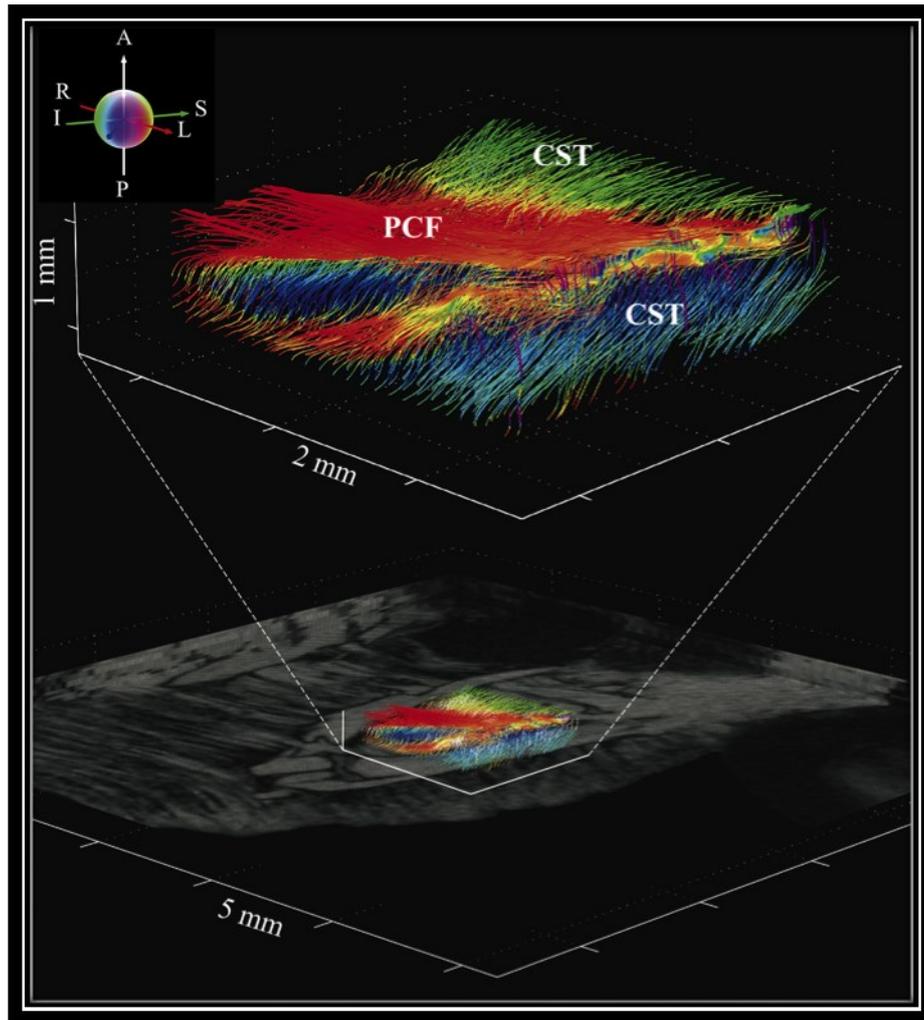


Figure 21. Reconstruction de fibres au sein d'un voxel de $5 \times 5 \times 1$ mm dans la région pontique, à partir de l'acquisition en imagerie en lumière polarisée d'une coupe de cerveau humain. La précision de l'ordre de $100\mu\text{m}$ est remarquable bien que la reconstruction du volume cérébral entier reste encore à ce jour problématique. D'après Axer et al. [2011].

Malgré cette résolution spatiale, la PLI utilise des coupes et souffre de la même limitation que les techniques histologiques, c'est à dire la perte de cohérence 3D des faisceaux étudiés (Figure 21). La reconstruction tridimensionnelle des fibres à l'échelle de l'hémisphère impose donc le recalage des coupes les unes par rapport aux autres et l'application d'un algorithme de tractographie, deux étapes pouvant induire des erreurs. Par ailleurs, la réflexion lumineuse sur la pièce anatomique et sur le dispositif d'acquisition induit des artefacts dont la correction n'est pas triviale et complique donc le recalage coupe à coupe.

8.3. Tomographie en cohérence optique

La tomographie en cohérence optique (ou OCT pour Optical Coherence Tomography *en Anglais*) utilise une onde lumineuse pour capturer des images tridimensionnelles d'un matériau qui diffuse la lumière. L'OCT utilise une lumière dans l'infrarouge proche, dont l'absorption est limitée dans les tissus biologiques, ce qui lui permet de pénétrer le tissu jusqu'à environ 1 mm de profondeur et d'obtenir une résolution de l'ordre du micromètre. L'OCT se situe donc à mi-chemin entre l'échographie par ultrasons (pénétration 10 cm, résolution 150 μm) et la microscopie confocale (pénétration 200 μm , résolution 0,5 μm). L'avantage de l'OCT sur la PLI est qu'elle est applicable à la surface d'un bloc, et non uniquement sur des coupes. Elle ne souffre donc pas des artéfacts induits par les coupes histologiques. Cependant, bien que des images convaincantes aient été publiées sur des échantillons de cerveau de rat (Figure 22), la lourdeur de la technique rend complexe son application à une surface équivalente à celle d'une coupe de cerveau humain, et encore plus à un volume cérébral entier [Magnain et al., 2014].

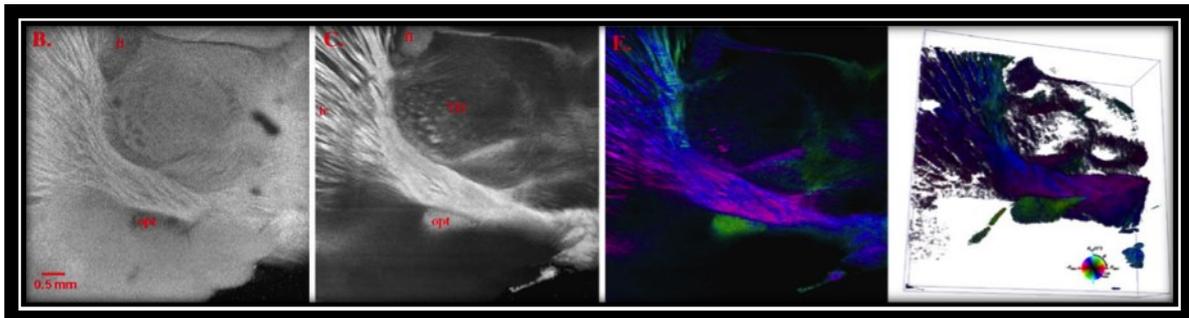


Figure 22. Tomographie en cohérence optique de cerveau de rat. Les images natives (à gauche) sont ensuite combinées pour réaliser une tractographie (image colorée) qui peut, après combinaison de plusieurs surfaces 2D, être visualisée en 3D (image de droite), ici pour un volume de $6 \times 6 \times 0,45 \text{ mm}^3$. D'après Wang et al. [2011].

8.4. Comparaison directe dissection - tractographie *post mortem*

La tractographie *post mortem* est réalisable dans des conditions inapplicables à l'être humain vivant, et permet donc une optimisation des séquences d'acquisitions. Cependant, elle reste une méthode de tractographie et ne permet donc pas une validation de la tractographie *in vivo*. Toutefois, une méthode qui utiliserait la dissection et la tractographie sur le même spécimen, a en théorie plusieurs avantages sur les méthodes décrites plus haut :

- en comparaison à la PLI et à l'OCT : la conservation de la cohérence 3D des faisceaux lors de la dissection (selon la méthode de Klingler) ;
- en comparaison aux modèles animaux : l'application de cette méthode à l'être humain ;
- en ce qui concerne l'IRM *post mortem* : l'utilisation de hauts champs (permettant l'amélioration du rapport signal sur bruit), le temps d'acquisition non limité, l'absence de mouvements, de bruits physiologiques ou thermiques.

Cependant, si la tractographie *post mortem* est possible chez le singe [D'Arceuil et al., 2007], elle nécessite des conditions de fixation (prélèvement immédiat du cerveau après sacrifice de l'animal) et d'acquisition (durant environ 5 heures) strictes en raison d'une diminution rapide du coefficient apparent de diffusion (ADC) et du temps de relaxation T2 après le décès, entraînant une diminution significative du ratio signal-à-bruit [D'Arceuil and de Crespigny, 2007]. Ces conditions sont difficiles à mettre en œuvre sur encéphales humains. Toutefois, l'utilisation d'imageurs à très hauts champs et surtout très forts gradients peut compenser ces modifications *post mortem* mais ne peut, de toutes les façons, directement valider les séquences et les modèles utilisés en clinique du fait de paramètres et de conditions d'imagerie trop éloignés.

Par ailleurs, porter les résultats de la dissection dans le référentiel de l'IRM, pour permettre une comparaison quantitative, n'est pas un problème trivial. Kier et al. [2004a] avaient proposés en ce sens une méthode basée sur des acquisitions IRM en cours de dissection et la segmentation manuelle, sur l'IRM, du faisceau disséqué (Figure 23).

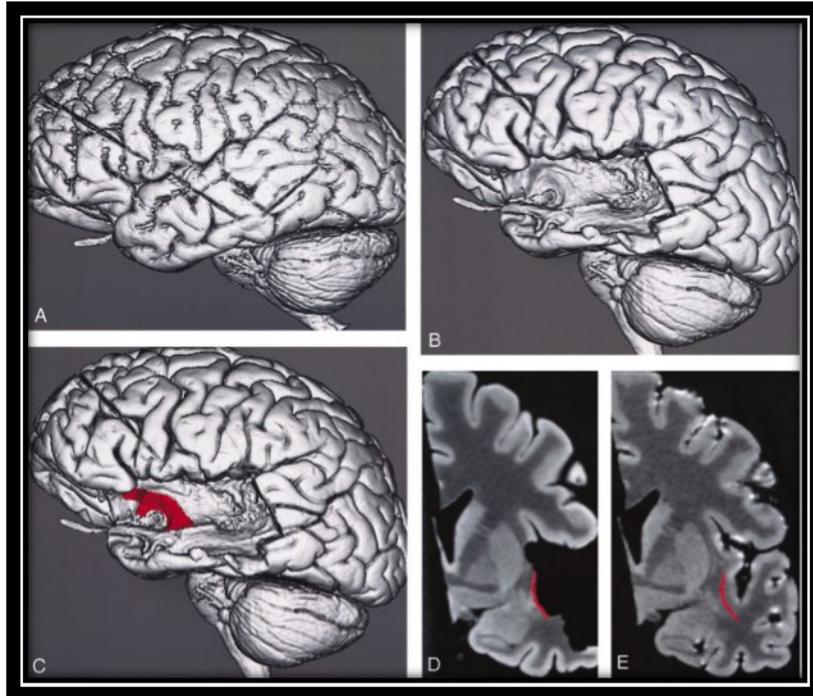


Figure 23. Méthode proposée pour localiser un faisceau mis en évidence en dissection sur l'IRM du même spécimen. D'après Kier et al. [2004a].

Bien que séduisante, cette méthode se heurte à de multiples difficultés parmi lesquelles :

- le temps nécessaire, lié à la multiplication des acquisitions IRM ;
- la nécessité de disposer d'une IRM "à volonté" ;
- l'absence de "texture" sur la surface IRM pour localiser précisément le faisceau disséqué ;
- les recalages entre volumes cérébraux différents (car la méthode de dissection nécessite une destruction progressive de la surface vers la profondeur cérébrale), assez simples si la région disséquée est limitée, mais très complexe en fin de dissection.

Aussi, les travaux de Kier et al. [2004a, 2004b] ne proposaient pas de comparaison à la tractographie, mais uniquement la localisation du faisceau disséqué dans le référentiel de l'IRM, et n'étaient donc pas conçus comme une méthode de validation directe de la tractographie

Conclusion

La tractographie permet l'exploration non invasive des connexions morphologiques intracérébrales à l'échelle du cerveau entier. Cependant, aucune des méthodes proposées pour tenter de la valider n'est pleinement satisfaisante car aucun modèle ne saurait reproduire entièrement et fidèlement la structure cérébrale humaine et son environnement, qui influencent fortement chacune des étapes permettant la tractographie.

Le problème vient notamment du fait que nous ne comprenons qu'imparfaitement les processus physiques qui régissent les mouvements des molécules d'eau environnant les fibres blanches cérébrales, de même que nous ne connaissons que partiellement la morphologie microscopique de la substance blanche. En effet, aucune méthode ne nous permet d'observer directement la structure des fibres *in vivo*. Ainsi, bien qu'aucun modèle ne permettra une reproduction parfaite de la complexité de la substance blanche dans son contexte vivant, l'utilisation du cerveau humain *post mortem* fixé, semble être la solution la moins éloignée anatomiquement.

Pour tenter de mesurer la précision avec laquelle la tractographie reproduit la réalité anatomique, nous avons donc choisi d'utiliser la dissection selon la méthode de Klingler comme vérité terrain. Cette technique permet l'exploration des faisceaux de fibres blanches à la même échelle que la tractographie, c'est-à-dire celle du cerveau entier. En utilisant la méthode de Klingler, nous souhaitons obtenir un compromis acceptable entre résolution et validité anatomique (cf. Tableau 1). En effet, si l'on compare la dissection aux autres méthodes proposées, sa résolution est moins élevée que celle la PLI, l'OCT ou la tractographie *post mortem* qui peuvent obtenir une résolution infra-millimétrique, mais elle est comparable à celle de la tractographie *in vivo*, c'est-à-dire de l'ordre du millimètre. Ainsi, si à l'échelle microscopique on peut considérer que la dissection est imparfaite car la gestion des croisements de fibres reste compliquée de même que la reconnaissance des terminaisons corticales, par contre, à l'échelon macroscopique elle a l'énorme avantage de permettre une visualisation *directe* des faisceaux en conservant leur cohérence 3D, au contraire de la PLI ou de l'OCT.

Tableau 1. Comparaison synthétique des avantages et inconvénients de chacune des méthodes de validation de la tractographie, par rapport à la tractographie *in vivo*

	Référentiel	Conservation cohérence 3D	Croisements de fibres	Utilisation de coupes	Résolution
Tractographie <i>in vivo</i>	Humain	Non	Complexe	Non	1 mm
Klingler	Humain	Oui	Complexe	Non	1 mm
PLI	Humain	Non	Bon	Oui	100 μ m
OCT	Humain	Non	Bon	Oui	100 μ m
Autoradiographie	Animal	Non	Bon	Non	100 μ m
Marquage axonal au manganèse	Animal	Oui	Bon	Non	1 mm
Objets tests	Synthétique	Oui	Bon	Non	10 μ m

Reste le problème de la comparaison des résultats à la tractographie *in vivo*. Bien évidemment, de ce point de vue, la tractographie *post mortem* est la plus adaptée car produisant des résultats dans le référentiel de l'IRM. Mais comme dit plus haut, elle reste une méthode de tractographie. Certes la tractographie *post mortem* a une meilleure résolution spatiale que la tractographie *in vivo* mais elle souffrira toujours des modifications induites par le décès et la fixation, et surtout de la nécessité de reconstruire les fibres par des algorithmes de tractographie. La PLI et l'OCT n'ont quant à elles pas encore franchi le cap de la reconstruction à l'échelle du cerveau humain mais utilisent également une reconstruction indirecte des fibres à partir de vecteurs indiquant les directions des fibres dans chaque voxel ou pixel acquis. Enfin, concernant la dissection, bien que le problème de comparabilité à la tractographie ne soit pas encore résolu, nous proposons, dans la partie suivante, des pistes sur lesquelles nous travaillons actuellement.

Par ailleurs, comme nous le disions plus haut, aucun modèle ne saurait reproduire fidèlement la complexité de l'anatomie *in vivo* de la substance blanche, et donc aucune méthode ne permettra à elle seule une validation de la tractographie. Notre objectif, avec ce travail, est de démontrer que la dissection permet d'apporter des données fiables sur la structure des faisceaux de fibres blanches, à partir desquelles une validation pourra être proposée, notamment à l'échelle macroscopique. Cependant, avant d'utiliser la dissection en tant qu'outil de validation, il est important de montrer qu'il est possible de porter avec fiabilité

les résultats de la dissection dans le référentiel de l'IRM. La partie suivante de ce travail est dédiée à cette démonstration.

III. Troisième partie

Reconstruction 3D des fibres blanches à partir de la dissection : FIBRASCAN

Introduction

La méthode de Klingler est la méthode de référence pour la dissection des fibres blanches cérébrales. Depuis sa description en 1935 et la réalisation de *l'atlas humani cerebri* [Klingler, 1935; Ludwig and Klingler, 1956], seuls quelques travaux de dissection ont été réalisés, car peu de chercheurs et cliniciens trouvaient un intérêt à la connaissance de la morphologie des fibres blanches cérébrales. Ainsi, après la dernière publication de Klingler en 1960 sur les connexions du corps amygdaloïde [Klingler and Gloor, 1960], il a fallu attendre les travaux d'Uwe Ebeling en 1988 et 1992 [Ebeling and von Cramon, 1992; Ebeling and Reulen, 1988] pour que cette méthode de dissection soit à nouveau utilisée pour préciser l'organisation des fibres du pédoncule temporal et son intérêt dans la chirurgie de l'épilepsie. Entre 1997 et 2000, les travaux d'Ugur Ture et al. [1997, 1999, 2000] sur les faisceaux d'association et l'application de leur connaissance en Neurochirurgie faisaient toujours exception parmi les travaux anatomiques et chirurgicaux. Ce n'est qu'après 2004, parallèlement à l'avènement de la tractographie cérébrale, que de nombreux articles scientifiques basés sur la dissection de fibres selon la méthode de Klingler ont été publiés, principalement dans des revues à lectorat Neurochirurgical. En effet, le développement conjoint de la tractographie cérébrale et de la chirurgie éveillée en Neuro-oncologie ont fait prendre conscience du rôle majeur des fibres blanches cérébrales ; la meilleure connaissance de leur organisation devenait indispensable à leur préservation lors de procédures Neurochirurgicales [De Benedictis et al., 2010; Chan-Seng et al., 2014; Duffau, Duffau and Taillandier, 2014].

Cependant, malgré quelques publications dans des revues de Neurosciences [Kinoshita et al., 2014; Martino et al., 2010; Sarubbo et al., 2013] la dissection est encore aujourd'hui perçue comme peu fiable par la communauté Neuroscientifique, probablement car les seules comparaisons avec la tractographie n'étaient que *qualitatives*, sur des individus différents, et que les images obtenues – des photographies – demandaient une représentation mentale tridimensionnelle difficile pour une personne non initiée. En effet, un frein supplémentaire et non négligeable est que, si la dissection est bien connue des chirurgiens, elle est peu accessible aux scientifiques qui, pour juger de sa pertinence, doivent donc se "contenter" des quelques photographies d'une publication scientifique. Un autre problème inhérent à la dissection est

qu'elle impose une destruction progressive des structures superficielles pour mettre en évidence le ou les faisceaux d'intérêt. Ainsi, l'angle de vue de la photographie, la perte du caractère tridimensionnel lié à la photographie, et la perte des repères corticaux de surface rendent complexe la localisation du ou des faisceaux identifiés. À ceci s'ajoute le fait qu'il est *impossible de visualiser un faisceau dans sa globalité* sur une unique prise de vue car non seulement il faut pratiquer l'exérèse des terminaisons corticales pour accéder au faisceau, mais il faut également pratiquer l'exérèse de la face superficielle du faisceau pour en visualiser la face profonde. Ainsi, chaque photographie représente à la manière d'un « instantané », une portion plus ou moins large du faisceau d'intérêt et c'est au lecteur de "reconstruire" le faisceau mentalement ou à l'auteur de le représenter sur un schéma.

Pour pallier à ces problèmes, comme nous l'avons montré plus haut, [Kier et al., 2004a; Kier et al., 2004b] ont proposé de porter les résultats de la dissection dans l'IRM en réalisant des acquisitions du spécimen en cours de dissection et en segmentant la surface du faisceau d'intérêt sur chaque acquisition IRM (Figure 24).

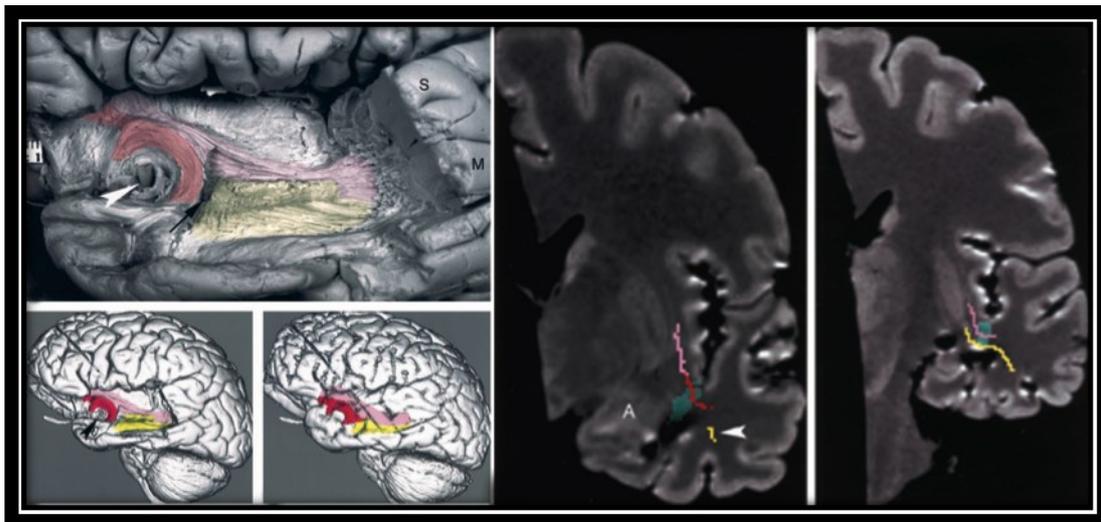


Figure 24. Segmentation des faisceaux formant le pédoncule temporal. La segmentation est réalisée manuellement sur la surface IRM du spécimen en cours de dissection. Avec leur méthode, Kier et al. [2004b] ont pu localiser les segments des faisceaux d'intérêt au niveau de la région du pédoncule temporal sur l'IRM, sans toutefois en réaliser une reconstruction complète.

La lourdeur de leur méthode ne leur a pas permis de reconstruire la totalité des faisceaux disséqués, ce qui aurait impliqué la réalisation de multiples acquisitions IRM en cours de dissection et de multiples recalages entre ces acquisitions IRM.

La méthode que nous proposons est basée sur le même principe d'acquisitions itératives en cours de dissection, de segmentation manuelle des faisceaux d'intérêt et de portage de ces informations dans l'IRM, mais cette fois-ci avec l'ambition de reconstruire les faisceaux disséqués dans leur globalité.

9. FIBRASCAN : Méthode de suivi de dissection et de reconstruction 3D dans l'IRM

Dans ce chapitre, nous décrivons le processus permettant la reconstruction tridimensionnelle et le recalage sur l'IRM des faisceaux disséqués. Le chapitre suivant est dédié à l'évaluation de la précision de chacune des étapes du processus décrit ci-dessous. Il a fait l'objet d'une publication dans NeuroImage (document en Annexe) : *FIBRASCAN: a novel method for 3D white matter tract reconstruction in MR space from cadaveric dissection*. [Zemmoura et al., 2014].

9.1. Préparation de Klingler

Cinq hémisphères cérébraux humains obtenus de quatre sujets inscrits au programme de Dons du corps de la Faculté de Médecine de Tours ont été préparés selon le protocole décrit par Klingler [Ludwig and Klingler, 1956] : extraction cérébrale dans les 48 heures suivant le décès, fixation du cerveau pendant quatre mois dans une solution de formol à 5%⁵ renouvelée toutes les deux semaines, exérèse de la pie-mère et des vaisseaux corticaux, congélation à -23°C pendant une semaine puis décongélation lente à $+5^{\circ}\text{C}$ dans l'eau pendant trois semaines. Les hémisphères étaient ensuite séparés l'un de l'autre par une section sagittale du corps calleux et séparés du tronc cérébral par une section horizontale des pédoncules cérébraux puis plongés dans une solution de formol à 5 % jusqu'à l'étape suivante.

La procédure décrite ci-dessous a été reproduite pour chacun des cinq hémisphères utilisés pour ce travail.

9.2. Support rigide

Chaque hémisphère était positionné sur une platine en PVC, spécialement conçue pour ce travail, et une couche d'un centimètre de paraffine en fusion à 62°C était versée autour de la surface de l'hémisphère. A température ambiante, la paraffine se solidifiait en une

⁵ Comme décrit par Klingler, il s'agit d'une solution aqueuse de formol du commerce (composée de 37% de formaldéhyde et de 10 % d'alcool méthylique stabilisant) que l'on a ensuite diluée. L'appellation "formol à 5 %" correspond donc à solution à 5 % (volume / volume) de la solution aqueuse de formol du commerce à 37%, soit une concentration finale de formaldéhyde de 1,85 % (masse / volume).

quinzaine de minutes puis l'hémisphère ainsi immobilisé sur son support étaient ensuite conservés dans une solution de formol à 5%.

Des repères sphériques rigides contenant un corps gras (BrainLab, Feldkirchen, Allemagne) étaient insérés dans 4 cavités à fond conique, non coplanaires, ménagées dans les parois de la platine PVC, et immobilisés par une vis en plastique avec joint torique (Figure 25).



Figure 25. Platine-support. A gauche : hémisphère positionné sur la platine, maintenu en place par une couche de paraffine (colorée en vert). Quatre vis repères-surfaciques non coplanaires font partie du support. Le centre de chaque tête de vis (coloré en rouge) contient une dépression en demi-sphère de 3 mm de diamètre, correspondant au diamètre du palpeur (en bas à droite) qui équipe le scanner laser et permet une acquisition de points. Chaque vis maintient une sphère repère-IRM, positionnée au fond des cavités, et calée par la vis.

9.3. IRM *post mortem*

L'hémisphère ainsi positionné sur sa platine-support était ensuite immergé dans de l'eau distillée pour être scanné dans une IRM Signa HDxt 1.5T (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI, USA) équipée d'une antenne un élément Emettrice-Réceptrice "birdcage". En comparaison aux antennes multi-éléments, ce type d'antenne permet une homogénéité du signal optimale sur la totalité du volume acquis et limite les déformations géométriques.

Les paramètres d'acquisition étaient les suivants : TR = 7 ms ; TI = 400 ms ; angle de bascule = 20° ; bande passante = 25 kHz ; nombre d'excitations = 1 ; coupes axiales de 1 mm

d'épaisseur, jointives ; matrice = 256×256 ; champ d'exploration = 256×256 mm incluant le specimen et les marqueurs (Figure 26).

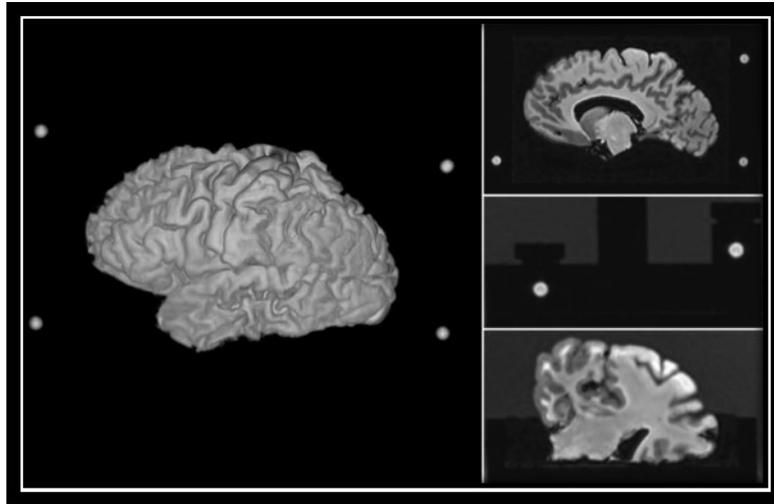


Figure 26. Acquisition IRM volumique pondérée en T1 en Inversion-Récupération, voxels cubiques $1 \times 1 \times 1$ mm, d'un hémisphère cérébral dans sa platine-support avec repères, avant dissection. À droite : coupes sagittale (en haut) et coronale (en bas) montrant les interfaces cerveau-paraffine, cerveau-sérum physiologique, substance grise-substance blanche, ainsi qu'un artefact retrouvé systématiquement, sous forme d'un hypersignal cortico-sous-cortical prédominant en région centrale diminuant la différenciation gris-blanc déjà normalement peu visible dans cette région. À droite et au milieu, coupe coronale passant par les repères "antérieurs" montrant que les quatre repères sont non-coplanaires.

9.4. Dissection de Klingler et acquisitions de surfaces itératives

Après acquisition IRM, l'hémisphère était disséqué selon la méthode de Klingler, c'est-à-dire par destruction progressive du cortex puis soulèvement des fibres par couches fines à l'aide d'instruments en bois et de micro-pinces. Lorsque cela était nécessaire, nous utilisons une loupe (1.5 ou 3 dioptries) voire un microscope chirurgical. Afin de permettre un échantillonnage suffisant, la dissection de chaque hémisphère était acquise au minimum toutes les 30 minutes, voire plus fréquemment selon l'appréciation de l'opérateur, lorsque la portion de faisceau disséquée était très fine (Figure 27).



Figure 27. Six des 61 étapes de dissection de cet hémisphère gauche, en prise de vue orthogonale.

À chaque étape ainsi définie était pratiquée une acquisition des données de dissection par deux modalités différentes:

- la *surface* du spécimen était acquise par un scanner laser (ScanArm V2®, FARO Technology Inc., Lake Mary, FL, USA) composé d'un bras articulé fixé au plan de travail par une ventouse, et équipé d'une tête laser dont la précision annoncée par le constructeur était de 35 μm . La tête possédait en outre un dispositif d'acquisition de points par un palpeur à extrémité sphérique de 3 mm, qui permettait l'acquisition des points repères surfaciques (dépressions dans les têtes de vis). Les points acquis par le laser servaient à la construction d'un maillage de triangles ou "mesh", correspondant à la surface, que le logiciel Geomagic Studio® (Geomagic, Research Triangle Park, USA), fourni avec le scanner laser permettait de visualiser en temps réel ;
- la *texture* était acquise à l'aide de deux appareils photographiques (Pentax© K-20 avec objectif Pentax© D-FA 100 mm f/2.8 Macro), l'un positionné orthogonalement à la pièce anatomique, l'autre obliquement pour augmenter la surface visible (Figure 28). L'éclairage était assuré par un flash annulaire Pentax© AF-160 FC fixé à l'objectif de l'appareil orthogonal. Le diaphragme était fermé à f/16 pour assurer une profondeur de champ suffisante tout en évitant les phénomènes de diffraction. Les appareils photographiques étaient fixés à une colonne et pilotés, via un câble USB, par un ordinateur à l'aide du logiciel Pentax REMOTE Assistant™ 3. Ceci nous permettait une prévisualisation rapide. Les photographies étaient alors stockées aux formats

RAW/DNG et JPG. La pièce anatomique était placée à plat, sur un plateau tournant (pas de 90°) permettant l'acquisition de vues supérieures et inférieures par l'appareil positionné obliquement. La pièce anatomique était entourée de diffuseurs blancs pour limiter les ombres.



Figure 28. Poste de travail pour les acquisitions de surface en cours de dissection. Les 2 appareils photographiques permettaient une acquisition de l'information de texture des spécimens anatomiques. Le scanner laser permettait l'acquisition de la surface disséquée.

L'image texture était importée aux formats JPG/PNG dans la plateforme logicielle FIBRASCAN. L'acquisition laser était importée au format STL/OBJ.

Chaque hémisphère était ainsi disséqué de manière à mettre en évidence les différents segments du faisceau arqué, le faisceau occipito-frontal inférieur, le faisceau longitudinal inférieur, et le faisceau unciné.

9.5. Projection de texture

La première étape de traitement était une simplification des surfaces avec le logiciel Geomagic® fourni avec le scanner laser, ce qui diminuait le poids des fichiers à traiter par la suite. Cette étape nécessitait pour chaque surface, un contrôle anatomique manuel pour s'assurer que la simplification ne créait pas d'aberration.

Après cette étape de simplification, les données surfaciques et photographiques étaient importées dans une plateforme logicielle, Fibrascan, développée pour ce travail.

Au sein de la plateforme logicielle, les textures acquises par photographie étaient projetées sur la surface correspondante (Figure 29). Pour réaliser la projection de texture, il fallait déterminer la position du projecteur virtuel dans l'espace. Cette étape était semi-manuelle : la hauteur du projecteur correspondait à la hauteur du capteur de l'appareil photographique ; l'angle de vue correspondait à celui du couple longueur focale de l'objectif/taille du capteur ; et le positionnement final se faisait à l'aide des 4 points repères surfaciques (centres des têtes de vis) visibles à la fois sur les surfaces et les photographies acquises. Les paramètres de la projection de texture ainsi définis étaient enregistrés et réappliqués à chaque couple surface/texture, les prises de vues ayant été faites selon les mêmes paramètres.

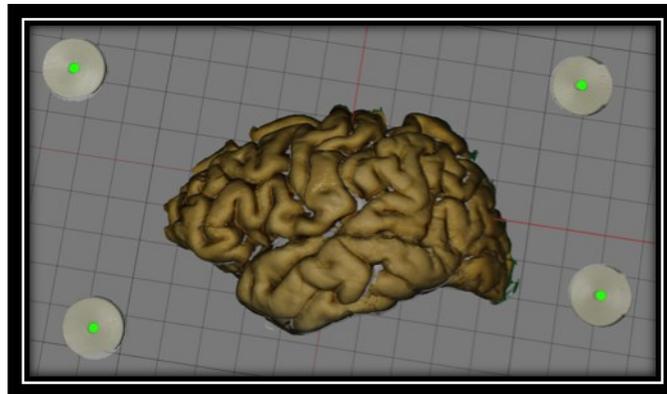


Figure 29. Résultat de la projection de texture sur la surface initiale de l'hémisphère.

Lorsqu'une portion de surface n'était pas visible lors de l'acquisition photographique (notamment en début de dissection lorsque les sulci et gyri formaient des cavités profondes, ou par exemple la portion inféro-médiale du lobe temporal) la surface ne contenait donc aucune information de texture. Ce problème était toutefois limité par l'utilisation de l'appareil photographique oblique permettant l'acquisition de vues supérieures et inférieures, qui étaient ensuite «fusionnées» à la vue orthogonale. Cette étape de projection de texture permettait à chaque surface acquise d'être enrichie de l'information de couleur pour faciliter la future segmentation du/des faisceaux. L'utilisation des diffuseurs blancs limitaient les ombres et permettaient la «fusion» des trois textures (vue orthogonale, vue supérieure, vue inférieure) utilisées pour chaque surface.

9.6. Recalage Surface-Surface

Les surfaces texturées étaient ensuite recalées les unes aux autres par recalage rigide des points repères. Ce recalage était basé sur la méthode décrite par Besl et McKay [1992],

l'ICP. L'ICP, pour *Iterative Closest Point* est un algorithme itératif qui permet de trouver la transformation à appliquer à un nuage de points A (limité ici aux 4 points repères) à faire correspondre à un nuage de points B . Cet algorithme minimise la distance moyenne entre les deux nuages à recaler qui sont itérativement déplacées (rotations et translations).

9.7. Segmentation interactive

Les surfaces texturées recalées pouvaient ensuite être visualisées dans la plateforme logicielle, où des outils (outil pinceau, outil rectangle, outil brosse, outil remplissage...) permettaient la segmentation interactive des faisceaux d'intérêt. Ainsi pour chaque surface texturée, les segments de surfaces correspondant aux faisceaux étaient sélectionnés et labellisés (Figure 30). Les coordonnées des points labellisés étaient ensuite enregistrées.

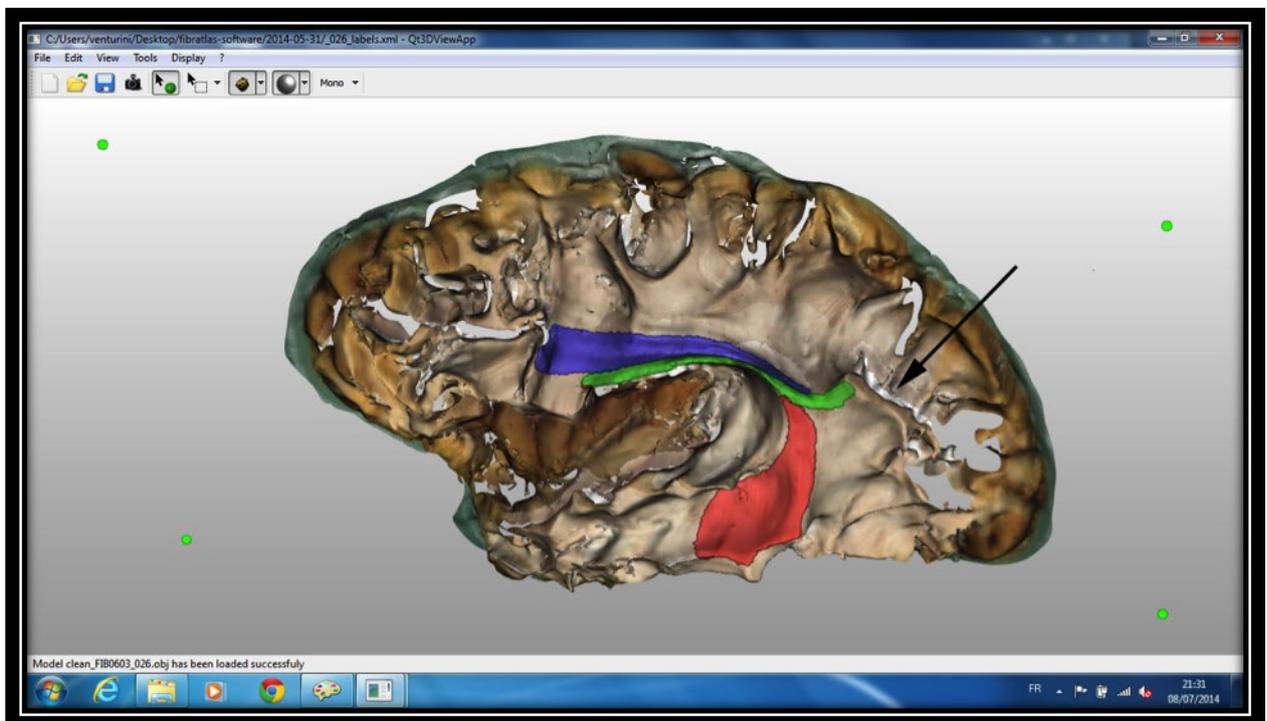


Figure 30. Segmentation de la surface 26 d'un hémisphère gauche (capture d'écran de la plateforme logicielle dédiée). On visualise deux segments du faisceau arqué : en rouge le segment long et en vert le segment horizontal. Le segment de surface labellisé en bleu correspond au deuxième segment du faisceau longitudinal supérieur (ou SLF II). Une portion de la surface ne contient aucune information de texture (flèche).

9.8. Reconstruction tridimensionnelle

Les surfaces texturées ayant été recalées préalablement à la segmentation, on obtenait pour chaque faisceau une "pile" de segments de surfaces. Pour porter ces données dans le référentiel de l'IRM, elles étaient transformées en un volume. Pour cela, un volume de matrice

identique à l'IRM était créé et positionné autour de l'empilement des surfaces. La valeur des seuls voxels situés à l'intersection des segments de surfaces était fixée à 1, celle des autres voxels était nulle. Du fait de la résolution spatiale moindre de l'IRM par rapport aux acquisitions surfaciques, les espaces entre deux surfaces étaient comblés par cette méthode (Figure 31).

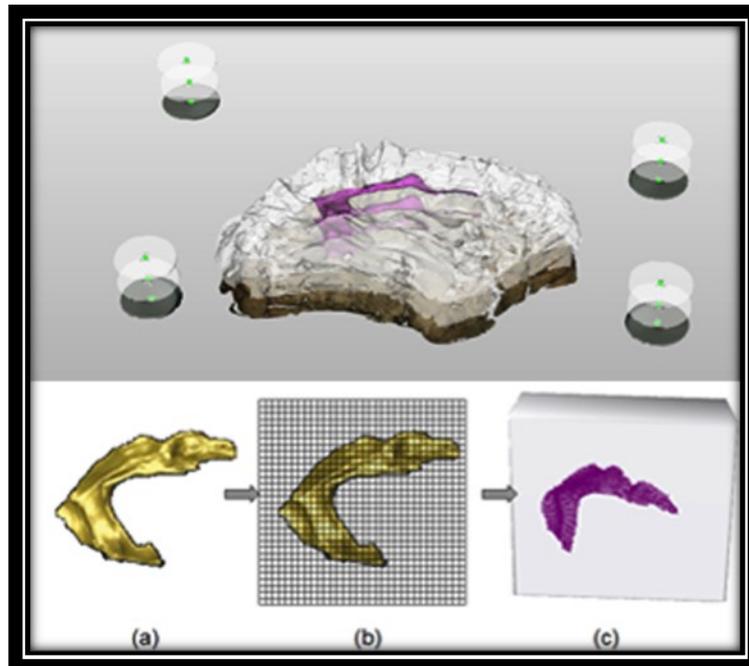


Figure 31. Voxellisation des données surfaciques. La pile de segments de surfaces (en haut) permettait l'obtention d'un faisceau (a) constitué de plusieurs maillages de triangles (surfaces). Une grille (b) dont la matrice correspondait à celle de l'IRM (voxels cubiques $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$) était construite pour obtenir le volume correspondant (c).

9.9. Recalage Surface-IRM

Le recalage entre données issues des surfaces et IRM était basé sur un recalage rigide entre deux nuages de points constitués respectivement des points repères surfaciques et des sphères repères IRM. Après extraction du centre des sphères, un recalage rigide ICP était réalisé entre ces deux nuages de points. Il était ensuite appliqué une translation (Figure 32) pour corriger la distance connue entre les points repères et les sphères repères (distance d connue par construction des vis) pour obtenir le recalage final (Figure 33 et 34).

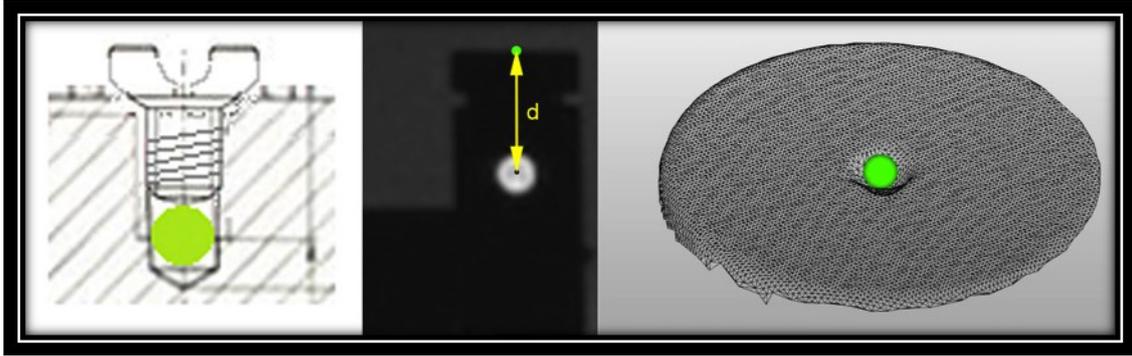


Figure 32. Translation nécessaire au recalage surface-IRM liée à la distance d existant entre les points repères surfaciques (vert) et le centre des sphères repères IRM. À droite, la surface d'une tête de vis acquise par le scanner laser (maillage de triangles) et le point repère acquis par le palpeur du scanner laser (représenté par une sphère verte).

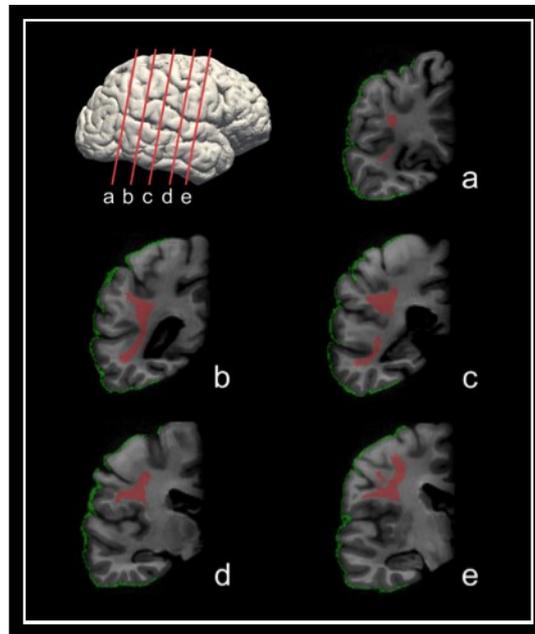


Figure 33. Résultat final du recalage des données surfaciques dans l'IRM. Visualisation de la surface corticale (ligne verte) et du faisceau arqué (en rouge) sur des coupes coronales d'un hémisphère droit.

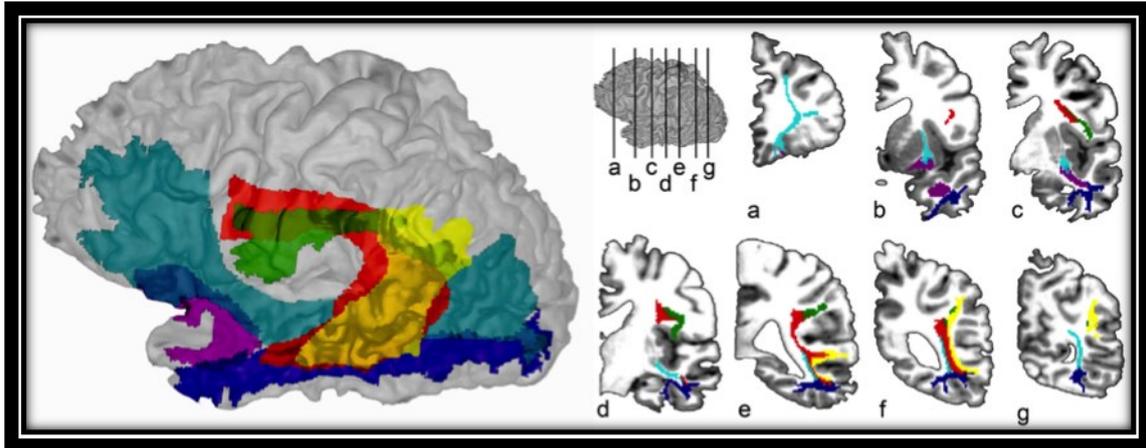


Figure 34. Reconstruction de plusieurs faisceaux d'association dans le référentiel de l'IRM avec FIBRASCAN. Les trois segments du faisceau arqué (segment horizontal en vert, vertical en jaune et long en rouge), le faisceau occipito-frontal inférieur (cyan), le faisceau unciné (violet) et le faisceau longitudinal inférieur (bleu) sur une vue latérale (à gauche) et en coupes coronales (à droite).

10. Evaluation de FIBRASCAN

Chacune des étapes permettant la reconstruction des faisceaux dans l'IRM a été évaluée pour valider notre méthode.

10.1. Évaluation du recalage surface-surface et de la reproductibilité de l'acquisition de surface

Comme nous l'avons vu, l'algorithme ICP évalue la distance moyenne entre deux surfaces puis la minimise en déplaçant les surfaces de manière itérative. La méthode de recalage utilisée par FIBRASCAN minimisait ainsi la distance entre les points repères surfaciques. Cette méthode de recalage ainsi que la reproductibilité des acquisitions de surface ont été évaluées comme suit :

Pour l'évaluation du recalage (ICP et repères surfaciques)

- la surface d'une pièce anatomique a été acquise 3 fois à la même étape de dissection mais avec des orientations différentes ; l'étape de dissection choisie montrait une vaste zone de substance blanche dont nous voulions évaluer l'acquisition surfacique ;
- ces 3 surfaces ont ensuite été recalées par paires en utilisant la méthode de recalage proposée dans FIBRASCAN : recalage des seuls points repères surfaciques palpés mécaniquement par la tête du scanner et algorithme ICP ;
- en fin de recalage, la distance moyenne entre points repères homologues fournie par ICP dépendait théoriquement des erreurs d'acquisition et de recalage. En pratique elle reflétait essentiellement la robustesse de la méthode de recalage, la localisation des repères qui était obtenue par palpation directe avec la tête du scanner étant peu sujette à erreur ;
- la très faible distance obtenue (0,05 mm, cf. résultats) a démontré la performance de la technique de recalage choisie et a permis l'étape de validation suivante

Pour l'évaluation de la reproductibilité de l'acquisition des surfaces, nous avons poursuivi l'expérience précédente :

- pour chaque paire de surfaces recalées à l'étape précédente, nous avons calculé les distances moyenne et maximum entre les deux surfaces de substance blanche de

l'ensemble du spécimen. A cette fin, l'algorithme ICP a été appliqué à l'ensemble des points de chaque paire de surfaces à l'exclusion des points repères surfaciques. L'ICP a été utilisé pour cette seule évaluation de distance, sans modification du recalage initial.

- Ces distances moyenne et maximum dépendaient théoriquement : de l'erreur d'acquisition des surfaces (non reproductibilité liées à l'utilisation du scanner laser) et de l'erreur de recalage, quasi nulle comme démontré plus haut. De ce fait, la distance inter-surfaces obtenue lors de cette expérience dépendait principalement de la reproductibilité des acquisitions de surfaces, une reproductibilité parfaite devant donner une distance nulle ;
- pour chaque paire de surfaces, nous avons généré des cartes de distances et des histogrammes à partir de la large zone de substance blanche acquise (région d'intérêt de notre étude) (Figure 35).

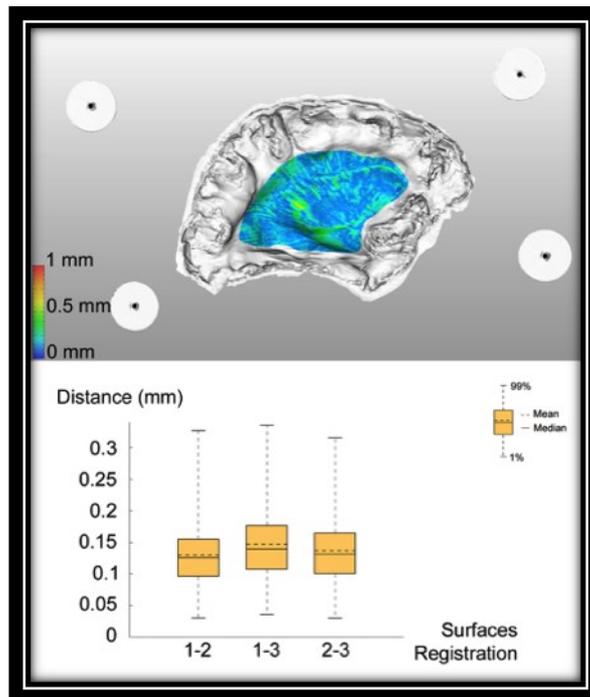


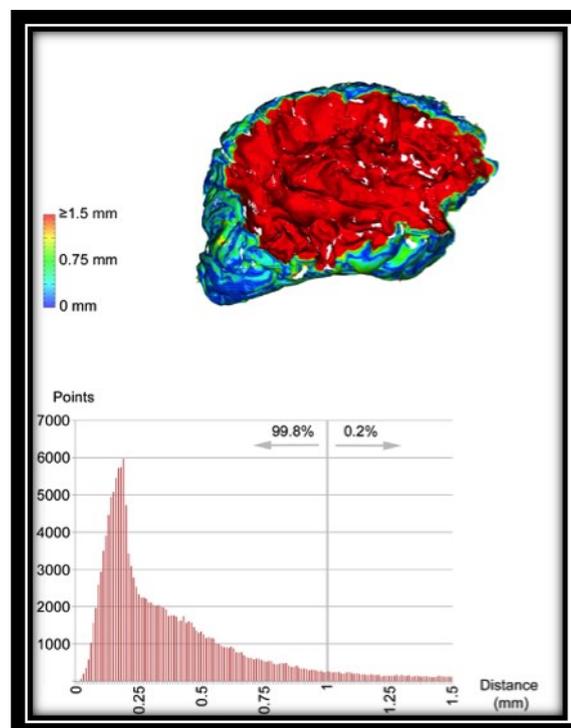
Figure 35. Recalage surface-surface et reproductibilité de l'acquisition de surface. La surface d'une large région de substance blanche d'un même spécimen a été acquise trois fois, et les surfaces recalées par paires (1-2, 1-3, 2-3) avec l'algorithme ICP sur les points repères. Pour chacune des trois paires, la distance entre les deux surfaces de substance blanche a été calculée. En haut : représentation de la distance inter-surfaces 1-2 après recalage sous forme d'une carte colorée. En bas : valeur moyenne et médiane de la distance inter-surfaces pour chacune des trois paires de surfaces.

Après recalage, la distance moyenne entre surfaces et la distance maximum était de 0,138 mm ($\sigma = 0,058$ mm) et 0,923 mm respectivement.

10.2. Évaluation de la déformation du spécimen en cours de dissection

Bien que la fixation des spécimens au formol rende leur consistance ferme, nous avons considéré qu'il était possible que les manipulations nécessaires à la dissection pouvaient induire des déformations. De telles déformations auraient alors du être prises en compte lors de la lecture de nos résultats et notamment lors de la transposition vers le référentiel de l'IRM.

Pour deux des hémisphères disséqués pour ce travail, nous avons utilisé la surface "zéro" (avant dissection) et la surface de la dixième étape de dissection, puis mesuré la distance entre les surfaces des régions non disséquées (Figure 36). Nous avons en effet considéré que ces régions périphériques non disséquées étaient les seules régions surfaciques dont les coordonnées étaient censées être identiques entre ces deux étapes de dissection, et qu'une éventuelle déformation des spécimens aurait engendrée un "affaissement" de ces régions périphériques.



Pour les deux spécimens utilisés pour cette évaluation, la distance moyenne entre les régions non disséquées des paires de surfaces (0-10) était de 0,356 mm ($\sigma = 0,231$ mm)., tandis que l'erreur n'excédait 1 mm que pour 0,2 % des points.

10.3. Évaluation de la distance entre deux étapes de dissection

La distance entre deux étapes de dissection peut être considérée comme la résolution spatiale de notre méthode entre surfaces. Elle dépendait principalement du rythme d'acquisition par l'opérateur. Comme précisé plus haut, ce rythme d'acquisition était défini arbitrairement par un délai minimum de 30 minutes entre 2 étapes, qui pouvait cependant être accéléré subjectivement à l'étape de dissection par l'opérateur selon la finesse du faisceau en cours de dissection.

Cette résolution spatiale a été évaluée sur un spécimen par la distance inter-surfaces de onze étapes consécutives de dissection du faisceau arqué (Figure 37).

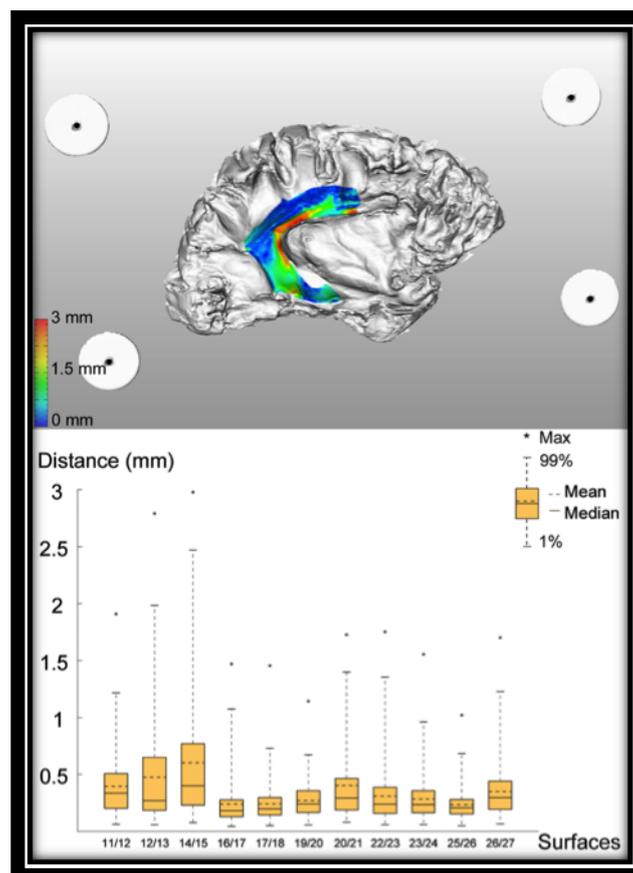


Figure 37. Résolution spatiale de la méthode, évaluée par la distance entre étapes consécutives de dissection. En haut : une étape de dissection illustrée ou apparaît la carte de distances dans la région du faisceau en cours de dissection (faisceau arqué). En bas : Distances inter-surfaces de onze étapes de dissection.

La distance moyenne et maximum entre deux étapes consécutives était de 0,345 mm ($\sigma = 0,115$ mm) et 2,978 mm. La moyenne des distances maximum des onze étapes considérées, qui représente la résolution spatiale de la méthode entre deux surfaces était de 1,773 mm ($\sigma = 0,609$ mm).

10.4. Évaluation de la reconstruction 3D des faisceaux

Le processus de reconstruction tridimensionnelle d'un faisceau à partir de l'empilement de segments de surfaces et de la voxellisation a été évalué sur un objet test simple. Cet objet test était un œuf dur, que nous avons positionné dans le support PVC contenant les repères IRM et surfaciques. L'œuf était maintenu en place par de l'agar-agar, qui se substituait donc à la paraffine utilisée pour maintenir les spécimens. L'œuf dur dans le support et l'agar-agar a été scanné à l'IRM dans les mêmes conditions que les spécimens, puis "disséqué" selon la méthode FIBRASCAN. L'œuf a ensuite été reconstruit à partir de la pile de segments de surfaces et le volume reconstruit a ensuite été comparé au volume IRM à l'aide de plusieurs indicateurs : la *précision* et le *rappel* obtenus par la matrice de confusion, et les coefficients de Dice [1945] et de Jaccard [1901]. La précision et le rappel sont calculés à partir de la matrice de confusion, un outil permettant la mesure du recouvrement de deux ensembles différents. Ici, il s'agissait de comparer deux volumes binaires : V (le volume reconstruit à partir de la "dissection") et V_{ref} (le volume de référence ou *vérité-terrain*, c'est-à-dire le volume IRM binarisé).

Si la matrice de confusion est :

	V	\notin	\in
V_{ref}			
\notin		a	b
\in		c	d

Alors la précision P , définie comme le ratio entre les voxels communs aux deux ensembles et la totalité des voxels du volume à valider (donc y compris ceux non présents dans la vérité terrain), est

$$P = \frac{d}{b + d},$$

et le rappel R , défini comme le ratio entre les voxels communs aux deux ensembles et la totalité des voxels de la vérité terrain, est

$$R = \frac{d}{c + d} .$$

Le coefficient de Dice D est l'intersection divisée par le volume moyen des deux ensembles :

$$D = 2 \frac{V \cap V_{\text{ref}}}{|V + V_{\text{ref}}|} .$$

Le coefficient de Jaccard J est le ratio est l'intersection et l'union des deux ensembles :

$$J = \frac{V \cap V_{\text{ref}}}{|V \cup V_{\text{ref}}|} .$$

Un recouvrement parfait aurait pour résultat une valeur de P , R , D ou J égale à 1. Les résultats de l'évaluation réalisée sur l'œuf dur sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Évaluation de la reconstruction de faisceau à partir d'un objet test (œuf dur).

Indice	Valeur expérimentale
Précision	0,869
Rappel	0,972
Coefficient de Dice	0,918
Coefficient de Jaccard	0,848

10.5. Évaluation du recalage surface-IRM

La robustesse de notre méthode de recalage des données surfaciques dans le référentiel de l'IRM a été évaluée à partir de deux hémisphères. Pour chacun, une acquisition IRM supplémentaire à l'acquisition "zéro" a été réalisée à une étape avancée de dissection montrant le faisceau arqué. La surface IRM du spécimen (interface sérum physiologique-spécimen) était extraite par seuillage. La région de substance blanche en cours de dissection était segmentée manuellement sur cette surface puis recalée à la surface laser (ICP, points repères surfaciques et des sphères repères IRM). Lors de ce recalage, l'ICP fournissait la distance entre surfaces de la substance blanche obtenues par IRM et scanner laser (Figure 38).

L'algorithme ICP a montré une distance moyenne et maximum de 0,6 mm ($\sigma = 0,274$ mm) et 2,2 mm respectivement.

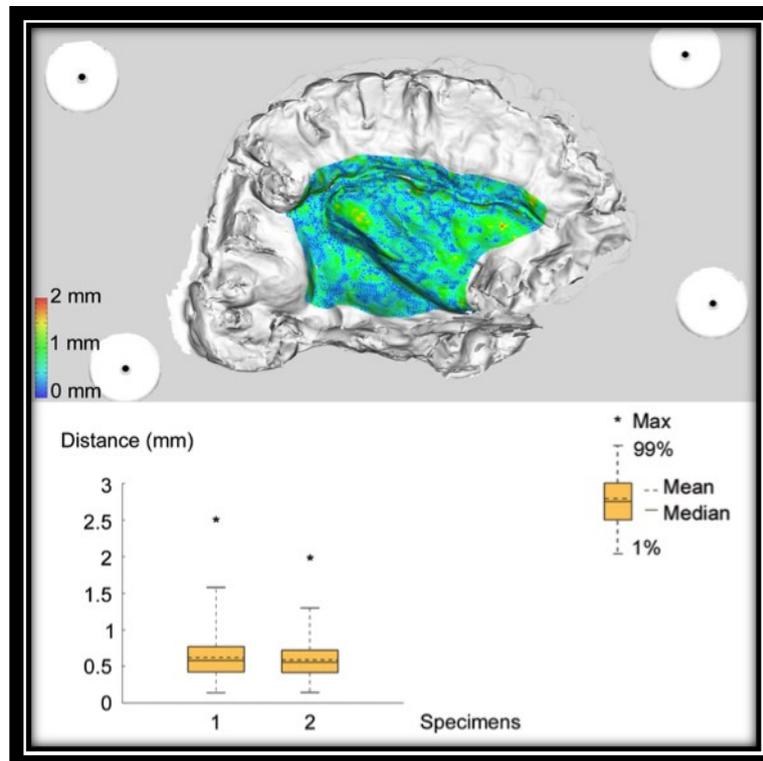


Figure 38. Recalage surface-IRM. L'évaluation de cette étape a été réalisée sur deux hémisphères. Une IRM a été réalisée à une étape avancée de dissection. Après extraction de la surface IRM (par seuillage), un recalage entre cette surface et la surface laser était réalisé avec l'algorithme ICP, puis les distances entre les deux surfaces mesurées sur une large région de substance blanche. En haut : Carte colorée des distances après recalage. En bas : Intervalles de distances inter-surfaces pour chacun des deux hémisphères testées pour cette évaluation.

10.6. Précision globale de la méthode

Lorsqu'on considère l'ensemble des erreurs qui peuvent s'additionner lors de chacune des étapes de notre méthode, on obtient une précision globale de l'ordre du millimètre (Tableau 3).

Tableau 3. Précision de la méthode FIBRASCAN.

Type d'erreur	Erreur moyenne
Recalage surface-surface	0,1 mm
Recalage surface-IRM	0,6 mm
Déformation induite par la dissection	0,3 mm
Précision globale	1 mm

11. Discussion

La méthode FIBRASCAN est une méthode originale de reconstruction des faisceaux de fibres blanches cérébrales dans le référentiel de l'IRM à partir d'acquisitions itératives de surface au cours de la dissection d'un spécimen humain selon la technique de Klingler. Afin de démontrer la faisabilité de FIBRASCAN, nous avons reconstruit et visualisé dans l'IRM, à titre d'exemple, six faisceaux d'association.

Du fait de l'utilisation de la dissection de Klingler comme référence anatomique, notre méthode est contrainte par la limitation principale de cette technique qui est la difficulté à gérer les croisements de fibres. Toutefois, lors de la dissection, il est possible pour l'opérateur de "suivre" un faisceau dans une région de croisement, en "sacrifiant" le faisceau croisant (Figure 39).

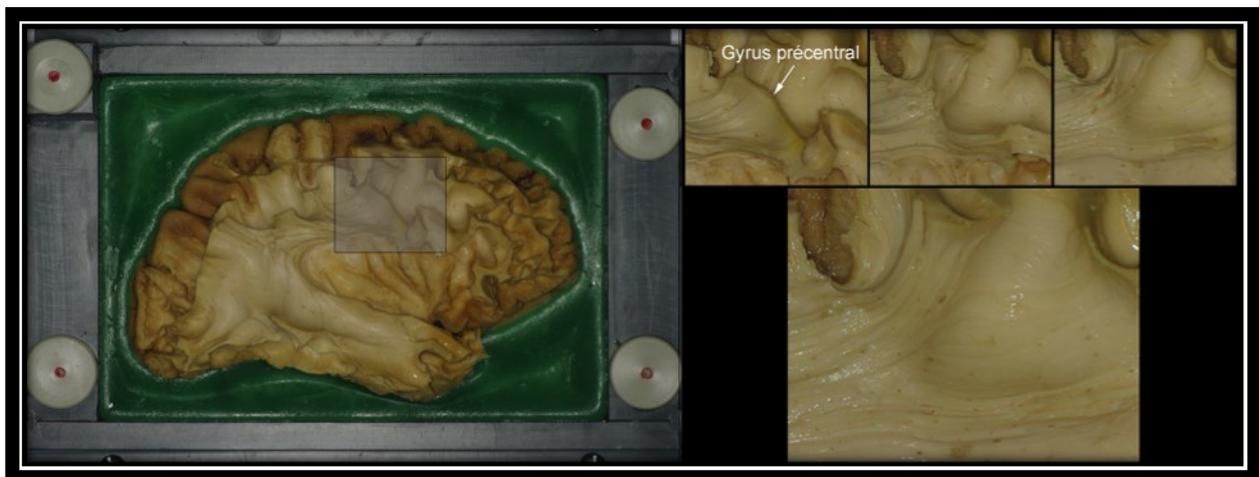


Figure 39. Exemple de gestion d'un croisement de fibres lors d'une dissection de Klingler. Ici, les fibres du gyrus précentral, donc les fibres du faisceau cortico-spinal, croisent la terminaison antérieure des fibres du faisceau longitudinal supérieur dont une partie se dirige vers la portion postérieure du gyrus frontal moyen. La dissection, en "sacrifiant" les fibres du faisceau cortico-spinal, permet de suivre les fibres du faisceau longitudinal supérieur.

Ainsi, il ne sera pas possible de reconstruire l'ensemble des faisceaux d'un même hémisphère. Cependant, il est tout à fait envisageable, comme l'ont fait Schmahmann et Pandya dans leur atlas des faisceaux basé sur l'autoradiographie de cerveaux de macaques [Schmahmann and Pandya, 2009], de reconstruire l'ensemble des faisceaux à partir de plusieurs spécimens. Toutefois, la variabilité interindividuelle tant de la localisation que de la

forme des faisceaux peut être majeure. Par exemple, Burgel et al. [2006] ont montré qu'il existe moins de 50 % de recouvrement interindividuel pour la portion antérieure du cingulum, ou moins de 70 % pour le faisceau unciné. Un atlas basé sur la dissection, qui est un outil peu propice aux analyses de groupes du fait de la consommation de temps qu'il requiert, nous semble moins intéressant qu'une analyse quantitative précise à l'échelon individuel. En effet, nous envisageons FIBRASCAN comme un outil qui permettra une comparaison directe entre la tractographie et la dissection d'un même individu, sur une sélection de faisceaux différente d'un individu à l'autre. FIBRASCAN est donc le pré-requis à cette comparaison directe, qui nécessitera le développement d'un outil de comparaison entre données tractographiques et données FIBRASCAN, et également une étude longitudinale avec IRM de diffusion *in vivo* (donc du vivant des sujets volontaires) puis dissection FIBRASCAN (donc *post mortem* de ces mêmes sujets).

Par ailleurs, une des limites habituelles de la méthode de Klingler, liée à son caractère destructeur, est la difficulté à identifier les terminaisons corticales du faisceau disséqué. Bien que ce problème ait été soulevé et qu'une modification de la technique de Klingler ait été proposée par Martino et al. [2011] pour préserver le cortex lors de la dissection et ainsi identifier plus aisément les terminaisons corticales, nous proposons ici une autre approche pour tenter de résoudre ce problème. En effet, notre méthode permet non seulement une reconstruction tridimensionnelle des faisceaux dans l'IRM, mais surtout, lors de la navigation entre les surfaces texturées, la visualisation et donc l'identification *a posteriori* des portions superficielles des faisceaux. En effet, ces portions superficielles sont réséquées en début de dissection, lorsqu'il n'est pas possible pour l'anatomiste de définir avec précision si ces fibres superficielles font partie intégrante du faisceau d'association ou sont au contraire des fibres sous-corticales "en U".

À ce jour, deux perspectives d'amélioration de la robustesse anatomique de notre méthode n'ont pas été encore testées. Il s'agit d'une part de la vérification de la reproductibilité de la labellisation au sein de la plateforme logicielle que nous avons développée, par des anatomistes indépendants, n'ayant donc pas pratiqués eux-même la dissection du spécimen. D'autre part, la définition de règles anatomiques de dissection permettra une plus grande reproductibilité de la dissection de Klingler et une meilleure fiabilité de la comparaison des résultats avec d'autres centres experts.

IV. Quatrième partie

Impact de la méthode de Klingler sur la structure microscopique de la substance blanche cérébrale

Introduction

Comme mentionné dans la seconde partie, les méthodes anatomiques historiques pour l'étude de la morphologie des faisceaux de fibres blanches sont principalement l'*Anatomopathologie*, qui étudie la dégénérescence secondaire (ou Wallérienne) de fibres sur des coupes sériées de cerveaux lésés, et l'*Anatomie de développement*, qui étudie l'apparition des fibres myélinisées sur des coupes sériées de cerveaux en développement (voir l'Atlas de Dejerine et Dejerine-Klumpke [1895] pour plus de détails). Les travaux de dissection ont eux principalement permis d'apporter une vision tridimensionnelle des faisceaux, facilitant l'appréhension de leur morphologie à l'échelle macroscopique. La méthode de Klingler [Ludwig and Klingler, 1956] est, encore à ce jour, la méthode de dissection de référence. Elle repose sur une préparation des pièces anatomiques spécifique à la dissection de fibres : après fixation lente dans une solution de formol à 5 %, la pièce est congelée pendant plusieurs jours avant d'être décongelée lentement puis à nouveau conservée dans une solution de formol peu concentrée. Ce processus permet non seulement d'obtenir un cortex brun foncé et de consistance spongieuse, facilitant sa dissociation de la substance blanche, mais également de faciliter le soulèvement de fins paquets de fibres par des instruments mousses, en bois tendre, pour la mise en évidence des faisceaux. Cette technique, décrite au milieu du XX^{ème} siècle n'a connu initialement que peu de succès. Mais avec l'avènement de la tractographie de diffusion IRM et le regain d'intérêt de la communauté scientifique pour la morphologie des connexions cérébrales, plusieurs travaux de dissection ont été publiés, principalement dans des revues neurochirurgicales [Fernandez-Miranda et al., 2008; Kinoshita et al., 2012; Martino et al., 2010; Peltier et al., 2006; Peuskens et al., 2004; Ture et al., 2000], mais également dans le domaine des neurosciences [Martino et al., 2010; Sarubbo et al., 2013]. Toutes ces publications ont utilisé la technique de Klingler bien qu'aucune étude n'ait exploré les conséquences de cette méthode de préparation sur la structure de la substance blanche.

Une des critiques de cette technique est en effet que l'impact de la congélation sur la structure des fibres n'est pas clairement identifié, pas plus que ses conséquences sur la dissociation des fibres facilitant la dissection. La seule connaissance que nous avons concernant cette méthode de préparation vient de la déclaration de Josef Klingler, dans son atlas [Ludwig and Klingler, 1956] :

"L'effet de la congélation est probablement le suivant. La solution aqueuse de formol ne pénètre pas ou peu dans les fibres à gaine de myéline, mais elle s'infiltré entre celles-ci. C'est donc là que se forme la plus grande quantité de glace. Or, le volume de glace étant supérieur d'environ 10 % à celui de l'eau, il se produit une légère dissociation des fibres, et c'est précisément cette dissociation qui non seulement facilite l'isolement des faisceaux très grêles, mais est même la condition indispensable à cet isolement."

Cette assertion n'a jamais été remise en cause mais n'a surtout jamais été vérifiée, ce qui, probablement, explique en partie le peu de crédit accordé à cette technique par la communauté neuroscientifique, qui la décrit fréquemment comme une méthode historique et quelque peu empirique.

Pour démontrer si la fixation au formol et la congélation-décongélation induisent une séparation des fibres axonales les unes des autres, et si elles altèrent les membranes cellulaires, les espaces intra- ou extra-cellulaires, ou les gaines de myéline, nous proposons dans cette partie d'explorer les effets (1) de la congélation-décongélation, (2) de la fixation, et (3) de la dissection, sur l'ultrastructure de la substance blanche. Ce travail est le premier à fournir des données sur l'impact de la préparation de Klingler sur la structure microscopique des fibres blanches cérébrales.

Cinq cerveaux humains, obtenus avec le programme de Dons du corps de l'Université de Tours, ont été utilisés pour cette étude. L'extraction des cerveaux a été réalisée dans les 24 heures suivant le décès, pour limiter les risques de décomposition. L'étude de l'impact de la méthode de Klingler a ensuite été étudié en histologie puis en microscopie électronique.

Ce travail a été publié dans Brain Structure and Function (document en Annexe) : *How Klingler's dissection permits exploration of brain structural connectivity? An electron microscopy study of human white matter* [Zemmoura et al., 2015].

12. Effet de la congélation-décongélation sur l'histologie de la substance blanche

12.1. Méthode

Deux cerveaux ont été immergés dans une solution de formol (formaldéhyde à 37 % m/m, Cooper, Melun, France) diluée à 5 % dans de l'eau du robinet⁶, comme décrit par Klingler dans sa méthode princeps [Ludwig and Klingler, 1956]. Cette solution était renouvelée après 24 heures puis après deux semaines. Après une durée totale de fixation de trois mois, un de ces deux cerveaux a été lavé à l'eau courante puis égoutté et congelé à -23°C pendant trois semaines. Ce cerveau congelé a ensuite été lentement décongelé dans une nouvelle solution de formol à 5 %⁷ pendant 3 jours. L'autre spécimen n'a pas été congelé. Une section médiane, le long du corps calleux, a ensuite permis de séparer les hémisphères et d'exposer le corps calleux de chacun des spécimens. Des échantillons de corps calleux, dont l'orientation parallèle des fibres est bien connue, ont ensuite été réalisés pour l'étude histologique. Ces échantillons ont été traités de la manière suivante : inclusion en paraffine, coupes de 3 μm d'épaisseur longitudinalement et perpendiculairement à l'axe des fibres, coloration à l'hématoxyline éosine safran (HES), et observation au microscope optique à faible grossissement ($\times 10$).

12.2. Résultat

L'information fournie par la microscopie optique était limitée. Néanmoins, l'orientation globale des fibres apparaissait ainsi que la différence entre les échantillons congelés et ceux non congelés (Figure 40).

⁶ Comme décrit plus haut, il s'agit d'une dilution à 5 % d'une solution aqueuse de formol du commerce à 37 %, soit une solution dont la concentration finale en formaldéhyde était de 1,85 % (masse/volume).

⁷ Idem.

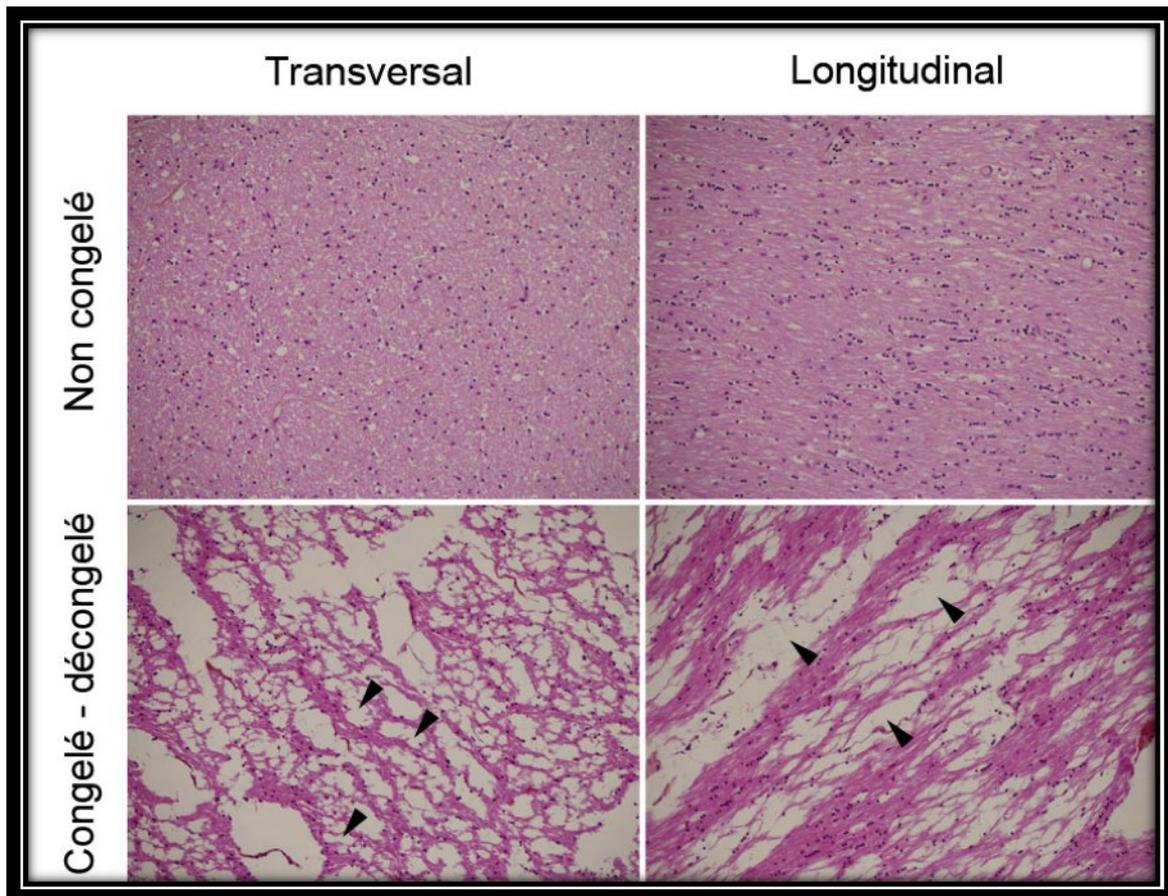


Figure 40. Microscopie optique à faible grossissement ($\times 10$) d'échantillons de cerveau humain fixés et colorés à l'hématoxyline éosine safran (HES). L'orientation globale des fibres, longitudinale ou transversale, est facilement individualisable. La différence entre prélèvements non congelés en haut et congelés-décongelés en bas est franche. Des cavités ou lacunes (têtes de flèches) apparaissent après congélation-décongélation.

La congélation-décongélation créait un élargissement des espaces entre les fibres qui donnait un aspect en nid-d'abeilles aux échantillons observés transversalement à l'axe des fibres, alors que l'orientation des fibres semblait conservée en coupe longitudinale. En revanche, la résolution limitée de la technique ne permettait pas d'identifier précisément si les lacunes préservaient les fibres. Par ailleurs, des interruptions de fibres étaient visibles sur les coupes longitudinales, sans qu'il soit possible de déterminer si ces interruptions étaient secondaires à la présence de lacunes (et donc à la congélation) ou à la réalisation des coupes histologiques.

13. Effet combiné de la congélation-décongélation et de la fixation sur l'ultrastructure de la substance blanche

13.1. Méthode

Deux méthodes de fixation ont été comparées en microscopie électronique (ME) sur un autre cerveau humain, de façon à apprécier si les éventuelles modifications d'intégrité de la structure cellulaire était une conséquence du fixateur ou du processus de congélation-décongélation.

Après extraction cérébrale sur cadavre frais et avant fixation, deux échantillons de 2 cm³ ont été prélevés par cingulum, soit 4 échantillons au total. Le cingulum a été choisi pour cette étude car il possède comme le corps calleux des fibres blanches dont l'orientation est facilement identifiable.

Un échantillon par hémisphère a été plongé dans une solution d'aldéhyde formique 4 % m/v tamponné à pH 6,9 (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France), les deux autres dans une solution de paraformaldéhyde/glutaraldéhyde (para/gluta), un fixateur couramment utilisé en ME (paraformaldéhyde 4 % et glutaraldéhyde 1 %, dans une solution tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2).

Seuls deux échantillons, un fixé au formol et un fixé au para/gluta, ont été congelés-décongelés. Tous les échantillons ont ensuite été préparés pour la ME en transmission (MET) comme suit. Les échantillons préalablement fixés étaient lavés dans une solution tampon-phosphate salin (PBS pour phosphate-buffered saline *en Angl.*), post-fixés au tetroxyde d'osmium à 2 % par incubation pendant 1 heure et déshydratés dans une série de bains d'éthanol en concentration croissante. Les échantillons étaient ensuite enrobés de résine Epon (Sigma), ce qui permettait une polymérisation pendant 48 h à 60°C. Ces blocs étaient ensuite coupés en section ultra-minces de 90 nm avec un ultramicrotome Leica EM UC7 (Wetzlar, Allemagne). Les coupes étaient déposées sur une grille en nickel recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone, et colorées dans un bain à l'acétate d'uranyle à 5 % et au citrate de

plomb à 5 %. Les observations ont enfin été réalisées avec un microscope électronique à transmission JEOL JEM-1011 avec une tension d'accélération de 120kV. Soixante-dix-neuf images ont été acquises en MET sur ces échantillons avec une caméra CCD GATAN ES1000W Erlangshen CCD.

13.1. Résultats

13.1.1. Effet de la fixation au formol sur l'ultrastructure de la substance blanche

Les fixations au formol et au para/gluta permettaient toutes deux une bonne préservation des composants cellulaires observées en MET, notamment les structures nucléaires gliales (Figure 41, têtes de flèches jaunes) malgré quelques différences d'aspect concernant la structure extra-axonale. En effet, l'euchromatine était mieux préservée après fixation au para/gluta, c'est-à-dire que l'euchromatine apparaissait plus osmiophile (mieux contrastée) que sur les prélèvements fixés au formol.

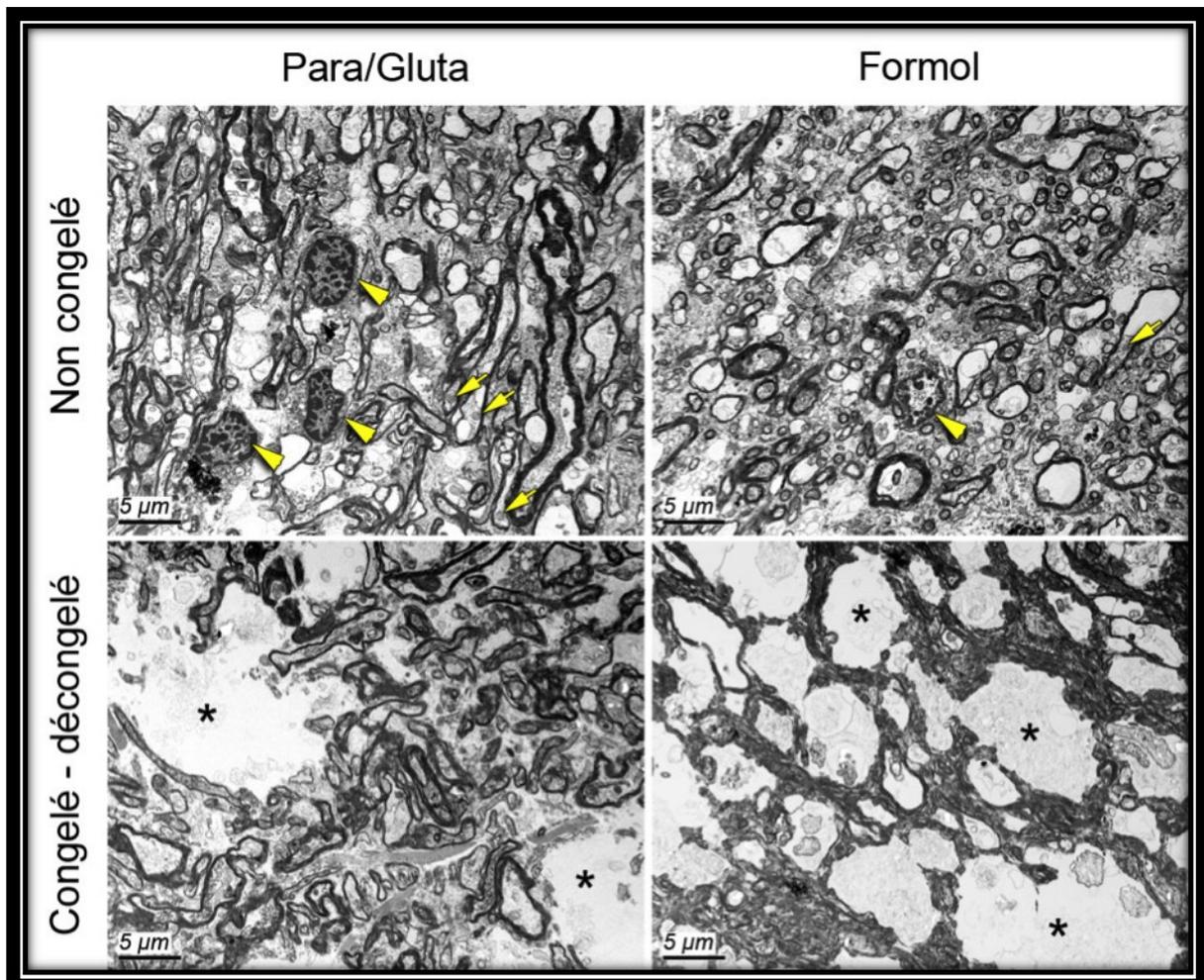


Figure 41. Microscopie électronique en transmission de prélèvements de cingulum. L'ultrastructure de la substance blanche était bien préservée après les deux protocoles de fixation : au para/gluta et au formol. La chromatine nucléaire des cellules gliales (têtes de flèches jaunes) et des mitochondries (flèches jaunes) étaient identifiables sur les échantillons non congelés. L'euchromatine apparaissait plus sombre, c'est-à-dire plus osmiophile, sur les échantillons fixés au para/gluta que sur ceux fixés au formol. La différence entre les deux fixateurs était plus importante sur les échantillons congelés-décongelés : les lacunes extra-cellulaires (astérisques) étaient plus nombreuses sur les échantillons fixés au formol. Grossissement = $\times 4000$. Barres = $5 \mu\text{m}$.

Au contraire, les gaines de myéline et les structures intra-axonales étaient bien préservées, quel que soit le mode de fixation. Sur les échantillons non congelés, de nombreux axones myélinisés de différents diamètres étaient observés. Néanmoins, la compacité des gaines de myéline variait d'un axone à l'autre, indépendamment du diamètre axonal ou de l'épaisseur de la gaine de myéline. Les images à très fort grossissement ont identifié des axones myélinisés ayant conservé leurs organelles intracellulaires tels que les microtubules, neurofilaments et quelques mitochondries (Figure 42).

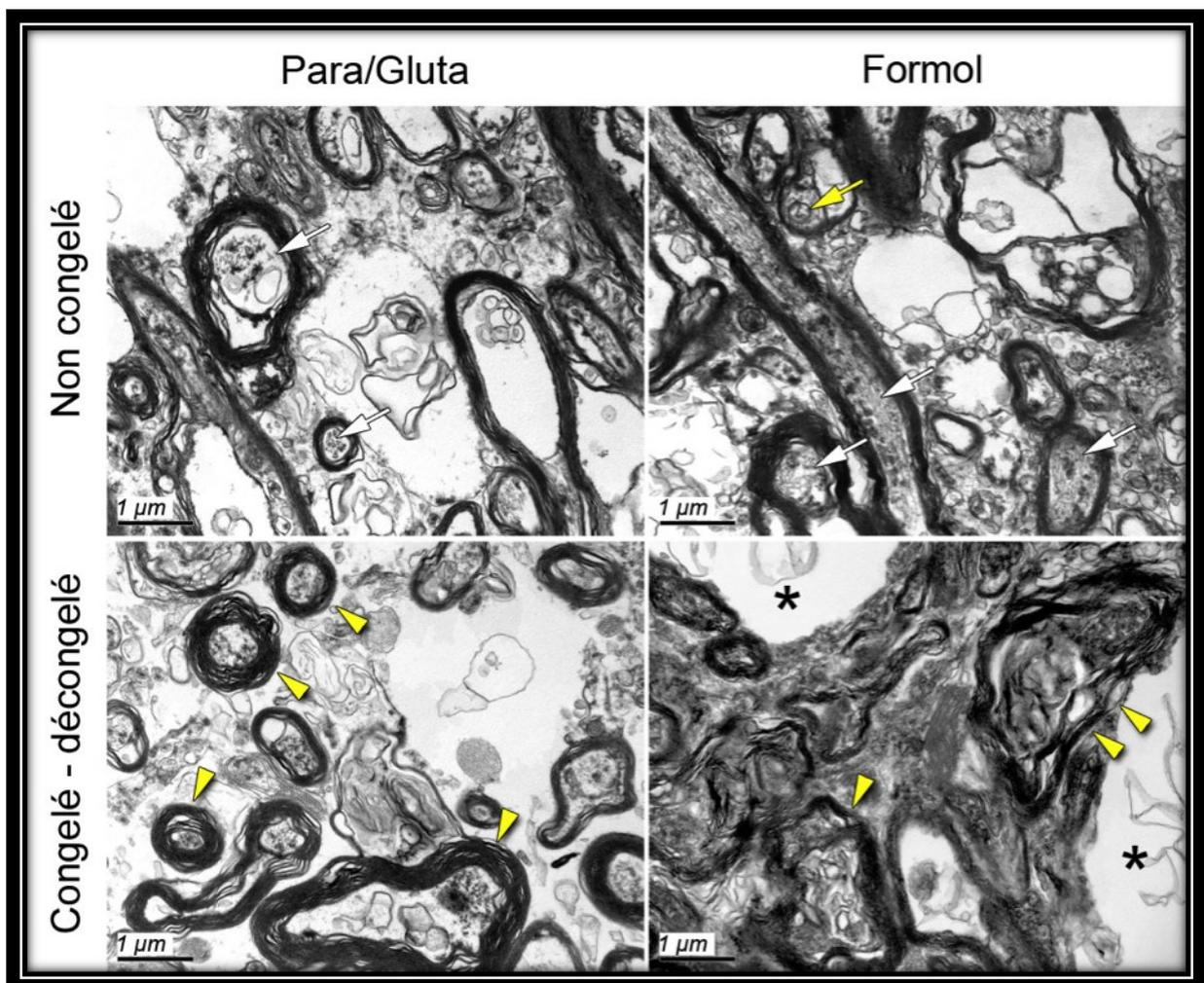


Figure 42. Microscopie électronique en transmission à très fort grossissement d'échantillons de cingulum humain. Les composants cellulaires étaient relativement bien préservés après fixation au

para/gluta et au formol. Les neurofilaments et microtubules intra-axonaux (flèches blanches), et les mitochondries (flèches jaunes) étaient identifiables. Après congélation-décongélation, les lacunes extra-cellulaires provoquaient une plus grande compaction de la matrice extra-cellulaire sur les échantillons fixés au formol que sur ceux fixés au para/gluta. La myéline apparaissait moins compacte (têtes de flèches jaunes) sur les prélèvements fixés au formol congelés-décongelés, bien qu'elles conservaieent leur rôle d'engainement des fibres axonales et n'étaient pas rompues par les lacunes (astérisques). Grossissement = $\times 25000$. Barres = 1 μm .

13.1.2. Effet de la congélation-décongélation : altération des espaces extra-axonaux mais préservation des gaines de myéline

La MET a également montré l'apparition de lacunes extra-axonales après congélation-décongélation. Ces lacunes étaient plus larges sur les échantillons fixés au formol que sur ceux fixés au para/gluta (Figure 41, ligne du bas). Bien que les altérations membranaires rendaient difficile la localisation exacte des lacunes, il était tout de même possible d'observer qu'elles se trouvaient entre les axones myélinisés et qu'elles respectaient l'orientation des fibres (Figure 41).

Après congélation-décongélation, les gaines de myéline étaient moins compactes. Le degré d'espacement et de déformation des couches de myéline était très variable. Ces modifications étaient plus prononcées sur les prélèvements fixés au formol (Figure 42). De même, sur les prélèvements fixés au formol, les lacunes étaient plus larges et, la compaction des espaces extra-axonaux plus prononcée, ce qui se manifestait en MET par des structures plus sombres (plus osmiophiles) entre les lacunes. Néanmoins, les gaines de myéline étaient en partie préservées malgré la congélation-décongélation puisqu'elles n'étaient pas interrompues par ces lacunes (Figure 42).

14. Effets de la dissection sur l'ultrastructure des fibres blanches

14.1. Méthode

Trois cerveaux humains ont été utilisés pour cette étude. Après fixation par immersion pendant 3 mois dans une solution d'aldéhyde formique 4 % m/v tamponné à pH 6,9 (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France), les cerveaux ont été sectionnés sur la ligne médiane. Un seul hémisphère de chaque cerveau a été congelé pendant 3 semaines à -23°C , puis décongelé pendant 5 jours dans une nouvelle solution de formol tamponné à 4 %. Pour limiter l'influence de la localisation anatomique sur les différences d'observation, un échantillon de 3 cm de la portion antérieure du corps du corps calleux, immédiatement postérieur à son genou, a été prélevé sur chacun des 6 hémisphères.

Ces échantillons ont ensuite été "disséqués" avec les instruments en bois utilisés pour les dissections de Klingler pour soulever de fins paquets de fibres. Ainsi, les fibres et leur orientation étaient directement visibles à la face supérieure de chacun des échantillons (Figure 43).

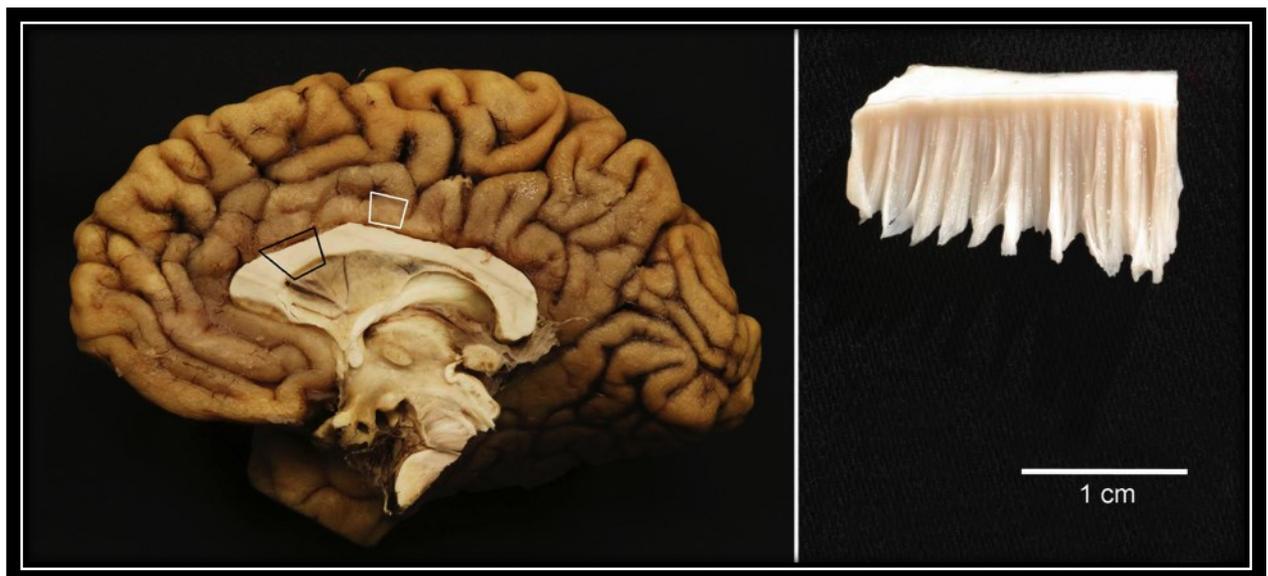


Figure 43. Localisation des échantillons réalisés pour les observations en microscopie électronique. À gauche : les échantillons ont intéressé, sur certains spécimens, la portion antérieure du corps du corps calleux (losange noir), et sur d'autres (pour les observations en microscopie électronique en transmission), le cingulum (parallélogramme blanc). À droite : échantillon de corps calleux "disséqué"

avant microscopie électronique à balayage. L'orientation des fibres y est très aisément reconnaissable macroscopiquement.

Une petite portion de chacun des échantillons disséqués a ensuite été préparée pour la ME à balayage (MEB) comme suit. Les échantillons étaient lavés au PBS, post-fixés au tétroxyde d'osmium à 2 % par incubation pendant 1 heure, puis déshydratés dans une série de bains d'éthanol en concentration croissante et séchés dans du hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma, St-Louis, MO, USA). Les échantillons ainsi séchés étaient ensuite collés sur les supports de MEB à l'aide d'un ciment carbone conducteur et recouverts d'une couche de platine de 40-50 Å, avec une système de pulvérisation JEOL JUC-5000. Les observations ont été réalisées sur un microscope électronique à balayage à effet de champ ZEISS Ultra plus. Cent-soixante-huit images ont été acquises, en vues transversales et longitudinales.

14.2. Résultat : la dissection de Klingler préserve la structure axonale

Sur les échantillons non congelés, les fibres étaient extrêmement compactes et entremêlées. Des structures arrondies et d'autres, linéaires orientées transversalement à l'axe des axones, étaient visualisées (Figure 44).

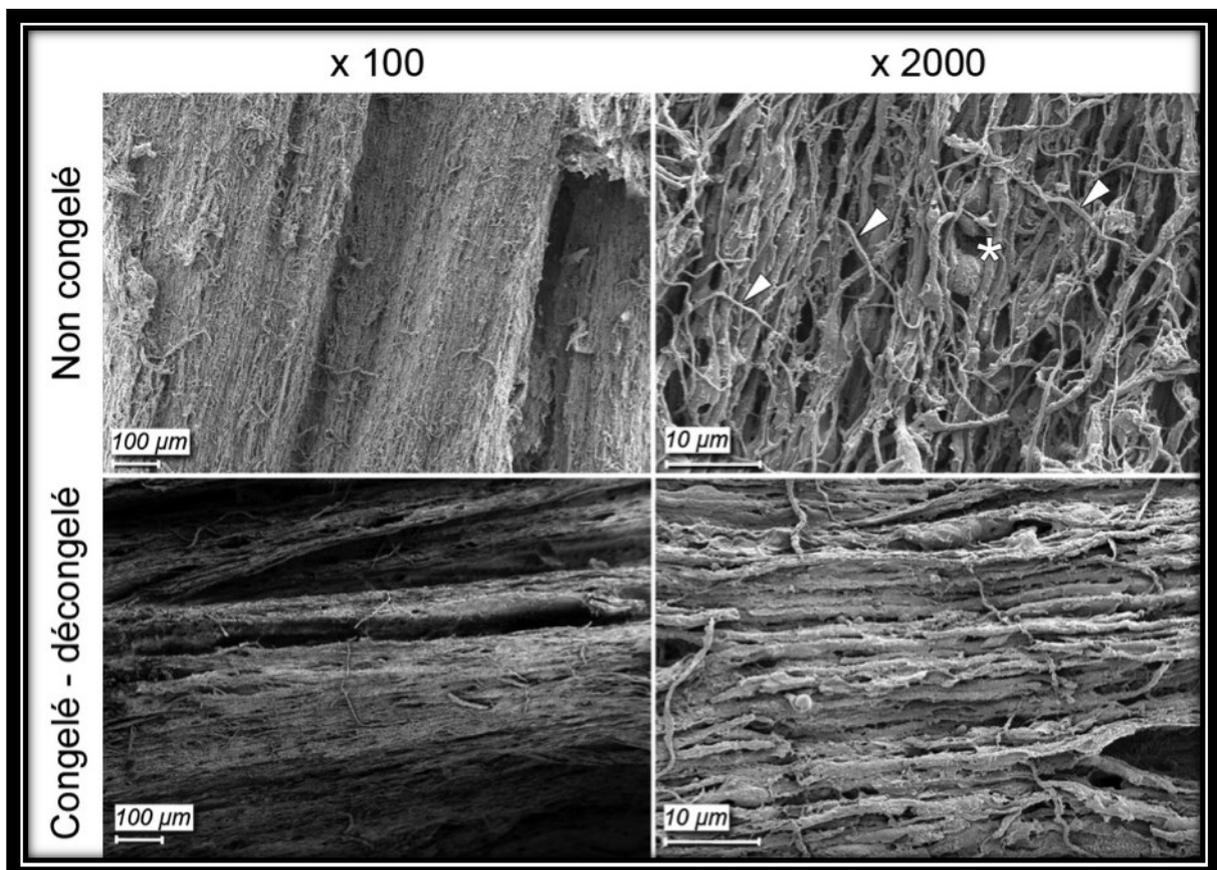


Figure 44. Microscopie électronique à balayage d'échantillons de corps calleux fixés au formol. Vues longitudinales de la surface d'échantillons "disséqués", avant et après congélation-décongélation, à faible grossissement $\times 100$ (à gauche) et à fort grossissement $\times 2000$ (à droite). La dissection a créé des sillons et des crêtes. Sur l'échantillon non congelé, des processus gliaux orientés transversalement aux axones (têtes de flèches) et des corps cellulaires gliaux (astérisque) étaient facilement visualisables. Ces structures disparaissaient quasiment sur les échantillons congelés-décongelés. Barre de la colonne de gauche = $100\ \mu\text{m}$. Barre de la colonne de droite = $10\ \mu\text{m}$.

La congélation-décongélation créait des lacunes séparant les fibres du corps calleux en paquets d'axones, identifiables sur les vues longitudinales (Figure 44) et transversales (Figure 45). Sur les vues longitudinales, des sillons et crêtes étaient créés par le soulèvement de fins paquets de fibres lors de la dissection de Klingler. Les structures observées en MEB, c'est-à-dire les fibres laissées en place *après* dissection, étaient globalement préservées (Figure 44), alors que les corps cellulaires gliaux et les structures transversales aux axones n'étaient plus identifiables sur les échantillons congelés-décongelés.

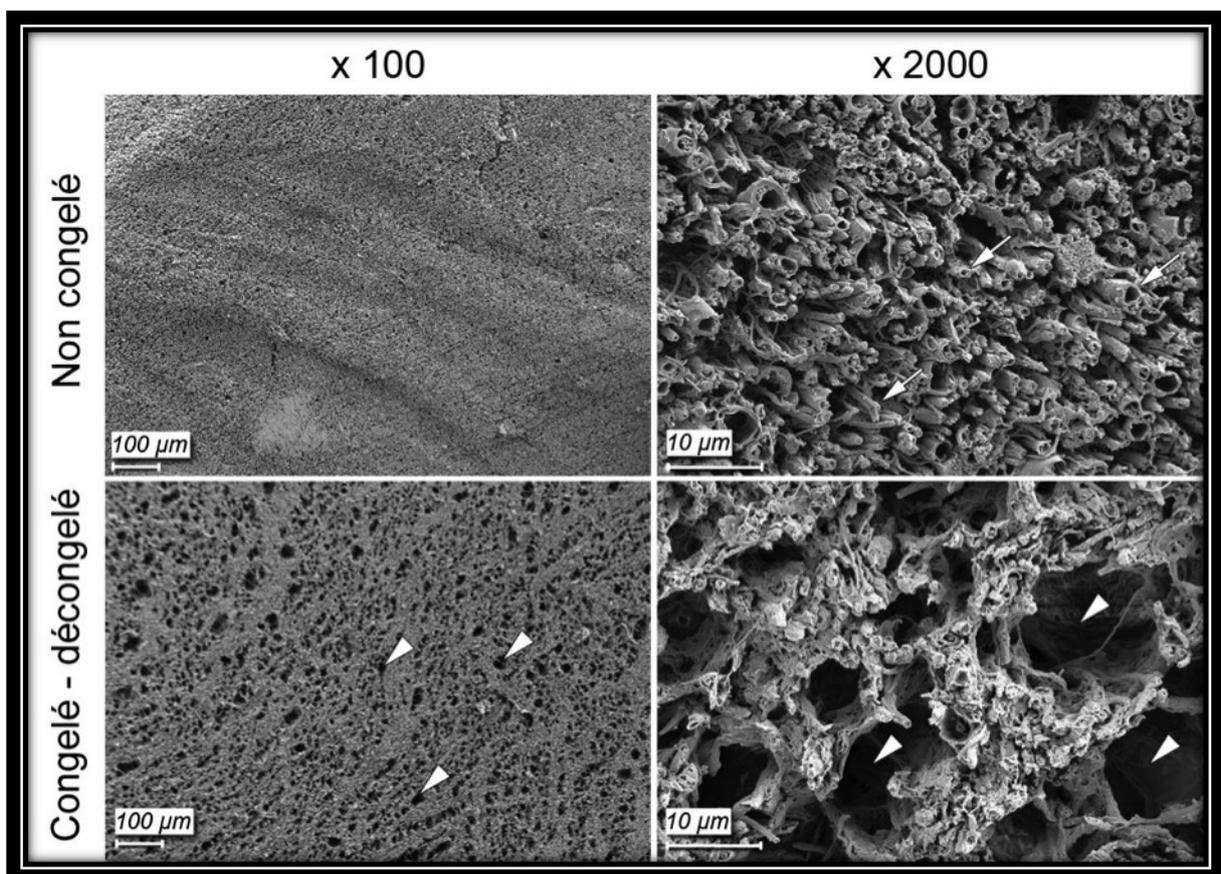


Figure 45. Microscopie électronique à balayage d'échantillons de corps calleux fixés au formol. Vues transversales, avant et après congélation-décongélation, à grossissement $\times 100$ (à gauche) et $\times 2000$ (à droite). Avant congélation, des axones myélinisés de différents calibres étaient observés (flèches). Après congélation-décongélation, on observait des lacunes (têtes de flèches) entre les axones. Barre de la colonne de gauche = $100\ \mu\text{m}$. Barre de la colonne de droite = $10\ \mu\text{m}$.

15. Discussion

15.1. De nouvelles preuves sur les effets de la préparation et de la dissection de Klingler sur la substance blanche

Ici, nous présentons la première étude explorant l'impact de la méthode de Klingler sur la matière blanche humaine en utilisant la microscopie optique et électronique. Nous avons délibérément choisi de limiter cette étude à deux faisceaux facilement identifiables (corps calleux et cingulum) composés de fibres parallèles de direction bien connue. Il serait bien sûr plus difficile de suivre les changements liés à la préparation d'échantillons prélevés sur des faisceaux moins bien organisés ou orientés. Nous avons constaté que l'ultrastructure extracellulaire des fibres du corps calleux et du cingulum était modifiée après fixation au formol, et que ces modifications étaient considérablement majorées après congélation-décongélation. Cette étape de la préparation des échantillons, caractéristique de la méthode de Klingler, crée en effet des lacunes interaxonales qui peuvent faciliter la dissection des faisceaux de fibres tout en préservant leur orientation.

Un deuxième facteur pouvant aider à la dissection est la préservation relative des gaines de myéline lors de la préparation de Klingler. Bien que ces gaines soient moins compactes après congélation-décongélation, elles restent néanmoins facilement identifiables en utilisant les deux techniques de MEB et MET. Du fait de leur situation autour des axones, elles peuvent agir comme «guides» lors de la dissection de fibres. En effet, même s'il a été montré que les neurones et les cellules gliales sont des structures peu rigides [Lu et al., 2006], des travaux antérieurs ont montré que la démyélinisation réduit considérablement la rigidité axonale et sa résistance à la cassure [Shreiber et al., 2008]. Il est alors probable que gaines de myéline protègent mécaniquement les axones non seulement pendant la préparation mais aussi pendant la dissection de Klingler.

La dissection est également aidée par la destruction des structures arrondies et des structures fibreuses orientées transversalement aux axones, qui étaient visibles seulement sur les échantillons non congelés. Ces éléments, qui semblaient connecter les axones adjacents, pouvaient correspondre respectivement aux corps cellulaires et aux prolongements de la macroglie (astrocytes et des oligodendrocytes fibreux) ou de la microglie. Quelle que soit leur

origine, ces processus transversaux agissaient comme des ponts entre les gaines de myéline, et leur destruction pouvait faciliter la dissection. Enfin, après avoir «disséqué» et enlevé les fibres superficielles des échantillons préalablement congelés-décongelés, la MEB nous a permis également de démontrer que les fibres laissées en place conservaient leur organisation parallèle naturelle.

En d'autres termes, l'effet facilitant bien connu de la congélation-décongélation sur la dissection peut être considéré comme la conséquence :

- des deux changements induits par la préparation de Klingler : création de lacunes inter-axonales et destruction des ponts inter-myéliniques ;
- et de la préservation des axones grâce au rôle protecteur des gaines de myéline.

La préparation de Klingler conserve ainsi la direction des fibres, ce qui explique que la dissection de Klingler permet le soulèvement de fibres le long de leur direction principale. Si, par exemple, les fibres avaient été détruites par la préparation de Klingler, il aurait été possible de créer artificiellement, lors de la dissection, des faisceaux de fibres n'existant pas en réalité (faux positifs). Heureusement, la myéline, qui engaine les axones et est connue pour assurer l'intégrité à long terme des axones *in vivo* [Nave, 2010], reste bien organisée après la fixation, la congélation et la décongélation, et préserve ainsi l'intégrité des fibres lors de la préparation et la dissection du cerveau humain.

15.2. La spécificité du processus de congélation de Klingler

Il pourrait sembler surprenant d'obtenir des modifications de microstructure après congélation selon Klingler, alors que de nombreuses études de ME utilisent une étape de congélation avant de réaliser les coupes au microtome. Par exemple, Liu et Schumann [2014] ont démontré que, bien que la densité axonale puisse varier d'un sujet à l'autre (entre 0,14-0,19 axones / μm^2 pour la substance blanche du gyrus temporal supérieur), l'ultrastructure axonale

"est préservée à travers le processus de congélation (...) et n'a pas d'impact sur les mesures de densité des axones myélinisés".

Néanmoins, il est important ici de souligner que ces auteurs ont utilisé des coupes de cerveau humain surgelées (et non congelées). La surgélation est une technique de refroidissement brutal connue pour préserver l'ultrastructure des tissus biologiques [Rosene et

al., 1986] en permettant à l'eau de cristalliser très finement. À l'inverse, la congélation lente, telle que pratiquée au cours de la préparation de Klingler, crée de volumineux cristaux de glace. Cela explique pourquoi la ME du tissu cérébral lentement congelé, c'est-à-dire volontairement modifié par des cristaux de glace, n'a jamais été utilisée dans les études microscopiques, qui visaient à l'inverse à obtenir la substance blanche la mieux préservée possible.

15.3. La microscopie électronique, une méthode sous-utilisée pour explorer la matière blanche ultrastructure

Étonnamment, la ME n'a pas été largement utilisée pour explorer la substance blanche cérébrale humaine. En effet, depuis l'étude d'Aboitiz et al. [1992], qui décrit la composition des fibres du corps calleux humain en utilisant microscopie optique et ME, les quelques études qui ont utilisé la ME sur la substance blanche cérébrale ont essentiellement exploré la mesure du diamètre axonal [Liewald et al., 2014; Liu and Schumann, 2014; Zikopoulos and Barbas, 2010] afin de comparer leurs résultats à ceux fournis par l'IRM de diffusion [Alexander et al., 2010; Assaf et al., 2008; Barazany et al., 2009]. Un autre point intéressant est la pauvreté des connaissances sur l'impact de la fixation des échantillons sur la structure de la substance blanche cérébrale observée en ME. En effet, il existe des arguments pour penser que l'espace extracellulaire d'un cerveau fixé, c'est-à-dire tel qu'il est traité pour être observé en ME, n'est pas aussi grand qu'*in vivo* [Cragg, 1979]. En fait, on sait très peu sur l'influence de fixation sur l'ultrastructure de la matière blanche du cerveau, étant donné que la ME ne peut évidemment pas être effectuée sans fixation préalable. Ce possible effet de la fixation sur la taille des structures biologiques doit évidemment être pris en compte, notamment dans les études mesurant les diamètres axonaux en ME pour la validation des techniques IRM étudiant la microstructure de la substance blanche.

Pour étudier l'influence du protocole de fixation sur l'ultrastructure de la substance blanche, nous avons comparé les effets de la fixation au formol avec ceux de la fixation au para/gluta. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux méthodes, mais après congélation-décongélation, les altérations ultrastructurales étaient plus prononcées après fixation au formol qu'au para/gluta. Ce résultat pourrait s'expliquer par les effets connus du glutaraldéhyde, un fixateur largement utilisé en ME contenant plus de groupes aldéhydes que le formaldéhyde, et ayant ainsi un plus grand potentiel pour la fixation que le formaldéhyde [Kiernan, 2000]. Néanmoins, le glutaraldéhyde présente l'inconvénient majeur de pénétrer les

tissus moins profondément que le formaldéhyde, ce qui limite son utilisation à de petits échantillons. Comme notre étude n'a pas porté sur la caractérisation de l'ultrastructure de la substance blanche ni sur la mesure du diamètre axonal, nous avons analysé principalement si les axones et gaines de myéline étaient conservés, ce qui est finalement le principal facteur qui pourrait produire des erreurs d'interprétation lors de la dissection de fibres.

Enfin, à notre connaissance, aucune étude n'avait fourni d'images de fibres de substance blanche humaine en MEB. Les images MEB que nous présentons ici constituent donc une occasion unique d'observer l'organisation des axones et leurs cellules environnantes au sein d'un faisceau de fibres selon une modalité originale.

Pris dans leur ensemble, nos résultats fournissent de solides arguments pour confirmer que la dissection de fibres, en utilisant la préparation de Klingler, est une méthode utile pour explorer la connectivité structurelle des faisceaux d'association du cerveau humain.

Conclusion

La préparation des spécimens anatomiques joue un rôle crucial dans l'identification des faisceaux de substance blanche lors de la dissection. La méthode de Klingler [Klingler and Gloor, 1960; Ludwig and Klingler, 1956] a été largement adoptée par les anatomistes qui étudient la structure de faisceaux de fibres, même si aucune étude ultrastructurale n'avait jamais démontré l'effet de cette préparation sur la structure de la substance blanche. Ainsi, nos résultats sont les premiers à démontrer les effets de cette méthode, qui préserve les gaines de myéline - et donc la structure axonale - tout en modifiant la matrice extracellulaire. Des lacunes apparaissent dans cette dernière lors de la congélation, détruisant les cellules gliales et facilitant ainsi la séparation des fibres lors de la dissection, qui ne détruit pas les axones. Cette observation explique pourquoi la dissection de fibres par la méthode de Klingler est possible, et aussi pourquoi les croisements de fibres sont problématiques : l'opérateur doit "couper" les fibres qui "croisent" afin de continuer à suivre les voies d'intérêt.

Comme nous l'avons spécifié dans les parties précédentes, la tractographie de diffusion IRM n'est pas une technique anatomique puisqu'elle fournit uniquement des informations indirectes basées sur l'orientation préférentielle de la diffusion des molécules d'eau le long des axones. Comme les résultats de la tractographie de diffusion peuvent varier considérablement selon les paramètres d'acquisition et de post-traitement [Jones et al., 2013; Jones and Cercignani, 2010; Thomas et al., 2014], ils doivent être validés contre une vérité terrain anatomique.

La dissection de Klingler apparaît parfois comme une technique historique et peu fiable dans la communauté Neuroscientifique. Plusieurs limites concernant son utilisation comme outil de validation de la tractographie ont été soulevées et décrites dans la partie précédente. Malgré ces limites, la dissection est aujourd'hui la seule méthode de validation qui peut être utilisée chez l'Homme tout en préservant la cohérence 3D de faisceaux de fibres, et en visualisant directement la connectome humain à la même échelle que la tractographie de diffusion. Une critique supplémentaire - et majeure - de la méthode de Klingler est qu'aucune démonstration claire de la façon dont elle agit pour aider la dissection n'avait été donnée ; il était généralement admis dans la communauté Anatomique et Neurochirurgicale (les deux

communautés étant proches car les compétences nécessaires à la dissection cérébrale sont indissociables des compétences neurochirurgicales) que la congélation-décongélation formait des cristaux de glace, censés aider la dissection par "dilacération" des faisceaux de fibres à l'échelle microscopique [Ludwig and Klingler, 1956]. Ce mécanisme restait pourtant jusqu'alors non prouvé. Les modifications structurelles que nous avons observées au sein de la substance blanche après congélation-décongélation - apparition de lacunes inter-axonales, disparition de ponts inter-fibres et préservation des gaines de myéline - peuvent expliquer comment ce processus facilite la dissection. Il faut toutefois reconnaître que nous n'avons pas directement visualisé les cristaux de glace qui sont probablement à l'origine des lacunes apparaissant entre les paquets de fibres, mais il est fort probable que ces lacunes soient le résultat de ces cristaux, comme l'avait pressenti Klingler lors de la description de sa méthode

Enfin, à la lumière de nos constatations, nous allons poursuivre nos travaux en ME en explorant la structure des fibres dans les régions de croisement et les terminaisons corticales en utilisant notre méthode FIBRASCAN [Zemmoura et al., 2014] afin de localiser l'échantillon étudié dans l'IRM du spécimen. Nous prévoyons également de tester d'autres agents fixateurs qui pourraient éventuellement améliorer l'efficacité de la dissection de Klingler.

Conclusion générale

Sur la base de nos résultats, il est possible de considérer la dissection de fibres selon la méthode de Klingler comme un outil fiable pour l'exploration de l'organisation morphologique des faisceaux longs intracérébraux. En effet, nous avons montré que la préparation de cerveaux humains par fixation au formol et congélation-décongélation induisait des lacunes séparant les fibres en fins paquets et favorisait ainsi la dissection. Nous avons également pu constater en microscopie électronique que les gaines de myéline jouaient un rôle primordial dans la préservation de la structure des fibres axonales lors de la préparation de Klingler, mais aussi lors de la dissection elle-même.

La méthode de Klingler permettant une exploration fiable de l'anatomie des faisceaux intracérébraux, il restait nécessaire, avant de l'utiliser pour valider la tractographie cérébrale de diffusion IRM, de permettre la comparaison entre ces deux techniques. Cette problématique de la transposition des résultats de la dissection dans le référentiel de l'IRM a été en partie résolue par le développement de notre méthode, FIBRASCAN. À partir d'acquisitions itératives de la surface du cerveau en cours de dissection, FIBRASCAN permet la reconstruction tridimensionnelle des faisceaux de fibres disséqués et le recalage vers l'IRM. Nous avons montré que notre méthode est faisable en reconstruisant plusieurs faisceaux d'association (les différents segments du faisceau arqué, le faisceau occipito-frontal inférieur, le faisceau unciné, le faisceau longitudinal inférieur) sur un même hémisphère. Nous avons également montré que notre méthode est suffisamment robuste (avec une précision globale de l'ordre du millimètre) pour une comparaison à la tractographie cérébrale (dont les modalités d'acquisition en condition clinique conduisent à une précision avoisinant également le millimètre, voire même plus fréquemment les 2 mm).

Deux autres pas restent à franchir pour permettre cette validation : développer un outil de comparaison quantitative entre données de dissections portées dans l'IRM et données de tractographie, et développer une méthode de recalage *in vivo* – *in vitro*. Ces deux points font partie intégrante des développements méthodologiques compris dans un vaste projet soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche, FIBRATLAS (cf. Annexe), porté par notre équipe en partenariat avec plusieurs laboratoires d'Anatomie en France, avec Neurospin (Commissariat à l'Énergie Atomique, Saclay, France) et avec le Martinos Center for Biomedical Imaging (Massachusetts General Hospital, Boston, USA). Ce projet est une étude longitudinale portant sur une cohorte de sujets volontaires sains âgés ayant fait don de leur corps à la Science et qui bénéficieront de leur vivant d'une IRM de diffusion, puis, après leur décès, de deux IRM *post mortem* de diffusion sur l'IRM du Connectome project (Siemens 3T, 300

mT/m) du Martinos Center, et sur l'IRM 7T de Neurospin (Siemens, 80 mT/m), et enfin de la dissection selon notre méthode FIBRASCAN.

Les données issues de ce projet seront ensuite diffusées à la communauté scientifique pour être utilisés en tant que vérité terrain pour la validation et le développement de la tractographie cérébrale. Avec ce projet, et conjointement aux autres méthodes existantes et en développement, nous espérons ainsi, participer à la validation et l'amélioration de la tractographie cérébrale en IRM de diffusion. Nous considérons cette dernière comme un outil formidable mais dont l'usage actuel souffre de ce manque de validation. En effet, la trop grande variabilité de ses résultats en limite l'usage au domaine de la recherche alors qu'elle est une opportunité unique d'explorer la structure des faisceaux *in vivo* et donc potentiellement un outil diagnostique majeur qui a vocation à devenir un outil de routine clinique si sa fiabilité peut être quantifiée.

Bibliographie

- Aboitiz F, Scheibel AB, Fisher RS, Zaidel E (1992): Fiber composition of the human corpus callosum. *Brain Res* 598:143–53.
- Alexander DC, Hubbard PL, Hall MG, Moore EA, Ptito M, Parker GJM, Dyrby TB (2010): Orientationally invariant indices of axon diameter and density from diffusion MRI. *NeuroImage* 52:1374–1389.
- Assaf Y, Blumenfeld-Katzir T, Yovel Y, Basser PJ (2008): AxCaliber: a method for measuring axon diameter distribution from diffusion MRI. *Magn Reson Med Off J Soc Magn Reson Med Soc Magn Reson Med* 59:1347–1354.
- Audoin B, Guye M, Reuter F, Au Duong MV, Confort-Gouny S, Malikova I, Soulier E, Viout P, Cherif AA, Cozzzone PJ, Pelletier J, Ranjeva JP (2007): Structure of WM bundles constituting the working memory system in early multiple sclerosis: a quantitative DTI tractography study. *Neuroimage* 36:1324–30.
- Axer M, Amunts K, Grassel D, Palm C, Dammers J, Axer H, Pietrzyk U, Zilles K (2011): A novel approach to the human connectome: ultra-high resolution mapping of fiber tracts in the brain. *Neuroimage* 54:1091–101.
- Barazany D, Basser PJ, Assaf Y (2009): In vivo measurement of axon diameter distribution in the corpus callosum of rat brain. *Brain J Neurol* 132:1210–1220.
- Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D (1994): MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J* 66:259–67.
- Beaulieu C (2002): The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR Biomed* 15:435–55.
- De Benedictis A, Moritz-Gasser S, Duffau H (2010): Awake Mapping Optimizes the Extent of Resection for Low-Grade Gliomas in Eloquent Areas: *Neurosurgery* 66:1074–1084.
- Besl PJ, McKay ND (1992): A method for registration of 3-D shapes. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 14:239–256.
- Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Grenier P, Cabanis E, Laval-Jeantet M (1986): MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology* 161:401–7.
- Le Bihan D, Turner R, Douek P (1993): Is water diffusion restricted in human brain white

- matter? An echo-planar NMR imaging study. *Neuroreport* 4:887–890.
- Boujraf S, Luypaert R, Eisendrath H, Osteaux M (2001): Echo planar magnetic resonance imaging of anisotropic diffusion in asparagus stems. *Magma N Y N* 13:82–90.
- Broca P (1861a): Perte de la parole, ramollissement chronique et destruction partielle du lobe antérieur gauche du cerveau. *Bull Société Anthropol* 2:235–238.
- Broca P (1861b): Remarques sur le siège de la faculté du langage articulé, suivies d’une observation d’aphémie (perte de la parole). *Bull Société Anat Paris* 6:330–57.
- Burgel U, Amunts K, Hoemke L, Mohlberg H, Gilsbach JM, Zilles K (2006): White matter fiber tracts of the human brain: three-dimensional mapping at microscopic resolution, topography and intersubject variability. *Neuroimage* 29:1092–105.
- Campbell JSW, Siddiqi K, Rymar VV, Sadikot AF, Pike GB (2005): Flow-based fiber tracking with diffusion tensor and q-ball data: Validation and comparison to principal diffusion direction techniques. *NeuroImage* 27:725–736.
- Catani M, Thiebaut de Schotten M (2008): A diffusion tensor imaging tractography atlas for virtual in vivo dissections. *Cortex* 44:1105–32.
- Chan-Seng E, Moritz-Gasser S, Duffau H (2014): Awake mapping for low-grade gliomas involving the left sagittal stratum: anatomofunctional and surgical considerations. *J Neurosurg*.
- Cottier J-P, Barantin L, Destrieux C, Wang R, Domengie F, Herbreteau D, Halgren E (2005): Imagerie cérébrale en tenseur de diffusion et tractographie de la substance blanche : principes et limites actuelles. *Feuill Radiol* 45:191–199.
- Cowan WM, Gottlieb DI, Hendrickson AE, Price JL, Woolsey TA (1972): The autoradiographic demonstration of axonal connections in the central nervous system. *Brain Res* 37:21–51.
- Cragg B (1979): Brain extracellular space fixed for electron microscopy. *Neurosci Lett* 15:301–306.
- Dammers J, Axer M, Grassel D, Palm C, Zilles K, Amunts K, Pietrzyk U (2010): Signal enhancement in polarized light imaging by means of independent component analysis. *Neuroimage* 49:1241–8.
- D’Arceuil H, de Crespigny A (2007): The effects of brain tissue decomposition on diffusion tensor imaging and tractography. *Neuroimage* 36:64–8.

- D'Arceuil HE, Westmoreland S, de Crespigny AJ (2007): An approach to high resolution diffusion tensor imaging in fixed primate brain. *Neuroimage* 35:553–65.
- Dauguet J, Peled S, Berezovskii V, Delzescaux T, Warfield SK, Born R, Westin CF (2007): Comparison of fiber tracts derived from in-vivo DTI tractography with 3D histological neural tract tracer reconstruction on a macaque brain. *Neuroimage* 37:530–8.
- Dejerine JJ (1892): Contribution à l'étude anatomo-pathologique et clinique des différentes variétés de cécité verbale.
- Dejerine JJ, Dejerine-Klumpke A (1895): Anatomie des centres nerveux. Paris,: Rueff.
- Descoteaux M (2010): High Angular Resolution Diffusion MRI: from Local Estimation to Segmentation and Tractography. Doctor of science; Université de Nice-Sophia Antipolis.
- Dice L (1945): Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297–302.
- Duffau H The necessity of preserving brain functions in glioma surgery: the crucial role of intraoperative awake mapping. *World Neurosurg* 76:525–7.
- Duffau H, Taillandier L (2014): New concepts in the management of diffuse low-grade glioma: Proposal of a multistage and individualized therapeutic approach. *Neuro-Oncol*.
- Dyrby TB, Sogaard LV, Parker GJ, Alexander DC, Lind NM, Baare WF, Hay-Schmidt A, Eriksen N, Pakkenberg B, Paulson OB, Jelsing J (2007): Validation of in vitro probabilistic tractography. *Neuroimage* 37:1267–77.
- Ebeling U, von Cramon D (1992): Topography of the uncinate fascicle and adjacent temporal fiber tracts. *Acta Neurochir (Wien)* 115:143–148.
- Ebeling U, Reulen H-J (1988): Neurosurgical topography of the optic radiation in the temporal lobe. *Acta Neurochir (Wien)* 92:29–36.
- Epelbaum S, Pinel P, Gaillard R, Delmaire C, Perrin M, Dupont S, Dehaene S, Cohen L (2008): Pure alexia as a disconnection syndrome: new diffusion imaging evidence for an old concept. *Cortex* 44:962–74.
- Fernandez-Miranda JC, Rhoton AL Jr, Alvarez-Linera J, Kakizawa Y, Choi C, de Oliveira EP (2008): Three-dimensional microsurgical and tractographic anatomy of the white matter of the human brain. *Neurosurgery* 62:989–1026; discussion 1026–8.

- Fieremans E, De Deene Y, Delputte S, Ozdemir MS, Achten E, Lemahieu I (2008a): The design of anisotropic diffusion phantoms for the validation of diffusion weighted magnetic resonance imaging. *Phys Med Biol* 53:5405–5419.
- Fieremans E, De Deene Y, Delputte S, Özdemir MS, D’Asseler Y, Vlassenbroeck J, Deblaere K, Achten E, Lemahieu I (2008b): Simulation and experimental verification of the diffusion in an anisotropic fiber phantom. *J Magn Reson* 190:189–199.
- Gall FJ, Spurzheim JG (1810): Anatomie et physiologie du système nerveux en général et du cerveau en particulier. Tome 1 / , avec des observations sur la possibilité de reconnaître plusieurs dispositions intellectuelles et morales de l’homme et des animaux par la configuration de leurs têtes, par J. F. Gall et G. Spurzheim,... F. Schoell (Paris). <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k767165>.
- Geschwind N (1965a): Disconnexion syndromes in animals and man. *Brain* 88:585–585.
- Geschwind N (1965b): Disconnexion syndromes in animals and man. *Brain* 88:237–237.
- Harper CG, Gonatas JO, Stieber A, Gonatas NK (1980): In vivo uptake of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase conjugates into neuronal gerl and lysosomes. *Brain Res* 188:465–472.
- Helenius J, Soinne L, Perkio J, Salonen O, Kangasmaki A, Kaste M, Carano RA, Aronen HJ, Tatlisumak T (2002): Diffusion-weighted MR imaging in normal human brains in various age groups. *AJNR Am J Neuroradiol* 23:194–9.
- Herbet G, Lafargue G, Bonnetblanc F, Moritz-Gasser S, Menjot de Champfleury N, Duffau H (2014a): Inferring a dual-stream model of mentalizing from associative white matter fibres disconnection. *Brain* 137:944–959.
- Herbet G, Lafargue G, Moritz-Gasser S, Bonnetblanc F, Duffau H (2014b): Interfering with the neural activity of mirror-related frontal areas impairs mentalistic inferences. *Brain Struct Funct*.
- Jaccard P (1901): Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bull Société Vaudoise Sci Nat* 37:241–272.
- Jones DK, Cercignani M (2010): Twenty-five pitfalls in the analysis of diffusion MRI data. *NMR Biomed* 23:803–820.
- Jones DK, Knösche TR, Turner R (2013): White matter integrity, fiber count, and other fallacies: The do’s and don’ts of diffusion MRI. *NeuroImage* 73:239–254.

- Kier EL, Staib LH, Davis LM, Bronen RA (2004a): Anatomic dissection tractography: a new method for precise MR localization of white matter tracts. *AJNR Am J Neuroradiol* 25:670–6.
- Kier EL, Staib LH, Davis LM, Bronen RA (2004b): MR imaging of the temporal stem: anatomic dissection tractography of the uncinata fasciculus, inferior occipitofrontal fasciculus, and Meyer’s loop of the optic radiation. *AJNR Am J Neuroradiol* 25:677–91.
- Kiernan JA (2000): Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microsc Today* 1.
- Kinoshita M, de Champfleury NM, Deverdun J, Moritz-Gasser S, Herbet G, Duffau H (2014): Role of fronto-striatal tract and frontal aslant tract in movement and speech: an axonal mapping study. *Brain Struct Funct*.
- Kinoshita M, Shinohara H, Hori O, Ozaki N, Ueda F, Nakada M, Hamada J, Hayashi Y (2012): Association fibers connecting the Broca center and the lateral superior frontal gyrus: a microsurgical and tractographic anatomy. *J Neurosurg* 116:323–30.
- Kinoshita M, Yamada K, Hashimoto N, Kato A, Izumoto S, Baba T, Maruno M, Nishimura T, Yoshimine T (2005): Fiber-tracking does not accurately estimate size of fiber bundle in pathological condition: initial neurosurgical experience using neuronavigation and subcortical white matter stimulation. *Neuroimage* 25:424–9.
- Klingler J (1935): Erleichterung der makroskopischen Praeparation des Gehirns durch den Gefrierprozess. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 36:247–256.
- Klingler J, Gloor P (1960): The connections of the amygdala and of the anterior temporal cortex in the human brain. *J Comp Neurol* 115:333–369.
- Latt J, Nilsson M, Rydhog A, Wirestam R, Stahlberg F, Brockstedt S (2007): Effects of restricted diffusion in a biological phantom: a q-space diffusion MRI study of asparagus stems at a 3T clinical scanner. *MAGMA* 20:213–22.
- Laun FB, Huff S, Stieltjes B (2009): On the effects of dephasing due to local gradients in diffusion tensor imaging experiments: relevance for diffusion tensor imaging fiber phantoms. *Magn Reson Imaging* 27:541–548.
- Leemans A, Sijbers J, Verhoye M, Van der Linden A, Van Dyck D (2005): Mathematical framework for simulating diffusion tensor MR neural fiber bundles. *Magn Reson Med*

53:944–953.

- Liewald D, Miller R, Logothetis N, Wagner H-J, Schüz A (2014): Distribution of axon diameters in cortical white matter: an electron-microscopic study on three human brains and a macaque. *Biol Cybern* 108:541–557.
- Lin CP, Tseng WY, Cheng HC, Chen JH (2001): Validation of diffusion tensor magnetic resonance axonal fiber imaging with registered manganese-enhanced optic tracts. *Neuroimage* 14:1035–47.
- Lin CP, Wedeen VJ, Chen JH, Yao C, Tseng WY (2003): Validation of diffusion spectrum magnetic resonance imaging with manganese-enhanced rat optic tracts and ex vivo phantoms. *Neuroimage* 19:482–95.
- Liu X-B, Schumann CM (2014): Optimization of electron microscopy for human brains with long-term fixation and fixed-frozen sections. *Acta Neuropathol Commun* 2:42.
- Ludwig E, Klingler J (1956): *atlas humani cerebri*. Basel New York: Karger, S.
- Lu Y-B, Franze K, Seifert G, Steinhäuser C, Kirchhoff F, Wolburg H, Guck J, Janmey P, Wei E-Q, Käs J, Reichenbach A (2006): Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proc Natl Acad Sci* 103:17759–17764.
- Magnain C, Augustinack JC, Reuter M, Wachinger C, Frosch MP, Ragan T, Akkin T, Wedeen VJ, Boas DA, Fischl B (2014): Blockface histology with optical coherence tomography: a comparison with Nissl staining. *NeuroImage* 84:524–533.
- Maldonado IL, de Champfleury NM, Velut S, Destrieux C, Zemmoura I, Duffau H (2013): Evidence of a middle longitudinal fasciculus in the human brain from fiber dissection. *J Anat* 223:38–45.
- Maldonado IL, Mandonnet E, Duffau H (2012): Dorsal Fronto-Parietal Connections of the Human Brain: A Fiber Dissection Study of Their Composition and Anatomical Relationships. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol* 295:187–195.
- Marie P (1906): Révision de la question de l'aphasie : la troisième circonvolution frontale gauche ne joue aucun rôle spécial dans la fonction du langage. *Sem Médicale*:241–247.
- Martenson RE (1992): *Myelin*. CRC Press.
- Martino J, da Silva-Freitas R, Caballero H, Marco de Lucas E, Garcia-Porrero JA, Vazquez-Barquero A (2013): Fiber dissection and diffusion tensor imaging tractography study

- of the temporoparietal fiber intersection area. *Neurosurgery* 72:87–97; discussion 97–8.
- Martino J, Brogna C, Robles SG, Vergani F, Duffau H (2010): Anatomic dissection of the inferior fronto-occipital fasciculus revisited in the lights of brain stimulation data. *Cortex* 46:691–699.
- Martino J, De Witt Hamer PC, Vergani F, Brogna C, de Lucas EM, Vazquez-Barquero A, Garcia-Porrero JA, Duffau H (2011): Cortex-sparing fiber dissection: an improved method for the study of white matter anatomy in the human brain. *J Anat* 219:531–41.
- Mesulam MM (1979): Tracing neural connections of human brain with selective silver impregnation. Observations on geniculocalcarine, spinothalamic, and entorhinal pathways. *Arch Neurol* 36:814–8.
- Mori S (2007): Introduction to diffusion tensor imaging. Amsterdam ; Boston: Elsevier. Vol. 1st.
- Mori S, van Zijl PC (2002): Fiber tracking: principles and strategies - a technical review. *NMR Biomed* 15:468–80.
- Moseley ME, Wendland MF, Kucharczyk J (1991): Magnetic resonance imaging of diffusion and perfusion. *Top Magn Reson Imaging TMRI* 3:50–67.
- Nave K-A (2010): Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244–252.
- Nimsky C, Ganslandt O, Merhof D, Sorensen AG, Fahlbusch R (2006): Intraoperative visualization of the pyramidal tract by diffusion-tensor-imaging-based fiber tracking. *Neuroimage* 30:1219–29.
- Özarlan E, Komlosh ME, Lizak MJ, Horkay F, Basser PJ (2011): Double pulsed field gradient (double-PFG) MR imaging (MRI) as a means to measure the size of plant cells. *Magn Reson Chem* 49:S79–S84.
- Pagani E, Filippi M, Rocca MA, Horsfield MA (2005): A method for obtaining tract-specific diffusion tensor MRI measurements in the presence of disease: application to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neuroimage* 26:258–65.
- Pautler RG, Silva AC, Koretsky AP (1998): In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med Off J Soc Magn Reson Med Soc Magn Reson Med* 40:740–748.

- Paxinos G, Watson C (2007): The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam ; Boston ; Academic Press/Elsevier. Vol. 6th. <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0745/2006937142-d.html>.
- Peltier J, Travers N, Destrieux C, Velut S (2006): Optic radiations: a microsurgical anatomical study. *J Neurosurg* 105:294–300.
- Perrin M, Poupon C, Rieul B, Leroux P, Constantinesco A, Mangin JF, Lebihan D (2005): Validation of q-ball imaging with a diffusion fibre-crossing phantom on a clinical scanner. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:881–91.
- Peuskens D, van Loon J, Van Calenbergh F, van den Bergh R, Goffin J, Plets C (2004): Anatomy of the anterior temporal lobe and the frontotemporal region demonstrated by fiber dissection. *Neurosurgery* 55:1174–84.
- Poupon C, Laribiere L, Tournier G, Bernard J, Fournier D, Fillard P, Descoteaux M, Mangin JF (2010): A diffusion hardware phantom looking like a coronal brain slice. In: . *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*. http://www.researchgate.net/profile/Jean-Francois_Mangin/publication/236964932_A_Diffusion_Hardware_Phantom_Looking_Like_a_Coronal_Brain_Slice/links/00b4952de9c89c5bc2000000.pdf.
- Poupon C, Rieul B, Kezele I, Perrin M, Poupon F, Mangin JF (2008): New diffusion phantoms dedicated to the study and validation of high-angular-resolution diffusion imaging (HARDI) models. *Magn Reson Med* 60:1276–83.
- Pullens P, Roebroeck A, Goebel R (2010): Ground truth hardware phantoms for validation of diffusion-weighted MRI applications. *J Magn Reson Imaging* 32:482–8.
- Rosene DL, Roy NJ, Davis BJ (1986): A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *J Histochem Cytochem* 34:1301–1315.
- Sarubbo S, Benedictis A, Maldonado IL, Basso G, Duffau H (2013): Frontal terminations for the inferior fronto-occipital fascicle: anatomical dissection, DTI study and functional considerations on a multi-component bundle. *Brain Struct Funct* 218:21–37.
- Schmahmann JD, Pandya DN, Wang R, Dai G, D’Arceuil HE, de Crespigny AJ, Wedeen VJ (2007): Association fibre pathways of the brain: parallel observations from diffusion spectrum imaging and autoradiography. *Brain* 130:630–53.

- Schmahmann JD, Pandya D (2009): Fiber pathways of the brain. Oxford University Press.
- Shreiber DI, Hao H, Elias RA (2008): Probing the influence of myelin and glia on the tensile properties of the spinal cord. *Biomech Model Mechanobiol* 8:311–321.
- Sparks DL, Lue LF, Martin TA, Rogers J (2000): Neural tract tracing using Di-I: a review and a new method to make fast Di-I faster in human brain. *J Neurosci Methods* 103:3–10.
- Thomas C, Ye FQ, Irfanoglu MO, Modi P, Saleem KS, Leopold DA, Pierpaoli C (2014): Anatomical accuracy of brain connections derived from diffusion MRI tractography is inherently limited. *Proc Natl Acad Sci* 111:16574–16579.
- Tournier JD, Calamante F, Gadian DG, Connelly A (2003): Diffusion-weighted magnetic resonance imaging fibre tracking using a front evolution algorithm. *Neuroimage* 20:276–88.
- Tournier J-D, Yeh C-H, Calamante F, Cho K-H, Connelly A, Lin C-P (2008): Resolving crossing fibres using constrained spherical deconvolution: Validation using diffusion-weighted imaging phantom data. *NeuroImage* 42:617–625.
- Ture U, Yasargil DC, Al-Mefty O, Yasargil MG (1999): Topographic anatomy of the insular region. *J Neurosurg* 90:720–33.
- Ture U, Yasargil MG, Friedman AH, Al-Mefty O (2000): Fiber dissection technique: lateral aspect of the brain. *Neurosurgery* 47:417–26; discussion 426–7.
- Ture U, Yasargil MG, Pait TG (1997): Is there a superior occipitofrontal fasciculus? A microsurgical anatomic study. *Neurosurgery* 40:1226–32.
- Wakana S, Caprihan A, Panzenboeck MM, Fallon JH, Perry M, Gollub RL, Hua K, Zhang J, Jiang H, Dubey P, Blitz A, van Zijl P, Mori S (2007): Reproducibility of quantitative tractography methods applied to cerebral white matter. *NeuroImage* 36:630–644.
- Wang H, Black AJ, Zhu J, Stigen TW, Al-Qaisi MK, Netoff TI, Abosch A, Akkin T (2011): Reconstructing micrometer-scale fiber pathways in the brain: multi-contrast optical coherence tomography based tractography. *Neuroimage* 58:984–92.
- Yanasak N, Allison J (2006): Use of capillaries in the construction of an MRI phantom for the assessment of diffusion tensor imaging: demonstration of performance. *Magn Reson Imaging* 24:1349–61.
- Yeh C-H, Tournier J-D, Cho K-H, Lin C-P, Calamante F, Connelly A (2010): The effect of finite diffusion gradient pulse duration on fibre orientation estimation in diffusion

MRI. *NeuroImage* 51:743–751.

Yendiki A, Panneck P, Srinivasan P, Stevens A, Zollei L, Augustinack J, Wang R, Salat D, Ehrlich S, Behrens T, Jbabdi S, Gollub R, Fischl B (2011): Automated Probabilistic Reconstruction of White-Matter Pathways in Health and Disease Using an Atlas of the Underlying Anatomy. *Front Neuroinformatics* 5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3193073/>.

Yu CS, Li KC, Xuan Y, Ji XM, Qin W (2005): Diffusion tensor tractography in patients with cerebral tumors: a helpful technique for neurosurgical planning and postoperative assessment. *Eur J Radiol* 56:197–204.

Zemmoura I, Blanchard E, Raynal P-I, Rousselot-Denis C, Destrieux C, Velut S (2015): How Klingler’s dissection permits exploration of brain structural connectivity? An electron microscopy study of human white matter. *Brain Struct Funct*. <http://link.springer.com/10.1007/s00429-015-1050-7>.

Zemmoura I, Serres B, Andersson F, Barantin L, Tauber C, Filipiak I, Cottier J-P, Venturini G, Destrieux C (2014): FIBRASCAN: A novel method for 3D white matter tract reconstruction in MR space from cadaveric dissection. *NeuroImage* 103:106–118.

Zikopoulos B, Barbas H (2010): Changes in prefrontal axons may disrupt the network in autism. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:14595–14609.

Annexes

Annexe 1 : Première contribution — FIBRASCAN: A novel method for 3D white matter tract reconstruction in MR space from cadaveric dissection (2014) *NeuroImage*.



Contents lists available at ScienceDirect

NeuroImage

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynimg

FIBRASCAN: A novel method for 3D white matter tract reconstruction in MR space from cadaveric dissection



Ilyess Zemmoura^{a,b,d,*}, Barthélémy Serres^{a,c}, Frédéric Andersson^a, Laurent Barantin^a, Clovis Tauber^a, Isabelle Filipiak^a, Jean-Philippe Cottier^{a,e}, Gilles Venturini^c, Christophe Destrieux^{a,b,d}

^a INSERM U930 Imagerie et Cerveau, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

^b Université François-Rabelais de Tours, Laboratoire d'Anatomie, Tours, France

^c Université François-Rabelais de Tours, Laboratoire d'Informatique, EA6300 Tours, France

^d CHRU de Tours, Service de Neurochirurgie, Tours, France

^e CHRU de Tours, Service de Neuroradiologie, Tours, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 4 September 2014

Available online 16 September 2014

Keywords:

Fiber dissection
Diffusion tractography
Fiber tracts
Tractography validation
Comparison dissection tractography

ABSTRACT

Introduction: Diffusion tractography relies on complex mathematical models that provide anatomical information indirectly, and it needs to be validated. In humans, up to now, tractography has mainly been validated by qualitative comparison with data obtained from dissection. No quantitative comparison was possible because Magnetic Resonance Imaging (MRI) and dissection data are obtained in different reference spaces, and because fiber tracts are progressively destroyed by dissection. Here, we propose a novel method and software (FIBRASCAN) that allow accurate reconstruction of fiber tracts from dissection in MRI reference space.

Method: Five human hemispheres, obtained from four formalin-fixed brains were prepared for Klingler's dissection, placed on a holder with fiducial markers, MR scanned, and then dissected to expose the main association tracts. During dissection, we performed iterative acquisitions of the surface and texture of the specimens using a laser scanner and two digital cameras. Each texture was projected onto the corresponding surface and the resulting set of textured surfaces was coregistered thanks to the fiducial holders. The identified association tracts were then interactively segmented on each textured surface and reconstructed from the pile of surface segments. Finally, the reconstructed tracts were coregistered onto ex vivo MRI space thanks to the fiducials. Each critical step of the process was assessed to measure the precision of the method.

Results: We reconstructed six fiber tracts (long, anterior and posterior segments of the superior longitudinal fasciculus; inferior fronto-occipital, inferior longitudinal and uncinata fasciculi) from cadaveric dissection and ported them into ex vivo MRI reference space. The overall accuracy of the method was of the order of 1 mm: surface-to-surface registration = 0.138 mm (standard deviation (SD) = 0.058 mm), deformation of the specimen during dissection = 0.356 mm (SD = 0.231 mm), and coregistration surface-MRI = 0.6 mm (SD = 0.274 mm). The spatial resolution of the method (distance between two consecutive surface acquisitions) was 0.345 mm (SD = 0.115 mm).

Conclusion: This paper presents the robustness of a novel method, FIBRASCAN, for accurate reconstruction of fiber tracts from dissection in the ex vivo MR reference space. This is a major step toward quantitative comparison of MR tractography with dissection results.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cerebral white matter fiber tract anatomy is of great importance for greater understanding of brain physiology and physiopathology, and for

Abbreviations: ADC, apparent diffusion coefficient; AF, arcuate fasciculus; DTI, Diffusion Tensor Imaging; ICP, Iterative Closest Point; IFOF, inferior fronto-occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; PLI, Polarized light imaging; OCT, Optical Coherence Tomography; ROI, region of interest; SLF, superior longitudinal fasciculus; SNR, signal-to-noise ratio; UF, uncinata fasciculus; VOI, volume of interest.

* Corresponding author at: CHRU Bretonneau, Service de Neurochirurgie, 2 bd Tonnellé, 37044 Tours Cedex, France. Fax: +33 247478096.

E-mail address: ilyess.zemmoura@univ-tours.fr (I. Zemmoura).

diagnosis and follow-up of degenerative, inflammatory or tumoral diseases. Diffusion tractography is the only non-invasive technique for localizing cerebral white matter fiber tracts in humans. Diffusion Tensor Imaging (DTI), which models diffusion as an ellipsoid for each voxel (Basser et al., 1994; Le Bihan and Breton, 1985), is widely used in both clinical practice and research to evaluate fiber tract pathways (Mori and van Zijl, 2002). DTI-based tractography oversimplifies fiber tract anatomy because it only considers a single direction of diffusion per voxel. Alternative methods for data acquisition, such as High Angular Resolution Diffusion Imaging (Tuch et al., 2002), and post-processing, such as spherical deconvolution (Alexander, 2005; Tournier et al., 2004) and probabilistic algorithms (Behrens et al., 2003, 2007; Parker

and Alexander, 2005), have been proposed for the detection and reconstruction of several populations of fibers in a single voxel. However, although tractography has already been used for pre-operative planification and per-operative navigation in patients operated on for cerebral tumors (Nimsky et al., 2006; Yu et al., 2005), it has sometimes been shown to lack reliability (Kinoshita et al., 2005; Nimsky et al., 2005). Indeed, diffusion tractography relies on complex acquisition methods and post-processing mathematical models, which provide anatomical information indirectly, and therefore needs to be validated. Many validation methods on phantoms, animal and human anatomical specimens have been proposed, but none are entirely satisfactory.

Phantoms include biological and synthetic objects modeling water diffusion in biological tissues, and artificial data. Tractography is possible in biological phantoms mimicking diffusion in the brain, such as muscle, spinal cord or plants (Basser et al., 1994; Latt et al., 2007). However, the fiber route is relatively simple in these specimens and they cannot be used over a long period of time due to their biological nature. Synthetic phantoms made of capillaries (Lin et al., 2003; Yanasak and Allison, 2006) remain very simple compared to the complex micro-architecture of the brain. For this reason, phantoms including crossing or angular fibers that are closer to the organization of white matter have been built using various textile fibers with known directions and calibers: rayon (Perrin et al., 2005), polyester (Pullens et al., 2010), and acrylic (Fillard et al., 2011; Poupon et al., 2008). Finally, artificial data are computer-generated and are thought to be similar to DTI (Chen and Song, 2008). They can be used to assess algorithms but of course not to check the anatomical validity of the acquired data.

In animals, tractography has been compared with autoradiography in monkeys (Dauguet et al., 2007; Schmahmann et al., 2007), with a lack of perfect concordance, possibly because of difficulty reconstructing a histological volume from autoradiographic slices before registering it onto in vivo MRI. Manganese has been proposed to limit difficulty related to histological preparation (Dyrby et al., 2007; Lin et al., 2001, 2003); once applied on the animal cortex, it acts as a tracer that follows the neighboring axons. Marked axons gain paramagnetic properties from the manganese and appear hyperintense on T1-weighted MRI. Direct comparison of tractography with manganese tracing on T1-weighted MRI is therefore possible with no need for histological preparation. Nevertheless, even when manganese is stereotactically injected, regional diffusion occurs, marking a large area of the brain (Dyrby et al., 2007; Lin et al., 2001).

For obvious ethical reasons, only ex vivo techniques are acceptable in humans. Ex vivo axonal tracing using silver (Mesulam, 1979) or Di-I (1,1-dioctadecyl 1–3,3,3',3'-tetramethyl lindocarbocyanine perchlorate) (Sparks et al., 2000) have been proposed. Unfortunately, this stain only diffuses to 20 to 40 mm from the injection point, which is insufficient for large fiber tracts. Polarized light imaging (PLI) records light transmission through an anatomical slice; due to optical birefringence of the myelin sheaths, light transmission depends on the relative orientations of light polarization and fiber tracts (Axer et al., 2001; Dammers et al., 2010; Palm et al., 2010). Refinements of this promising technique can evaluate fiber direction at a micrometer-scale resolution but, as it uses slices, it suffers from the same limitation as histological preparation for axonal tracing, i.e. loss of 3D coherence of fiber tracts. Optical Coherence Tomography (OCT) directly images the fiber direction at the surface of the specimen with (Wang et al., 2011) or without (Magnain et al., 2014) polarized light. As it studies this orientation directly at the surface of the blockface, and not on slices, it does not suffer from artifacts induced by specimen slicing. Convincing images have been published for imaging the rat (Wang et al., 2011) but not the whole human brain, mainly because of technical limitations, especially specimen size. Direct comparison of ex vivo tractography and dissection in the same specimens is of course a very attractive but challenging approach (D'Arceuil et al., 2007). Post-mortem scanning of fixed specimens has at least two advantages: long scanning time and absence of physiological and motion noise. Recently, a pipeline for high-quality ex vivo

scanning using limited b-value (4000 s/mm²) and gradient strength value (56 mT/m) was proposed by Dyrby et al. (2011) in sedated pigs transcardially perfused with formalin. As demonstrated by D'Arceuil and de Crespigny (2007), such an immediate fixation limits the drop of apparent diffusion coefficient (ADC), T2 and signal-to-noise ratio (SNR) occurring post-mortem but cannot be obtained in humans for evident reasons. Consequently, the resulting ADC drop needs to be corrected by modified scanning conditions. For instance, increasing gradient strength was proposed to preserve ex vivo DWI image quality (D'Arceuil and de Crespigny, 2007). It indeed allows high b-values to be achieved with much shorter echo times, and thus much higher SNR than on conventional scanners.

White matter dissection of formalin-fixed anatomical specimens after freezing and defrosting was first proposed by Klingler (Klingler, 1935; Klingler and Gloor, 1960; Ludwig and Klingler, 1956). This method, which helps the dissection of white matter tracts, is widely considered to be a gold standard to validate tractography results in the human, and good concordance has generally been found between tractography and dissection (Catani et al., 2002, 2005; Catani and Thiebaut de Schotten, 2008; Lawes et al., 2008; Mori et al., 2002, 2008; Oishi et al., 2008; Peltier et al., 2010a,b; Stieltjes et al., 2001; Wakana et al., 2004). Nevertheless, this finding has certain limitations and can only be considered at a coarse scale for two main reasons: (1) results from dissection and tractography are obtained in different reference spaces (anatomy laboratory and MR scanner, respectively), and often from different individuals, allowing qualitative but not quantitative comparisons; and (2) Klingler's method is destructive because superficial layers of the studied specimen and tract are removed to study inner anatomical structures, making it difficult to study the relationships of fiber tracts to the cortex and between fiber tracts.

We have developed an original method and software, FIBRASCAN: (1) to monitor dissection of white matter tracts by iterative surface and texture acquisitions of the specimen; (2) to interactively segment tracts on these surfaces; (3) to reconstruct tracts from these segmented surfaces; and (4) to port the reconstructed tracts into ex vivo MR anatomical space.

We present this method below and illustrate it with the reconstruction of four association fiber tracts: the arcuate fasciculus (AF), the Inferior fronto-occipital fasciculus (IFOF), the Inferior longitudinal fasciculus (ILF), and the uncinate fasciculus (UF).

Materials and methods

Section 2.1 presents the different steps of the procedure: brains were prepared for dissection, MR scanned, and then dissected. Textured surfaces of the specimens were iteratively acquired during dissection and then registered onto the first acquired surface, used as a reference space. Association tracts were then interactively segmented on each surface, 3D reconstructed, and finally ported into ex vivo MRI anatomical space (see Fig. 1).

Section 2.2 then explains how each step of the procedure was assessed to check that the reconstructed tract had correctly modeled the underlying anatomy.

Detailed process of the method

Anatomical preparation of the brains

Five human hemispheres obtained from four subjects involved in a body donation program were prepared as proposed by Klingler (Klingler and Gloor, 1960): to avoid decomposition, brains were extracted within 48 h of death. Then, they were hung from the basilar artery in a 5% formalin solution for four months. Formalin solution was renewed every two weeks. The arachnoid, pia mater and cortical vessels were removed before the specimens were frosted at $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one week, and then slowly defrosted at $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for three to five days in water. After this process, the hemispheres were split from

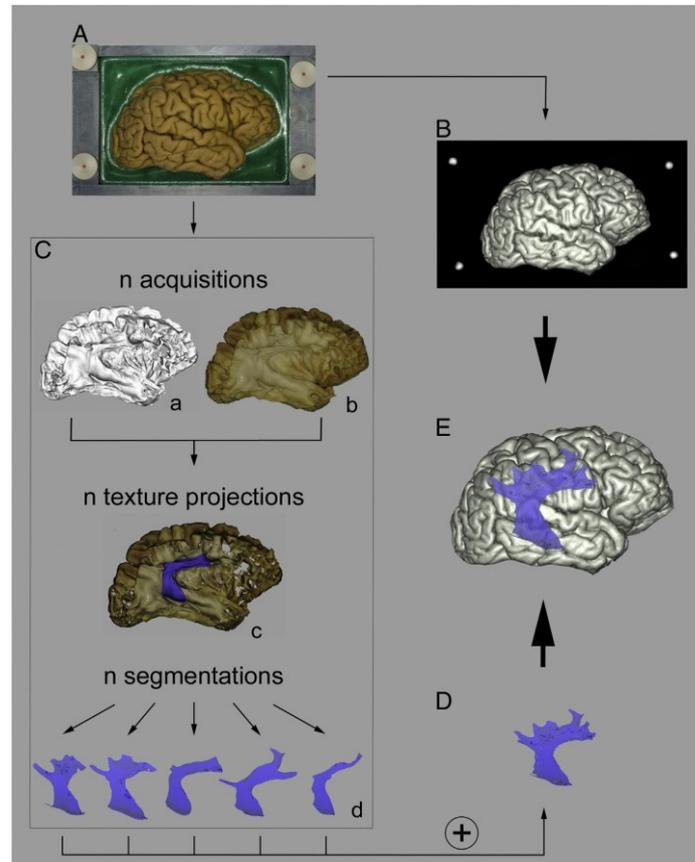


Fig. 1. Description of the method. (A) A human hemisphere is prepared for dissection and fixed on a PVC holder, containing non-coplanar surface (red dots) and MRI markers (not visible on panel A). The specimen is maintained in the holder by a thin layer of green paraffin. (B) The specimen is first MR scanned. The four MR fiducial markers appear as hyperintense spheres around the hemisphere. (C) The specimen is dissected in its holder and fiber tracts (here the arcuate fasciculus or AF) are progressively exposed (AF). At each of the n steps of dissection, the surface of the specimen and markers is acquired using a laser scanner (C-a). Texture is also captured with two digital cameras (C-b). The texture is projected onto the corresponding surface, and the AF is interactively segmented on this textured surface (C-c). At the end of the dissection, n segments of surface are available for the AF (C-d). (D) Tract reconstruction: The pile of segments is converted into a volumetric object with the same spatial resolution as the initial MRI. (E) The reconstructed tract is coregistered with MRI scanned prior to dissection.

the cerebellum and brainstem, and the corpus callosum was sagittally cut. Each hemisphere was kept in a 2.5% formalin solution until dissection.

Each anatomical specimen was placed on a specially designed polyvinyl chloride (PVC) holder where a 1 cm layer of melted paraffin had previously been cast. After cooling, paraffin prevented any movement of the specimen in the holder. The latter provided easy manipulation of the specimen during dissection and contained fiducial markers that were used as a reference for registration of the dissected tracts onto MRI: four calibrated non-coplanar cavities located in the PVC holder walls received spherical MRI markers (BrainLab, Feldkirchen, Germany) immobilized by plastic screws. The top of each screw also contained a calibrated depression used as a surface marker. MRI and surface markers allowed localization of the holder on MRI by visualization of a hyperintense signal, and during surface acquisitions by direct palpation of the screws (see below).

Ex vivo morphological MRI

As freezing creates deformations (Rosene et al., 1986), the specimens were scanned after formalin fixation, freezing and defrosting to allow further comparison between MR and dissection data. The prepared specimens (i.e. formalin fixed, frozen-defrosted) fixed on the holder were immersed in saline for scanning on a Signa HDxt 1.5T magnet (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI, USA) equipped with a Transmit/Receive Quadrature 16-pin birdcage coil. This type of coil increases signal homogeneity in the entire explored volume and decreases spatial deformation, as compared to multi-elements coils. It was also chosen as it was large enough to contain the PVC box in which the specimen and its holder were placed. We empirically determined sequence parameters providing the best gray-white matter contrast on *post-mortem* specimens. Hence, we performed a T1-weighted inversion recovery acquisition using the following parameters: TR = 7 ms; TE = 3 ms; TI = 400 ms; flip angle = 20°;

bandwidth = 25 kHz; Nex = 1; axial 1 mm thick slices, no gap; matrix = 256×256 ; FOV = 256×256 mm including the specimen and markers.

Klingler's dissection

After cortex resection, the main fiber tracts were progressively dissected using the method and tools described by Klingler (Klingler and Gloor, 1960; Ludwig and Klingler, 1956). This process is similar to "anatomy guided sculpture": after removing the cortex, white matter tracts are progressively exposed. Whereas "classical" Klingler's method only shows the superficial aspect of the tracts, we also wanted to capture the whole corresponding volume of interest to reconstruct it in MR space. For this reason, once discovered, tracts were progressively removed, only taking off very thin layers of white matter fibers between each surface acquisition.

To evaluate our method, we dissected the three segments of the AF, IFOF, ILF and UF in two hemispheres (one right and one left, from two different brains). We used the anatomical descriptions obtained from the literature (Déjerine and Dejerine-Klumpke, 1895; Klingler and Gloor, 1960; Ludwig and Klingler, 1956; Makris et al., 2009; Martino et al., 2013b; Peltier et al., 2006) to dissect these tracts as follows. First, resection of the cortex and underlying U-fibers of the inferior part of the supra-marginal gyrus allowed exposure of the long posterior (vertical) segment of the AF. Next, the same method was applied to the superior part of the supra-marginal gyrus to expose the white matter of the parietal operculum, i.e. the anterior (horizontal) segment of the AF, connecting frontal and parietal lobes. Further dissection, posteriorly, anteriorly, and ventrally, exposed the lateral aspect of the long segment of the AF. After removal of the inferior temporal cortex, the lateral aspects of the ILF were progressively exposed. Deep dissection was then continued, until exposure of the corona radiata, claustrum radiations, and fibers of the *stratum sagittale* (including the IFOF). When other tracts, especially the pyramidal tract, crossed the AF we deliberately chose to preserve AF fibers, while eliminating crossing fibers. This point is described in detail in the Discussion section and is illustrated in video 1 provided with this paper. Finally, the insular cortex was removed. The extreme capsule fibers and the claustrum were then dissected to expose the stem of the IFOF and UF before their anterior terminations were identified.

Iterative surface and texture acquisition of the specimen (see Fig. 2)

To allow an accurate reconstruction of the tracts, Klingler's dissection technique had to be adapted to the surface acquisition method.



Fig. 2. Laser scanner. The laser scanner is composed of an articulated two-segment arm, whose tip displacement is recorded precisely and transferred to an attached personal computer. Surface information was mostly obtained from a laser pointer, but also from a mechanical probe, both attached to the arm tip. For surface acquisition, the laser was displaced onto the anatomical specimen, and a mesh was computed and displayed online from impacts of the beam on the surface.

Whereas Klingler's method only shows the superficial aspect of the tracts, here we also wanted to capture the whole corresponding volume of interest to reconstruct it in the MR space. For this reason, once exposed, tracts were progressively removed, only taking off very thin layers of white matter fibers between each surface acquisition using two complementary techniques:

1. *Laser surface*: a surface scanner (ScanArm V2®, FARO Technology Inc, Lake Mary, FL, USA) was used to reconstruct a mesh with dedicated software (Geomagic Studio®, Geomagic, Morrisville, NC, USA). Two modes of acquisition were available: for surface marker acquisition used for the registration of surfaces in a later step, a mechanical probe on the scanner was used to locate the screw depressions of the specimen holder; for surface acquisition, a laser beam was displaced onto the anatomical specimen. The accuracy of this device, as declared by the manufacturer, is 0.096 mm and 0.046 mm for the laser and for the mechanical pointer respectively.
2. *Texture*: The laser surface technique did not provide any texture information, which is nonetheless essential for identifying white matter tracts. For this reason, texture acquisition was also performed using two high-resolution digital cameras (Pentax® K-20 camera with Pentax® lens D-FA 100 mm f/2.8 Macro). The digital cameras were screwed onto a column and the specimen was reproducibly wedged between rigid PVC rails before each acquisition. The photograph was performed orthogonally by one camera and obliquely by the other to obtain three different viewpoints by applying two 90-degree rotations to the specimen (see Supplementary data Fig. 1). The minimum distance between cameras and the specimen was chosen to obtain good spatial resolution. The choice of a prime lens with a long focal length minimized image distortion.

Texture projection onto surface

Each dissection step was modeled by a laser-acquired surface and its corresponding texture. The 3D laser surface provided by 3D laser scanner was a triangle mesh which was textured using a perspective texturing technique (Everitt, 2001): the photographs were projected onto the corresponding laser surface using parameters that were calculated for the first surface/texture couple. These parameters were: (1) the field of view, calculated from the focal length of the lens and the dimensions of the sensor; (2) the distance between the sensor and the specimen; and (3) the position of surface markers, which were visible on both laser surface and photographs and were used to tune the registration manually. As cameras and anatomical specimen positions were fixed across scanning sessions, the same parameters were used for the remaining surface/texture couples obtained for the same specimen. Finally, texture projection quality was carefully checked on key anatomical landmarks.

Surface-to-surface registration

The set of textured surfaces obtained during dissection of a specimen was registered into a common anatomical reference space, namely the surface of the specimen scanned prior to any dissection. For this affine registration we used the surface markers as landmarks, and the Iterative Closest Point (ICP) algorithm (Besl and McKay, 1992) was applied to these landmarks.

Interactive segmentation of the tract on textured surfaces

The set of coregistered textured surfaces was displayed in FIBRASCAN interface. White matter segments belonging to the visible association tracts were manually segmented on each textured surface (see Fig. 3) using anatomical rules previously described in the literature. FIBRASCAN includes tools to draw paths on the surface using variable orientations, to fill the resulting path, and to assign an anatomical class to the resulting region of interest (Serres et al., 2013). To help identify paths, the textured surface and a high-resolution photograph of the studied surface were simultaneously displayed.

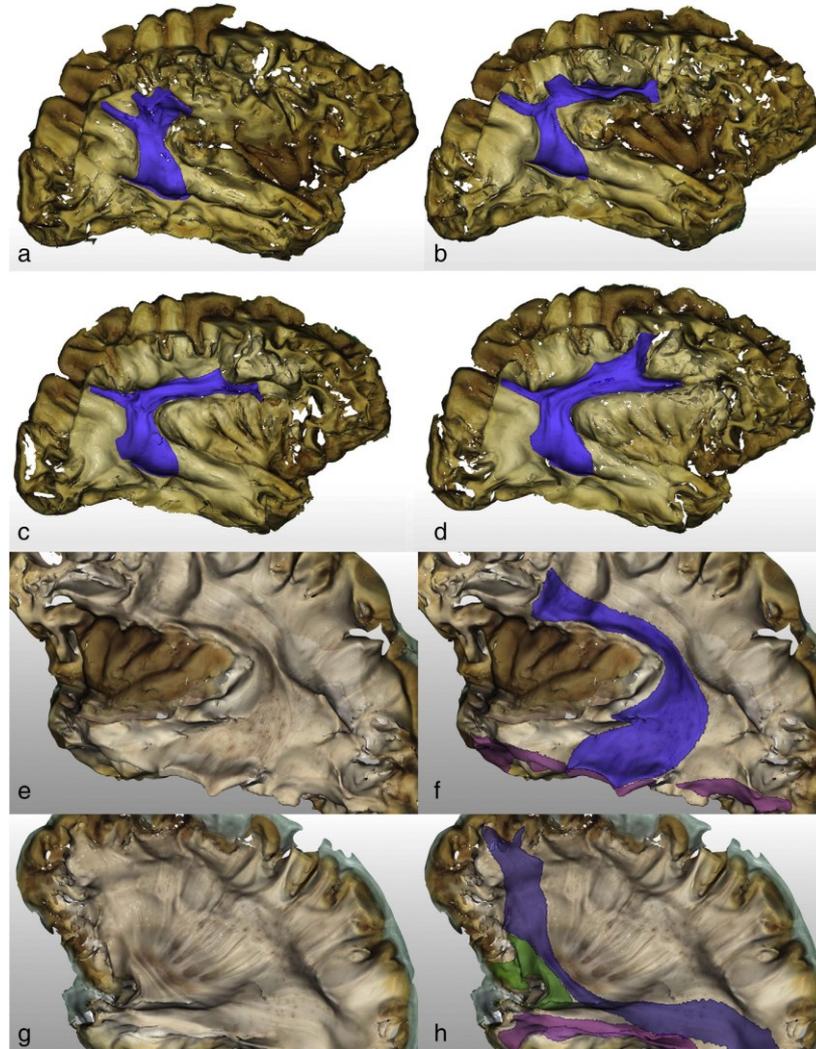


Fig. 3. Interactive segmentation of fiber tracts on textured surfaces. *a–d*: Lateral views of the textured surface of a right hemisphere as it appears in the FIBRASCAN software during the interactive segmentation. The arcuate fasciculus is segmented (in blue) on each surface acquired during dissection. As an example, step 7 (*a*), step 17 (*b*), step 25 (*c*) and step 29 (*d*) of dissection are represented. *e–h*: Lateral views of the textured surface of a left hemisphere at step 37 before (*e*) and after (*f*) segmentation of the long segment of the AF (in blue) and the ILF (in purple), and at step 54 before (*g*) and after (*h*) segmentation of the IFOF (in blue), the UF (in green) and the ILF (in purple).

Reconstruction of the tract from surfaces

At the end of the segmentation step, we obtained a set of textured surfaces, which contained segments of tracts. The tracts were then reconstructed by piling up these segments obtained from the series of surfaces. The tracts obtained from dissection and the surface markers were converted into a volume with the same spatial resolution as MRI (cubic voxels of 1 mm^3 , matrix 256×256). This volumetric object contained small holes (one voxel maximum) due to the spatial resolution of the

iterative surface acquisitions, which were filled with a single closing operation (dilatation followed by erosion) (Jain, 1986).

Registration into ex vivo MRI space

To allow subsequent inter-modality comparisons, the tracts were registered into the ex vivo MRI space. The binarized reconstructed volume was rigidly registered onto ex vivo MRI space using MR-fiducial

markers, surface markers (screw depressions), and ICP algorithm (Besl and McKay, 1992).

Assessment of the method

Each major step of the process was assessed to validate its accuracy:

Assessment of the surface-to-surface registration and surface acquisition reproducibility

The ICP algorithm (Besl and McKay, 1992) was proposed to minimize distance between a pair of surfaces. Here, it was used to minimize the distance between corresponding surface markers of the two surfaces.

Robustness of this registration method was checked on an anatomical specimen: we acquired the surface of this specimen three times, with very different orientations. Surfaces were coregistered in pairs, using the ICP algorithm. For each of these three pairs of surfaces, the ICP was initially used to coregister the two surfaces of a given pair by only minimizing the distance between corresponding surface markers. It was then applied to the whole specimen, not for registration purposes, but to compute the minimum distance between the two surfaces of a pair.

We first evaluated the distance between surface fiducial markers after coregistration of a given pair of surfaces. As the precise location of the markers was obtained by direct palpation using the mechanical probe of the laser scanner, this distance mainly depended on the robustness of the registration method. The excellent value obtained (0.05 mm, see results section) allowed us to assess the surface acquisition reproducibility by computing distance maps and histograms from a large zone of white matter (i.e. the region of interest of the study) for each pair of surfaces. Any error in surface acquisition would have increased the distance between the coregistered surfaces.

Assessment of specimen deformation induced by dissection

Prior to fiber tract reconstruction, it was necessary to demonstrate that the dissection did not significantly deform the specimens. For two of the dissected specimens, we considered the surfaces acquired before dissection and at the tenth step of dissection. The two surfaces were coregistered using the same method (linear registration using the ICP on fiducial markers). Non-dissected areas of the specimen were delineated by visually comparing photographs taken at both steps, and distance maps between surfaces were then computed for these regions. Without any deformation or slackening of the specimens, the distance between the two surfaces was expected to remain close to zero in these non-dissected areas.

Assessment of the spatial resolution of the dissection method

Inter-surface spatial resolution of our method depended on acquisition rate between surfaces. This rate was adapted to the user and specimen to obtain a spatial sampling of about 1 mm. We evaluated this rate by measuring the inter-surface distance for one of the dissected tracts (AF) between 11 consecutive dissection steps of one specimen.

Assessment of the coregistration of surface and MRI

The robustness of the method used to register surface data onto ex vivo MRI was checked using two human hemispheres. For each one, an additional MRI was acquired at an advanced step of dissection, when the AF was exposed. The specimen was laser-scanned to obtain the corresponding laser-acquired surface. The laser surface was then coregistered onto the corresponding MRI using the presented method (MR-fiducial markers, surface markers (screw depressions), and ICP algorithm). To evaluate the precision of the registration, we first extracted the surface of the specimen (saline-specimen interface) from MRI data. We then manually delineated the dissected white matter area on this surface. Finally, for each pair of surfaces obtained from surface and MR acquisitions, we built distance maps restricted to the area of interest

(dissected white matter). This was possible in our software (Serres et al., 2013), using a dedicated tool to compute a distance map from a selection of one of the two surfaces. This tool used the ICP, as described in section 2.2.1, not to minimize the distance between the two surfaces, but to calculate the distance between each point of the selected surface and the nearest point of the other surface.

Assessment of tract reconstruction from surfaces

This reconstruction process was validated on a simple test object. We used a hard-boiled egg, which was fixed in the same specimen holder, using agar-agar instead of paraffin to facilitate its "dissection". The egg was MR scanned, and then the egg yolk was dissected and scanned step by step using the previously described method. The egg yolk was then reconstructed from the pile of surfaces, converted into a binarized volume and registered onto the corresponding MRI (considered as the ground truth). Finally the egg yolk reconstructions obtained from dissection and from MRI were compared using several indicators: precision and recall obtained from the confusion matrix, and Dice and Jaccard coefficients (Dice, 1945; Jaccard, 1901).

Precision and recall were calculated from the confusion matrix, a tool used to compare the quality of the covering of two different sets. Here, we compared two binarized volumes: V (reconstructed volume from "dissection", to be validated) and V_{ref} (reference MRI-binarized volume, or ground truth).

If the confusion matrix is

$\frac{V}{V_{ref}}$	\notin	\in
\notin	a	b
\in	c	d

then the precision (P), defined as the ratio between the set of common voxels of the two volumes and those not present in the ground truth, is

$$P = \frac{d}{b + d}, \quad (1)$$

and the recall (R), defined as the ratio between the set of common voxels of the two volumes and those present only in the ground truth, is

$$R = \frac{d}{c + d}. \quad (2)$$

Dice coefficient (D) is a special case of the Kappa coefficient; it is the intersection divided by the mean volume of the two sets:

$$D = 2 \frac{V \cap V_{ref}}{|V \cup V_{ref}|}. \quad (3)$$

Jaccard coefficient (J) is another overlap agreement measure used to compute similarity and diversity between two samples; it is the intersection over the union:

$$J = \frac{V \cap V_{ref}}{|V \cup V_{ref}|}. \quad (4)$$

Dice and Jaccard coefficients can also be written with the confusion matrix using d and a cardinal operator (card):

$$D = 2 \frac{d}{\text{card}(V) + \text{card}(V_{ref})}, \quad (5)$$

$$J = \frac{d}{\text{card}(V) + \text{card}(V_{ref})}. \quad (6)$$

A value of 1 for P , R , D and J would correspond to a perfect overlap.

Results

We first present reconstructions obtained from dissection, then the results of the method assessment.

Tract reconstruction obtained from dissection

As a consequence of the modified Klingler method we used, each dissected tract was reconstructed from several “steps” of dissection.

Tract reconstructions presented here were obtained from two different brains. First, the SLF/AF was progressively dissected from a *right* hemisphere using Klingler’s method and reconstructed from 32 surface acquisitions obtained from dissection. Then, the anterior, posterior and long segments of the SLF/AF, the IFOF, the ILF and the UF, dissected from a *left* hemisphere, were respectively reconstructed from 12, 21, 31, 13, 42, and 15 surface acquisitions. The reconstructed tracts were then ported into ex vivo T1-weighted MR images. Fig. 4 and video 1 show several steps of dissection, while Fig. 5 and video 2 display the result of reconstruction in the MR reference space.

The morphology of the dissected association tracts was consistent with previous descriptions (Déjerine and Dejerine-Klumpke, 1895; Klingler and Gloor, 1960; Ludwig and Klingler, 1956; Makris et al., 2009; Martino et al., 2013b; Peltier et al., 2006). The three segments of the SLF/AF (Catani et al., 2005) were recognized. They were located medial to the U-fibers of the frontal operculum, inferior parietal lobule (*gyrus supramarginalis* and *gyrus angularis*), and posterior part of the superior and middle temporal gyri. The SLF/AF contained two superficial and one more medial long segment. The superficial segments were the *anterior horizontal segment*, which connected the ventral premotor cortex to the inferior parietal lobule, also known as SLF III (third part of the superior longitudinal fasciculus), and the *posterior vertical segment*, which connected the inferior parietal lobule to the posterior superior and middle temporal gyri. The third segment — the *long segment* or *AF proper* — was medial to them and was a C-shaped structure joining the *pars opercularis* and *pars triangularis* of the inferior frontal gyrus to the posterior middle temporal gyrus. The SLF/AF was surrounded by several white matter structures: U-fibers of the frontal, parietal and temporal operculas ran lateral to the SLF/AF; the SLF II (second part of

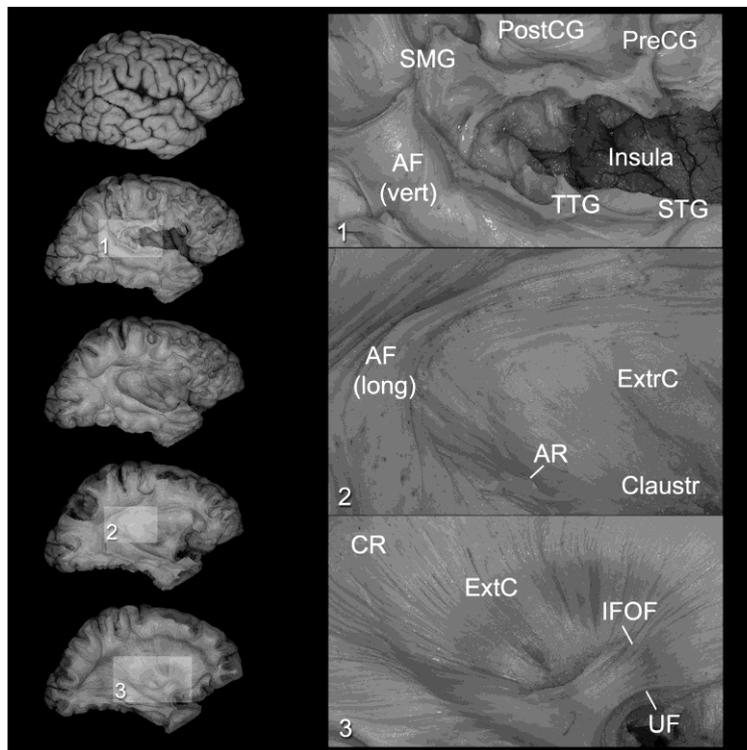


Fig. 4. Klingler dissection of the arcuate fasciculus. As an illustration, the arcuate fasciculus (AF) was dissected from the lateral aspect of the hemisphere. *Left panel:* dissection of a right AF; only five steps out of 32 are shown. Klingler’s method is a destructive technique that makes it difficult to study the relationships of a given fiber tract with the surrounding structures. *Right panel:* enlargements of three of these dissection steps. (1) The superficial horizontal segment of the AF, or superior longitudinal fasciculus (SLF) III (not shown), runs between the frontal and parietal opercula. It is located at the deep aspect of the pre-central gyrus (*PreCG*), post-central gyrus (*PostCG*) and supra-marginal gyrus (*SMG*). The superficial posterior vertical segment (*AF vert*) joins the parietal and temporal lobes. (2) The long segment of the AF (*AF long* or *AF proper*), which joins the frontal to the temporal lobes, only appears after removal of the superficial segments. The vertical segment of the AF and the insular cortex were removed, to show the medially located extreme capsule (*ExtC*) and claustrum (*Claustr*). The acoustic radiations (*AR*) run medially to the vertical and long segment of the AF, ending in the *TTG*. (3) The only way to ensure that the whole AF was dissected was to expose the medially located structures: at the end of the dissection of the AF, the corona radiata (*CR*), the external capsule (*ExtC*), the inferior fronto-occipital fasciculus (*IFOF*) and uncinata fasciculus (*UF*) were exposed. *AF* Arcuate fasciculus *AF long* Long segment of the arcuate fasciculus *AF vert* Vertical segment of the arcuate fasciculus *AR* Acoustic radiations *Claustr* Claustrum *CR* Corona radiata *ExtC* External capsule *ExtC* Extreme capsule *IFOF* Inferior fronto-occipital fasciculus *PostCG* Post-central gyrus *PreCG* Pre-central gyrus *SMG* Supramarginal gyrus *STG* Superior temporal gyrus *TTG* Transverse temporal gyrus *UF* uncinata fasciculus.

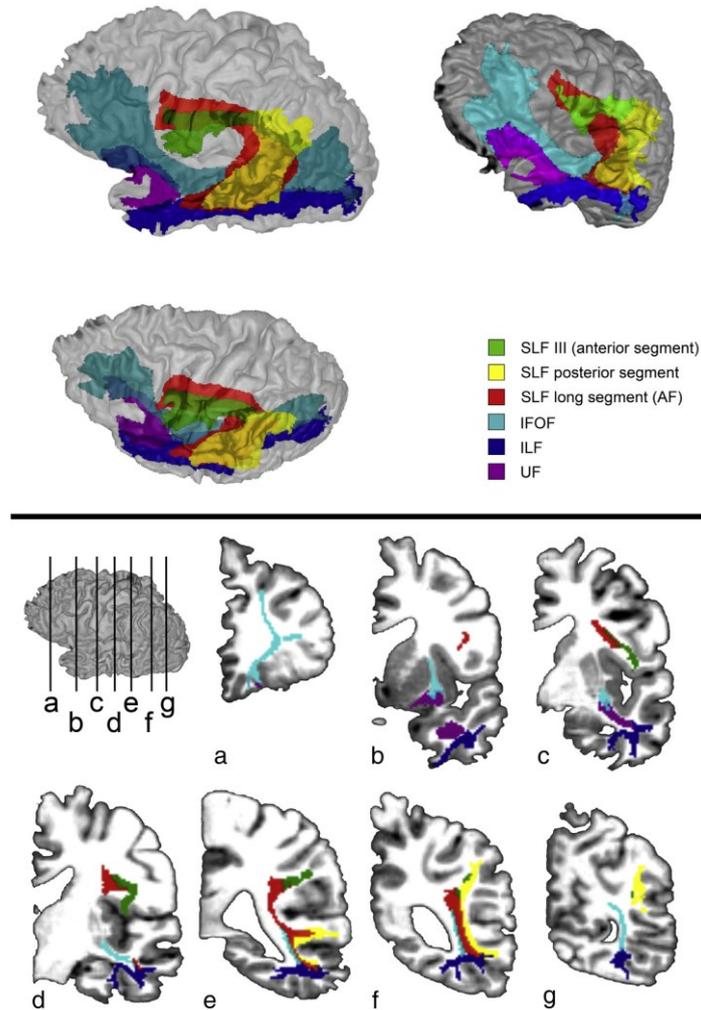


Fig. 5. Registration of the reconstructed tracts into ex vivo MRI space. *Top panel.* 3D semi-transparent lateral, antero-lateral and supero-lateral views of the ex vivo MRI of a left hemisphere. The registered dissected fasciculi are overlaid: superior longitudinal fasciculus (green, yellow and red), inferior fronto-occipital fasciculus (cyan), inferior longitudinal fasciculus (blue) and uncinate fasciculus (purple). *Bottom panel.* Ex vivo coronal MR sections of the same left hemisphere showing the registered tracts.

the SLF) and ILF were respectively dorsal and ventral to the AF; the acoustic radiations were anterior to the posterior vertical segment of the SLF/AF and ran medially toward the thalamus; the pyramidal and thalamo-cortical tracts crossed the fibers of the long segment of the AF perpendicularly in the depth of the fronto-parietal opercula; finally, after removal of the insular cortex, we found the fibers of the extreme capsule, the IFOF, the UF, the claustrum radiations (external capsule), and the corona radiata.

The IFOF connected the frontal lobe (dorsolateral prefrontal cortex, *pars orbitaris* of the inferior frontal gyrus) to the occipital lobe (superior and middle occipital gyri). The UF connected the frontal lobe (ventrolateral orbitofrontal cortex and prefrontal cortex) to the temporal lobe (anterior temporal pole and uncus). The insular segments of the IFOF and UF were part of the temporal stem, deep within the limen insulae.

These two association tracts had a ventral and dorsal fan shape, while their middle insular segment was compact.

Finally, the ILF connected the temporal to the occipital pole, on the ventral aspects of the previously described (SLF/AF, IFOF and UF) association tracts. Cortical connections were found on the ventral aspects of the temporal terminations of the SLF/AF (posterior part of the inferior temporal and fusiform gyri), splitting the superficial segment of the ILF into an anterior and a posterior segment.

Assessment of the accuracy of the method

Surface-to-surface registration and surface acquisition reproducibility

Surface-to-surface registration: Before the ICP was computed, the maximum distance between the surface markers of different acquisitions

was 58.198 mm. The algorithm coregistered the surface markers after three iterations. The distance between the markers after computation of the ICP was between 0.0325 and 0.0534 mm (mean = 0.0397 mm).

Surface acquisition reproducibility: After surface-to-surface registration, the mean and maximum distances between the pairs of surfaces were 0.138 mm (SD = 0.058 mm) and 0.923 mm, respectively (see Fig. 6).

Specimen deformation induced by dissection

For the two specimens used for this assessment, registration of step 0 and step 10 of dissection showed a mean error of 0.356 mm (SD = 0.231 mm) for the non-dissected area. The error exceeded 1 mm for only 0.2% of the points from this area (see Fig. 7).

Spatial resolution of the dissection method

Inter-surface distance between two consecutive steps of dissection was calculated for 11 steps of dissection, inside the area of the studied tract, i.e. the AF. The mean and maximum distances were 0.345 mm (SD = 0.115 mm) and 2.978 mm, respectively. The mean of the maximum distances for these 11 steps, which represents the spatial resolution of the dissection method, was 1.773 mm (SD = 0.609 mm) (see Fig. 8).

Coregistration of laser-acquired surface and MRI

Coregistration was then checked on two anatomical specimens. After registration between surfaces obtained from the laser scanner

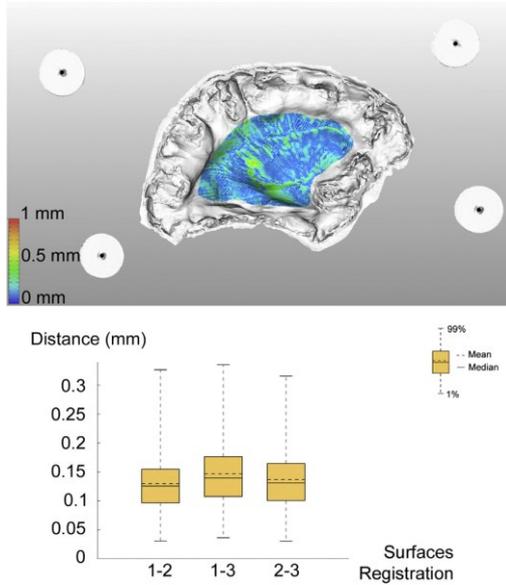


Fig. 6. Surface-to-surface registration and surface acquisition reproducibility. The surface of a large region of white matter for the same specimen was acquired three times, and surfaces were coregistered in pairs (1–2, 1–3, 2–3) using the Iterative Closest Point (ICP) algorithm on surface markers. For each of these three pairs of surfaces, the smallest distance between the two surfaces was computed. *Top panel.* The result of one registration (pair 1–2) is illustrated with a color map. *Bottom panel.* The mean and median values of the inter-surface distance are shown for each of the three pairs of surfaces. Intervals containing 98% (whiskers) and 50% (range: 25 to 75%) of data (orange box) are also presented.

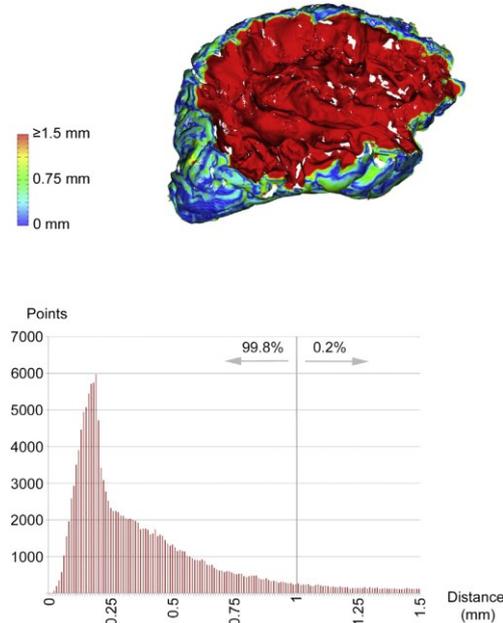


Fig. 7. Assessment of the deformation induced by dissection. For two of the studied specimens, the surfaces obtained before dissection (surface 0) and at dissection step 10 were coregistered using the ICP algorithm on surface landmarks. *Top panel.* The distance map between surfaces 0 and 10 for one specimen is presented. Distance threshold was set at 1.5 mm. Red areas mainly represent dissected parts of the specimen. *Bottom panel.* The non-dissected areas were delineated from the corresponding photographs, and the histogram was computed for these regions. Inter-surface distance for non-dissected areas was inferior to 1 mm for 99.8% of the points.

and MRI segmentation, error maps showed a mean and maximum distance of 0.6 mm (SD = 0.274 mm) and 2.2 mm respectively (see Fig. 9).

Tract reconstruction from surfaces

The tract reconstruction method was assessed using a simple 3D object (hard-boiled egg). Several indicators (precision, recall, Dice and Jaccard coefficient) used to compare reconstruction of the simple object from dissection and from MRI (considered as the ground truth) are presented in Table 1.

Overall accuracy of the method

Finally, when we consider the sum of the mean errors of surface-to-surface registration (0.1 mm), specimen deformation induced by dissection (0.3 mm), and registration onto MRI (0.6 mm), the accuracy of the whole process was of the order of 1 mm.

Discussion

Our novel technique allows accurate reconstruction of white matter tracts in ex vivo MRI space, from iterative textured surface acquisition and segmentation of an anatomical specimen. The name FIBRASCAN was used to embrace the whole framework (fixation/MRI/dissection – laser scan – photography/virtual segmentation/3D reconstruction/coregistration to MRI) to finally visualize dissected tracts in MRI space. As an example, we monitored the dissection of six association tracts from two hemispheres.

Tractography is unique by giving access to in vivo reconstruction of white matter tracts in humans. It is not perfect but improves now

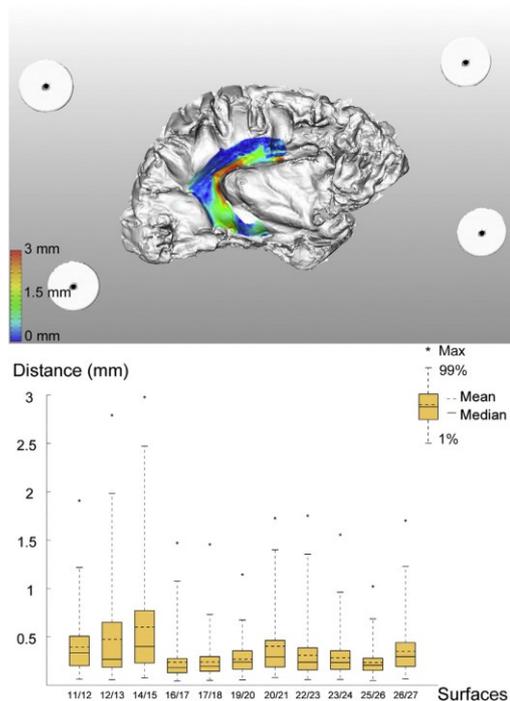


Fig. 8. Spatial resolution of the method (inter-surface distance). *Top panel.* One dissection step is illustrated for one specimen and the distance map calculated inside the area of dissection. *Bottom panel.* Inter-surface distance for two consecutive steps of dissection was computed within the dissected area of the same specimen. The maximum, mean and median values of the inter-surface distance are shown for each of the 11 dissection steps. Intervals containing 98% (whiskers) and 50% (range: 25 to 75%) of data (orange box) are also presented. The registration between two consecutive steps of dissection revealed a maximum error of 1 to 3 mm in the dissected area. The dissection had to be performed very slowly to improve the spatial resolution, i.e. to minimize the distance between surfaces.

when using crossing fibers reconstruction methods, stronger gradients to disentangle cellular spaces, better image resolution and new tracking approaches. Nevertheless, despite these technical refinements, tractography remains an indirect method. Far from being an anatomical imaging method displaying tracts *directly*, it uses water diffusion patterns to provide information about the brain's supposed underlying microarchitecture *indirectly* (Hubbard and Parker, 2009). Current diffusion and tractography models are based on the fact that water molecule diffusion is constrained inside and outside the axons by the cellular membrane (the two compartment theory, which postulates that the cellular membrane is impermeable), while the exact mechanisms leading to anisotropy in neural tissues have not been fully elucidated (Jones et al., 2013; Le Bihan and Johansen-Berg, 2012; Tournier et al., 2011). In particular, the role played by the glial tissue, the vessels, and the active and passive transport of water and larger molecules through the cellular membrane still remains unclear.

None of the validation approaches proposed in humans today provide direct comparison of diffusion tractography with anatomy in the same specimen and at the scale of an entire fiber tract. We used Klingler's dissection to validate diffusion tractography because it provides anatomical data at the macroscale level of the connectome. The aim of our novel approach is to produce a tool to directly compare these anatomical data to MRI data.

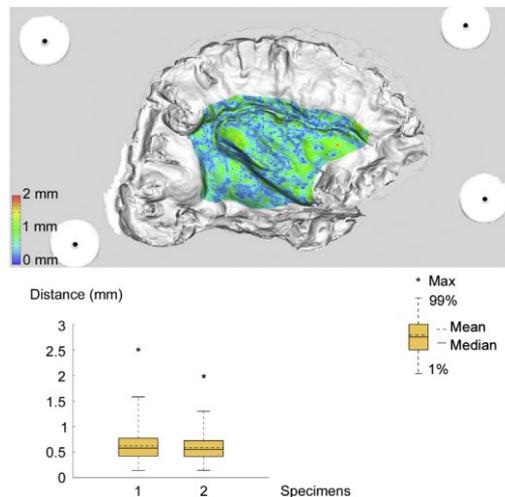


Fig. 9. Surface-to-MRI registration. The registration was assessed for two specimens, on a large zone of white matter exposed by the dissection. A new MRI was performed for each specimen, at the corresponding step of dissection. This MRI was thresholded to extract the specimen surface, which was then coregistered to the laser-acquired surface using the Iterative Closest Point algorithm. *Top panel.* The registration color map is presented for one specimen for the area of interest (white matter) only. *Bottom panel.* The maximum, mean and median values of the distance between laser-acquired and MRI-extracted surfaces are shown for the two specimens. Intervals containing 98% (whiskers) and 50% (range: 25 to 75%) of data (orange box) are also presented.

Anatomical considerations

Historically, human brain diffusion tractography was generally accepted in the community only because it produces roughly the same results as those previously obtained by dissection; an imaging technique providing very different results to dissection would certainly have been rejected. While dissection is still regularly compared to diffusion tractography (Fernandez-Miranda et al., 2012; Kinoshita et al., 2012; Lawes et al., 2008; Martino et al., 2013a), it is no longer always considered as a ground truth, especially in the imaging community, for several reasons. One criticism of Klingler's dissection is its low spatial resolution as compared to histology, PLI or OCT. However, we show that dissection provides a high level of details (see video 1 and Fig. 4), not obtained by diffusion tractography. To obtain this level of resolution, and to consider dissection as a ground truth, great care has to be taken at each step of the process: early extraction of the brain after death, preparation of the specimen with a long fixation time at a low concentration of formalin, a long period of freezing, and careful dissection by a trained anatomist. This high degree of anatomical expertise required to identify white matter bundles and the time needed for accurate dissection are further limitations of Klingler's method. By allowing the iteratively scanned surfaces to be labeled by several anatomists, FIBRASCAN enables white matter tracts to be identified in the same specimen by different operators. A prerequisite for this is obviously to provide

Table 1
Tract reconstruction validation on a simple 3D object (hard-boiled egg).

Indicator	Experimental value	Ideal
Precision	0.869	1
Recall	0.972	1
Dice coefficient	0.918	1
Jaccard coefficient	0.848	1

unambiguous dissection and tract identification rules similar to those proposed for sulco-gyral nomenclature (Destrieux et al., 2010). Dissection and tractography have a similar limitation for ROI/VOI delineation; in both cases, multiple definitions of tracts/ROI are available, leading to variable results. Provision of a clear set of dissection rules would greatly improve the interactive segmentation step of our method by facilitating the identification of fiber bundles and by minimizing inter-operator variability.

Another frequent criticism of Klingler's technique is its supposed inability to detect crossing fibers. When two bundles cross, the anatomist obviously has to choose one tract of interest while destroying the other, so that two crossing bundles cannot be studied completely in the same dissection. For instance, complete dissection of the AF entails partial destruction of crossing fibers connected to the pre- and post-central gyri, i.e. pyramidal and thalamo-cortical tracts (see video 1). Thus, our method cannot reconstruct the entire connectome for a given specimen. However, this is not a major limitation of this technique as a validation tool, which entails focusing on a few non-crossing tracts in each specimen and studying several specimens in order to obtain data for the whole connectome. Indeed, reconstructing tracts from several brains has already been successfully used in other works using autoradiography in the monkey (Schmahmann and Pandya, 2009). Hence, mapping delineated tracts onto a standard brain and generating a tract-based atlas of human white matter from Klingler dissection could be an interesting application of our method.

Klingler's method is also said to be limited to the dense "core" of white matter tracts without any information about their cortical termination. However, it has been used to follow tracts up to the cortex and to study relationships between them, even in regions such as the *stratum sagittale* and temporal stem, where tracts are thin and densely packed (Martino et al., 2009, 2010; Peltier et al., 2010a). FIBRASCAN further helps understand relationships between the dissected tract and the overlying cortex; to obtain a complete white matter tract using traditional dissection, the surrounding cortex has to be destroyed, but with our method it is possible to navigate among the set of surfaces and thus to identify the cortical connections of the tracts precisely by reconstructing them in reverse, from their deep aspects up to the cortex (see video 2).

The limitations of dissection are counterbalanced by the facts that it is currently the only validation method that can be used with human brains without losing the 3D coherence of the fiber tracts, and that no other method directly visualizes the human connectome at a scale comparable to tractography. For instance, PLI (Axer et al., 2011a, 2011b) and OCT (Ben Arous et al., 2011; Goergen et al., 2012; Magnain et al., 2014) are very promising methods, sometimes regarded as "the" validation solutions for tractography. PLI attains a spatial resolution of the order of the micrometer for a given slice or series of neighboring slices. However, because it uses slices, the reconstruction of an entire tract will suffer from a loss of 3D coherence. On the other hand, OCT is theoretically not concerned by slicing, as acquisitions are performed on a volume. Unfortunately, the size of the samples that OCT can explore is currently too small to provide data on an entire hemisphere. Furthermore, even if the problem of sample size is eventually resolved, the depth of exploration of OCT will remain limited, leading to the need for registration steps between samples, and then to reconstruction of white matter tracts with algorithms similar to those used in diffusion tractography. These two methods will be of great importance for the validation of diffusion tractography at the microscale level as they provide greater accuracy (micrometer scale) than dissection (millimeter scale), but they will be less relevant at the macroscale level as they suffer from a loss of 3D coherence during data acquisition.

Finally, as a competing validation method, *ex vivo* diffusion tractography could provide images at a higher spatial resolution than *in vivo* tractography. However, because it is also based on water diffusion along the fibers, it cannot be considered as a ground truth without prior anatomical validation.

Technical considerations

There are two prerequisites for any quantitative comparison of *in vivo* or *ex vivo* tractography and dissection: a common reference space for MRI and dissection, and a method of tract reconstruction from dissection that compensates for the destructiveness of the dissection process. The lack of a quantitative comparison method between tractography and dissection probably led to the feeling that Klingler's method was imprecise, whereas the imprecision stemmed from the evaluation, and not from the dissection process. By providing a common anatomical space, our technique fills the gap between the anatomy laboratory and the MR scanner and is the first step toward a quantitative comparison of the two techniques.

We demonstrated the feasibility of our method on six white matter tracts (SLF/AF subcomponents, IFOF, ILF, UF), but it can of course be applied to other intra-hemispheric association fiber tracts (e.g., Middle Longitudinal Fasciculus, SLF II, Vertical Occipital Fascicle of Wernicke, Frontal Aslant Tract), or to projection fiber tracts (e.g., optic radiations, acoustic radiations, cortico-spinal tract). Moreover, simultaneous acquisition of several non-crossing tracts during the same dissection provides information about their relationships that are not easily studied by traditional dissection methods.

To validate this technique, we demonstrated first that *dissection did not induce deformation* of the anatomical specimen that would have altered the geometry of the reconstructed tract. Mean deformation (0.3 mm) induced by dissection was negligible as compared to the spatial resolution of DW-MRI (1 to 2 mm), to which the results will ultimately be compared. This absence of deformation is not surprising in view of the rigidity of the plastic holder, paraffin- and formalin-fixed brain. The *mean error in surface-to-surface registration was also negligible* (0.1 mm). This was related to the precise localization of fiducial markers by the mechanical probe of the scanner arm, to the absence of relative movement of the specimen fixed on the holder, and to the precision of the laser beam. We then demonstrated that *object reconstruction* (simple object and anatomical specimen) from a stack of segmented surfaces *in the MRI volume* was possible and accurate (0.6 mm). Again, this value has to be compared with the resolution of the 3D T1-weighted MR images we used (1 mm). Surfaces used as a ground truth to evaluate this step were obtained from MRI, with the same resolution. Finally, *the spatial resolution of the method*, which was estimated as the maximum distance between two dissection steps, was 1.8 mm. As Klingler's dissection and tractography used in clinical practice have about the same resolution (order of mm), a comparison between these methods makes sense.

Alternative methods of reconstructing a dissected tract have been proposed. For instance, Kier et al. (2004) performed iterative MRIs of the specimen during dissection and segmented the tract of interest on the surface of the specimen obtained from MRI. Our method provides a higher scanning rate of the specimen, for practical but also cost reasons. Due to the spatial resolution of the MRI (order of 1 mm) and of the laser scanner (order of 0.1 mm), reconstructions obtained from our method are more accurate. Finally, the texture projection in our method considerably improves identification of the tracts on the reconstructed surface.

We do not claim that FIBRASCAN is the only feasible method for tractography validation in the human. It should be regarded as a new tool for this complex task, which can probably only be accomplished by combining several methods. For instance, PLI is accurate at a micro/millimeter scale, while OCT can study white matter tract organization for small brain volumes. Our method could be used to validate tractography at the macroscopic scale, and also to collect small anatomical samples from dissection in critical regions (e.g., crossing regions or cortico-sub-cortical junctions) and compare them to tractography. Combining macro- (dissection) and micro- (PLI/OCT) information would clearly improve efficiency of the validation process; FIBRASCAN could provide precise localization of samples in the MR anatomical

space, while OCT and PLI could provide accurate reconstruction of fibers in these samples at a submillimetric scale.

Atlas of human white matter based on Klingler dissection could also be proposed as an interesting additional application of our method, as discussed above. Nonetheless, although a group-based atlas is very interesting on an anatomical point of view, it is probably not the right tool for tractography validation because of intersubject variability of fiber tracts location and shape. Indeed, this variability can be considerable, leading for example to less than 50% overlap for the anterior cingulum or less than 70% for the UF (Burgel et al., 2006). For this reason, we consider that the best method to correctly validate tractography is to directly compare *in vivo* tractography to the anatomical ground truth, which might be approached by white matter dissection in the same subject.

The novel software we developed as part of the FIBRASCAN set-up is a suite containing different modules for texture projection, surface coregistration, virtual segmentation, surface-MR resampling and registration. We will progressively add functions (such as *in vivo/ex vivo*, comparison between dissection and tractography) before making it available to the community.

The novel technique presented in this article allows accurate acquisition and segmentation of white matter tracts obtained from dissection and their reconstruction in *ex vivo* MR anatomical space. It is the first step toward a quantitative comparison of both *ex vivo* and *in vivo* diffusion tractography with dissection, which is considered as a ground truth. It should be regarded as a complementary rather than a competing approach to other validation techniques studying the connectome at the microscopic level.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.09.016>.

Acknowledgments

We would like to thank Daniel Bourry, photographer at the University of Tours, for his help in choosing photographic devices, light source, and in constructing the photographic installation at our Anatomy laboratory. We are also grateful to Kay Mc Carthy-Cerf, English teacher at the University of Tours, who accepted to record audio commentaries of video 1 available in supplementary data.

This work was supported by General Electric Healthcare, the FEDER (European Regional Development Fund), the préceptif ANR (French National Research Agency) 2012, the SFNC (French Neurosurgery Society) and the IFR (Federative Research Institute) 135 "Imagerie fonctionnelle". We are grateful to FARO Technology Inc. for their technical help.

References

- Alexander, D.C., 2005. Maximum entropy spherical deconvolution for diffusion MRI. *Inf. Process. Med. Imaging* 19, 76–87.
- Axer, H., Axer, M., Krings, T., Keyserlingk, D.G., 2001. Quantitative estimation of 3-D fiber course in gross histological sections of the human brain using polarized light. *J. Neurosci. Methods* 105, 121–131.
- Axer, H., Beck, S., Axer, M., Schuchardt, F., Heepe, J., Flucken, A., Prescher, A., Witte, O.W., 2011a. Microstructural analysis of human white matter architecture using polarized light imaging: views from neuroanatomy. *Front. Neuroinform.* 5, 28.
- Axer, M., Amunts, K., Grassel, D., Palm, C., Dammers, J., Axer, H., Pietrzyk, U., Zilles, K., 2011b. A novel approach to the human connectome: ultra-high resolution mapping of fiber tracts in the brain. *NeuroImage* 54, 1091–1101.
- Basser, P.J., Mattiello, J., LeBihan, D., 1994. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys. J.* 66, 259–267.
- Behrens, T.E., Woolrich, M.W., Jenkinson, M., Johansen-Berg, H., Nunes, R.G., Clare, S., Matthews, P.M., Brady, J.M., Smith, S.M., 2003. Characterization and propagation of uncertainty in diffusion-weighted MR imaging. *Magn. Reson. Med.* 50, 1077–1088.
- Behrens, T.E., Berg, H.J., Jbabdi, S., Rushworth, M.F., Woolrich, M.W., 2007. Probabilistic diffusion tractography with multiple fibre orientations: What can we gain? *NeuroImage* 34, 144–155.
- Ben Arous, J., Binding, J., Leger, J.F., Casado, M., Topilko, P., Gigan, S., Boccard, A.C., Bourdieu, L., 2011. Single myelin fiber imaging in living rodents without labeling by deep optical coherence microscopy. *J. Biomed. Opt.* 16, 116012.
- Besl, P.J., McKay, N.D., 1992. A method for registration of 3-D shapes. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 14, 239–256.
- Burgel, U., Amunts, K., Hoemke, L., Mohlberg, H., Gilsbach, J.M., Zilles, K., 2006. White matter fiber tracts of the human brain: three-dimensional mapping at microscopic resolution, topography and intersubject variability. *NeuroImage* 29, 1092–1105.
- Catani, M., Thiebaut de Schotten, M., 2008. A diffusion tensor imaging tractography atlas for virtual *in vivo* dissections. *Cortex* 44, 1105–1132.
- Catani, M., Howard, R.J., Pajevic, S., Jones, D.K., 2002. Virtual *in vivo* interactive dissection of white matter fasciculi in the human brain. *NeuroImage* 17, 77–94.
- Catani, M., Jones, D.K., Ffytche, D.H., 2005. Perisylvian language networks of the human brain. *Ann. Neurol.* 57, 8–16.
- Chen, B., Song, A.W., 2008. Diffusion tensor imaging fiber tracking with local tissue property sensitivity: phantom and *in vivo* validation. *Magn. Reson. Imaging* 26, 103–108.
- Dammers, J., Axer, M., Grassel, D., Palm, C., Zilles, K., Amunts, K., Pietrzyk, U., 2010. Signal enhancement in polarized light imaging by means of independent component analysis. *NeuroImage* 49, 1241–1248.
- D'Arceuil, H., de Crespigny, A., 2007. The effects of brain tissue decomposition on diffusion tensor imaging and tractography. *NeuroImage* 36, 64–68.
- D'Arceuil, H.E., Westmoreland, S., de Crespigny, A.J., 2007. An approach to high resolution diffusion tensor imaging in fixed primate brain. *NeuroImage* 35, 553–565.
- Dauguet, J., Peled, S., Berezovskii, V., Delzescaux, T., Warfield, S.K., Born, R., Westin, C.F., 2007. Comparison of fiber tracts derived from *in-vivo* DTI tractography with 3D histological neural tract tracer reconstruction on a macaque brain. *NeuroImage* 37, 530–538.
- Déjerine, J.J., Déjerine-Klumpke, A., 1895. *Anatomie des centres nerveux*. Rueff, Paris.
- Destrieux, C., Fischl, B., Dale, A., Halgren, E., 2010. Automatic parcellation of human cortical gyri and sulci using standard anatomical nomenclature. *NeuroImage* 53, 1–15.
- Dice, L., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26, 297–302.
- Dyrby, T.B., Sogaard, L.V., Parker, G.J., Alexander, D.C., Lind, N.M., Baare, W.F., Hay-Schmidt, A., Eriksen, N., Pakkenberg, B., Paulson, O.B., Jelsing, J., 2007. Validation of *in vitro* probabilistic tractography. *NeuroImage* 37, 1267–1277.
- Dyrby, T.B., Baare, W.F.C., Alexander, D.C., Jelsing, J., Garde, E., Sogaard, L.V., 2011. An *ex vivo* imaging pipeline for producing high-quality and high-resolution diffusion-weighted imaging datasets. *Hum. Brain Mapp.* 32, 544–563.
- Everitt, C., 2001. Projective Texture Mapping. NVIDIA Corporation.
- Fernandez-Miranda, J.C., Pathak, S., Engh, J., Jarbo, K., Verstynen, T., Yeh, F.C., Wang, Y., Mintz, A., Boada, F., Schneider, W., Friedlander, R., 2012. High-definition fiber tractography of the human brain: neuroanatomical validation and neurosurgical applications. *Neurosurgery* 71, 430–453.
- Fillard, P., Descoteaux, M., Goh, A., Gouttard, S., Jeurissen, B., Malcolm, J., Ramirez-Manzanares, A., Reisert, M., Sakaie, K., Tensaouti, F., Yo, T., Mangin, J.F., Poupon, C., 2011. Quantitative evaluation of 10 tractography algorithms on a realistic diffusion MR phantom. *NeuroImage* 56, 220–234.
- Goergen, C.J., Radhakrishnan, H., Sakadzic, S., Mandeville, E.T., Lo, E.H., Sosnovik, D.E., Srinivasan, V.J., 2012. Optical coherence tractography using intrinsic contrast. *Opt. Lett.* 37, 3882–3884.
- Hubbard, P.L., Parker, G.J.M., 2009. Validation of tractography. In: Johansen-Berg, H., Behrens, T.E.J. (Eds.), *Diffusion MRI: From Quantitative Measurement to In-vivo Neuroanatomy*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 353–375.
- Jaccard, P., 1901. Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la société Vaudoise des sciences naturelles* 37, pp. 241–272.
- Jain, A., 1986. In: Kallath, T. (Ed.), *Fundamentals of Digital Image Processing*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, p. 387.
- Jones, D.K., Knösche, T.R., Turner, R., 2013. White matter integrity, fiber count, and other fallacies: the do's and don'ts of diffusion MRI. *NeuroImage* 73, 239–254.
- Kier, E.L., Staib, L.H., Davis, L.M., Bronen, R.A., 2004. Anatomic dissection tractography: a new method for precise MR localization of white matter tracts. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 25, 670–676.
- Kinoshita, M., Yamada, K., Hashimoto, N., Kato, A., Izumoto, S., Baba, T., Maruno, M., Nishimura, T., Yoshimine, T., 2005. Fiber-tracking does not accurately estimate size of fiber bundle in pathological condition: initial neurosurgical experience using neuronavigation and subcortical white matter stimulation. *NeuroImage* 25, 424–429.
- Kinoshita, M., Shimohara, H., Hori, O., Ozaki, N., Ueda, F., Nakada, M., Hamada, J., Hayashi, Y., 2012. Association fibers connecting the Broca center and the lateral superior frontal gyrus: a microsurgical and tractographic anatomy. *J. Neurosurg.* 116, 323–330.
- Klingler, J., 1935. Erleichterung der makroskopischen Präparation des Gehirns durch den Gefrierprozess. *Schweiz. Arch. Neurol. Psychiatr.* 36, 247–256.
- Klingler, J., Gloor, P., 1960. The connections of the amygdala and of the anterior temporal cortex in the human brain. *J. Comp. Neurol.* 115, 333–369.
- Latt, J., Nilsson, M., Rydhog, A., Wirestam, R., Stahlberg, F., Brockstedt, S., 2007. Effects of restricted diffusion in a biological phantom: a q-space diffusion MRI study of asparagus stems at a 3T clinical scanner. *MAGMA* 20, 213–222.
- Lawes, I.N., Barrick, T.R., Murugam, V., Spierings, N., Evans, D.R., Song, M., Clark, C.A., 2008. Atlas-based segmentation of white matter tracts of the human brain using diffusion tensor tractography and comparison with classical dissection. *NeuroImage* 39, 62–79.
- Le Bihan, D., Breton, E., 1985. Imagerie de diffusion *in-vivo* par résonance magnétique nucléaire. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 301, 1109–1112.
- Le Bihan, D., Johansen-Berg, H., 2012. Diffusion MRI at 25: exploring brain tissue structure and function. *NeuroImage* 61, 324–341.
- Lin, C.P., Tseng, W.Y., Cheng, H.C., Chen, J.H., 2001. Validation of diffusion tensor magnetic resonance axonal fiber imaging with registered manganese-enhanced optic tracts. *NeuroImage* 14, 1035–1047.
- Lin, C.P., Wedeen, V.J., Chen, J.H., Yao, C., Tseng, W.Y., 2003. Validation of diffusion spectrum magnetic resonance imaging with manganese-enhanced rat optic tracts and *ex vivo* phantoms. *NeuroImage* 19, 482–495.
- Ludwig, E., Klingler, J., 1956. *Atlas humani cerebri*. Karger, S. Basel, New York.

- Magnain, C., Augustinack, J.C., Reuter, M., Wachinger, C., Frosch, M.P., Ragan, T., Akkin, T., Wedeen, V.J., Boas, D.A., Fischl, B., 2014. Blockface histology with optical coherence tomography: a comparison with Nissl staining. *Neuroimage* 84, 524–533.
- Makris, N., Papadimitriou, G.M., Kaiser, J.R., Sorg, S., Kennedy, D.N., Pandya, D.N., 2009. Delineation of the middle longitudinal fascicle in humans: a quantitative, in vivo, DT-MRI study. *Cereb. Cortex* 19, 777–785.
- Martino, J., Brogna, C., Robles, S.G., Vergani, F., Duffau, H., 2009. Anatomic dissection of the inferior fronto-occipital fasciculus revisited in the lights of brain stimulation data. *Cortex* 46, 691–699.
- Martino, J., Vergani, F., Robles, S.G., Duffau, H., 2010. New insights into the anatomic dissection of the temporal stem with special emphasis on the inferior fronto-occipital fasciculus: implications in surgical approach to left mesiotemporal and temporoinular structures. *Neurosurgery* 66, 4–12.
- Martino, J., da Silva-Freitas, R., Caballero, H., Marco de Lucas, E., Garcia-Porrero, J.A., Vazquez-Barquero, A., 2013a. Fiber dissection and diffusion tensor imaging tractography study of the temporoparietal fiber intersection area. *Neurosurgery* 72, 87–97 (discussion 97–88).
- Martino, J., De Witt Hamer, P.C., Berger, M.S., Lawton, M.T., Arnold, C.M., de Lucas, E.M., Duffau, H., 2013b. Analysis of the subcomponents and cortical terminations of the perisylvian superior longitudinal fasciculus: a fiber dissection and DTI tractography study. *Brain Struct. Funct.* 218, 105–121.
- Mesulam, M.M., 1979. Tracing neural connections of human brain with selective silver impregnation. Observations on geniculocalcarine, spinothalamic, and entorhinal pathways. *Arch. Neurol.* 36, 814–818.
- Mori, S., van Zijl, P.C., 2002. Fiber tracking: principles and strategies — a technical review. *NMR Biomed.* 15, 468–480.
- Mori, S., Kaufmann, W.E., Davatzikos, C., Stieltjes, B., Amodei, L., Fredericksen, K., Pearlson, G.D., Melhem, E.R., Solaiyappan, M., Raymond, G.V., Moser, H.W., van Zijl, P.C., 2002. Imaging cortical association tracts in the human brain using diffusion-tensor-based axonal tracking. *Magn. Reson. Med.* 47, 215–223.
- Mori, S., Oishi, K., Jiang, H., Jiang, L., Li, X., Akhter, K., Hua, K., Faria, A.V., Mahmood, A., Woods, R., Toga, A.W., Pike, G.B., Neto, P.R., Evans, A., Zhang, J., Huang, H., Miller, M.L., van Zijl, P., Mazziotta, J., 2008. Stereotaxic white matter atlas based on diffusion tensor imaging in an ICBM template. *Neuroimage* 40, 570–582.
- Nimsky, C., Ganslandt, O., Hastreiter, P., Wang, R., Benner, T., Sorensen, A.G., Fahlbusch, R., 2005. Intraoperative diffusion-tensor MR imaging: shifting of white matter tracts during neurosurgical procedures—initial experience. *Radiology* 234, 218–225.
- Nimsky, C., Ganslandt, O., Merhof, D., Sorensen, A.G., Fahlbusch, R., 2006. Intraoperative visualization of the pyramidal tract by diffusion-tensor-imaging-based fiber tracking. *Neuroimage* 30, 1219–1229.
- Oishi, K., Zilles, K., Amunts, K., Faria, A., Jiang, H., Li, X., Akhter, K., Hua, K., Woods, R., Toga, A.W., Pike, G.B., Rosa-Neto, P., Evans, A., Zhang, J., Huang, H., Miller, M.L., van Zijl, P.C., Mazziotta, J., Mori, S., 2008. Human brain white matter atlas: identification and assignment of common anatomical structures in superficial white matter. *Neuroimage* 43, 447–457.
- Palm, C., Axer, M., Grassel, D., Dammers, J., Lindemeyer, J., Zilles, K., Pietrzyk, U., Amunts, K., 2010. Towards ultra-high resolution fibre tract mapping of the human brain — registration of polarised light images and reorientation of fibre vectors. *Front. Hum. Neurosci.* 4, 9.
- Parker, G.J., Alexander, D.C., 2005. Probabilistic anatomical connectivity derived from the microscopic persistent angular structure of cerebral tissue. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 893–902.
- Peltier, J., Travers, N., Destrieux, C., Velut, S., 2006. Optic radiations: a microsurgical anatomical study. *J. Neurosurg.* 105, 294–300.
- Peltier, J., Vercluyte, S., Delmaire, C., Pruvo, J.P., Godefroy, O., Le Gars, D., 2010a. Microsurgical anatomy of the temporal stem: clinical relevance and correlations with diffusion tensor imaging fiber tracking. *J. Neurosurg.* 122, 1033–1038.
- Peltier, J., Vercluyte, S., Delmaire, C., Deramond, H., Pruvo, J.P., Le Gars, D., Godefroy, O., 2010b. Microsurgical anatomy of the ventral callosal radiations: new destination, correlations with diffusion tensor imaging fiber-tracking, and clinical relevance. *J. Neurosurg.* 112, 512–519.
- Perrin, M., Poupon, C., Rieul, B., Leroux, P., Constantinesco, A., Mangin, J.F., Lebihan, D., 2005. Validation of q-ball imaging with a diffusion fibre-crossing phantom on a clinical scanner. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 881–891.
- Poupon, C., Rieul, B., Kezele, I., Perrin, M., Poupon, F., Mangin, J.F., 2008. New diffusion phantoms dedicated to the study and validation of high-angular-resolution diffusion imaging (HARDI) models. *Magn. Reson. Med.* 60, 1276–1283.
- Pullens, P., Roebroeck, A., Goebel, R., 2010. Ground truth hardware phantoms for validation of diffusion-weighted MRI applications. *J. Magn. Reson. Imaging* 32, 482–488.
- Rosene, D.L., Roy, N.J., Davis, B.J., 1986. A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *J. Histochem. Cytochem.* 34, 1301–1315.
- Schmahmann, J.D., Pandya, D., 2009. *Fiber Pathways of the Brain*. Oxford University Press.
- Schmahmann, J.D., Pandya, D.N., Wang, R., Dai, G., D'Arceuil, H.E., de Crespigny, A.J., Wedeen, V.J., 2007. Association fibre pathways of the brain: parallel observations from diffusion spectrum imaging and autoradiography. *Brain* 130, 630–653.
- Serres, B., Zemmoura, I., Andersson, F., Tauber, C., Destrieux, C., Venturini, G., 2013. Brain virtual dissection and white matter 3D visualization. *Stud. Health Technol. Inform.* 184, 392–396.
- Sparks, D.L., Lue, L.F., Martin, T.A., Rogers, J., 2000. Neural tract tracing using Di-I: a review and a new method to make fast Di-I faster in human brain. *J. Neurosci. Methods* 103, 3–10.
- Stieltjes, B., Kaufmann, W.E., van Zijl, P.C., Fredericksen, K., Pearlson, G.D., Solaiyappan, M., Mori, S., 2001. Diffusion tensor imaging and axonal tracking in the human brainstem. *Neuroimage* 14, 723–735.
- Tournier, J.D., Calamante, F., Gadian, D.G., Connelly, A., 2004. Direct estimation of the fiber orientation density function from diffusion-weighted MRI data using spherical deconvolution. *Neuroimage* 23, 1176–1185.
- Tournier, J.-D., Mori, S., Leemans, A., 2011. Diffusion tensor imaging and beyond. *Magn. Reson. Med.* 65, 1532–1556.
- Tuch, D.S., Reese, T.G., Wiegell, M.R., Makris, N., Belliveau, J.W., Wedeen, V.J., 2002. High angular resolution diffusion imaging reveals intravoxel white matter fiber heterogeneity. *Magn. Reson. Med.* 48, 577–582.
- Wakana, S., Jiang, H., Nagae-Poetscher, L.M., van Zijl, P.C., Mori, S., 2004. Fiber tract-based atlas of human white matter anatomy. *Radiology* 230, 77–87.
- Wang, H., Black, A.J., Zhu, J., Stigen, T.W., Al-Qaisi, M.K., Netoff, T.L., Abosch, A., Akkin, T., 2011. Reconstructing micrometer-scale fiber pathways in the brain: multi-contrast optical coherence tomography based tractography. *Neuroimage* 58, 984–992.
- Yanasak, N., Allison, J., 2006. Use of capillaries in the construction of an MRI phantom for the assessment of diffusion tensor imaging: demonstration of performance. *Magn. Reson. Imaging* 24, 1349–1361.
- Yu, C.S., Li, K.C., Xuan, Y., Ji, X.M., Qin, W., 2005. Diffusion tensor tractography in patients with cerebral tumors: a helpful technique for neurosurgical planning and postoperative assessment. *Eur. J. Radiol.* 56, 197–204.

Annexe 2 : Deuxième contribution — How Klingler's dissection permits exploration of brain structural connectivity? An electron microscopy study of human white matter (2015) *Brain Structure and Function*.

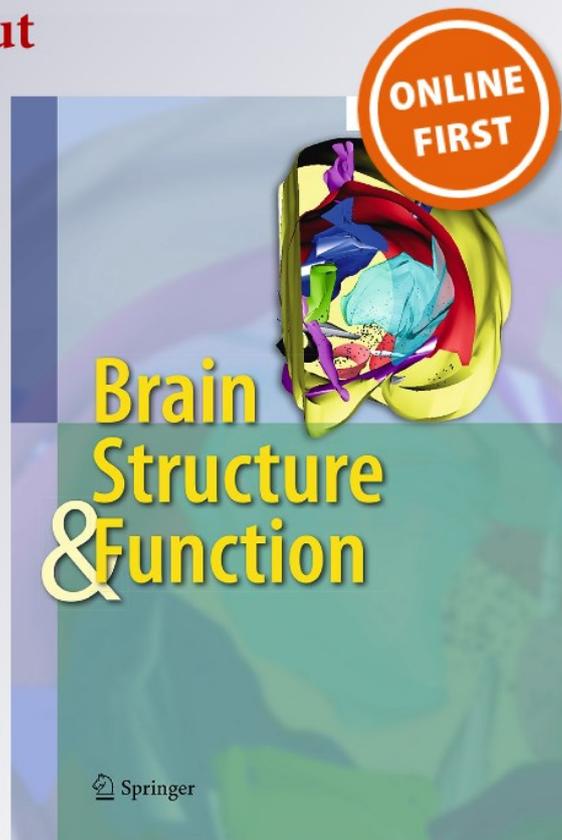
How Klingler's dissection permits exploration of brain structural connectivity? An electron microscopy study of human white matter

Ilyess Zemmoura, Emmanuelle Blanchard, Pierre-Ivan Raynal, Cécilia Rousselot-Denis, Christophe Destrieux & Stéphane Velut

Brain Structure and Function

ISSN 1863-2653

Brain Struct Funct
DOI 10.1007/s00429-015-1050-7



 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



How Klingler's dissection permits exploration of brain structural connectivity? An electron microscopy study of human white matter

Ilyess Zemmoura^{1,2} · Emmanuelle Blanchard^{3,4} · Pierre-Ivan Raynal^{3,4} · Cécilia Rousselot-Denis⁵ · Christophe Destrieux^{1,2} · Stéphane Velut^{1,2}

Received: 31 March 2015 / Accepted: 20 April 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The objective of this study is to explore histological and ultrastructural changes induced by Klingler's method. Five human brains were prepared. First, the effects of freezing–defrosting on white matter were explored with optical microscopy on corpus callosum samples of two brains; one prepared in accordance with the description of Klingler (1956) and the other without freezing–defrosting. Then, the combined effect of formalin fixation and freezing–defrosting was explored with transmission electron microscopy (EM) on samples of cingulum from one brain: samples from one hemisphere were fixed in paraformaldehyde–glutaraldehyde (para/gluta), other samples from the other hemisphere were fixed in formalin; once fixed, half of the samples were frozen–defrosted. Finally, the effect of dissection was explored from three formalin-fixed brains: one hemisphere of each brain was frozen–defrosted; samples of the corpus callosum were dissected before preparation for scanning EM. Optical microscopy showed enlarged extracellular space on frozen samples. Transmission EM showed no significant alteration of white matter

ultrastructure after formalin or para/gluta fixation. Freezing–defrosting created extra-axonal lacunas, larger on formalin-fixed than on para/gluta-fixed samples. In all cases, myelin sheaths were preserved, allowing maintenance of axonal integrity. Scanning EM showed the destruction of most of the extra-axonal structures after freezing–defrosting and the preservation of most of the axons after dissection. Our results are the first to highlight the effects of Klingler's preparation and dissection on white matter ultrastructure. Preservation of myelinated axons is a strong argument to support the reliability of Klingler's dissection to explore the structure of human white matter.

Keywords White matter · Electron microscopy · Histology · Dissection · Diffusion tractography · Axons · Myelin sheath · Ultrastructure

Introduction

Historical anatomical methods to study human white matter anatomy are anatomopathology, i.e., study of secondary degeneration of fibers from serial sections of damaged brains, and developmental anatomy, i.e., study of the emergence of myelinated fibers from serial sections of developing brains (for a review see Dejerine and Dejerine-Klumpke 1895). Klingler's method, the original technique for blunt dissection of white matter tracts (Ludwig and Klingler 1956) studies specimens after formalin fixation, freezing and defrosting. It was neglected for a long time and received renewed attention following the development of MR tractography. Since then, published dissection studies have used such a freezing–defrosting step (Ture et al. 2000; Peuskens et al. 2004; Peltier et al. 2006; Fernandez-Miranda et al. 2008; Martino et al. 2010; Kinoshita

✉ Ilyess Zemmoura
ilyess.zemmoura@univ-tours.fr

¹ INSERM, Imagerie et cerveau UMR U930, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

² Service de Neurochirurgie, CHRU de Tours, CHRU Bretonneau, 2, Boulevard Tonnellé, 37044 Tours Cedex 9, France

³ INSERM U966, Université François-Rabelais and CHRU de Tours, Tours, France

⁴ Plateforme des microscopies, PPF ASB, Université François-Rabelais and CHRU de Tours, Tours, France

⁵ Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHRU de Tours, Tours, France

et al. 2012; Maldonado et al. 2013; Sarubbo et al. 2013), although no study has explored the consequences of this preparation on white matter microstructure. One of the major concerns about using Klingler's method is indeed that it is unclear how freezing and defrosting may help accurately separate fibers along their main direction, and separate tracts from the surrounding white matter. Josef Klingler stated (Klingler 1935; Ludwig and Klingler 1956), 'the aqueous formol solution does not penetrate the myelinated nerve fibers, or only little; it is to be found much more between the fibers, and the main masses of ice crystals arise in the latter location. Since water increases 10 % in volume with the formation of ice, the fibers are somewhat spread apart. It is this loosening of the tissue, which not only makes following of fine fiber bundles easier, but also in fact makes it possible at all' This has nevertheless never been demonstrated, probably explaining the low trust that a part of the Neuroscience community places in fiber dissection.

To demonstrate whether formalin fixation and freezing–defrosting induce a separation of the fibers between the axons, and whether they alter cellular membranes, intra- or extracellular spaces, or myelin sheaths, we propose to explore the effects of (1) freezing/defrosting, (2) tissue fixation, and (3) dissection, on white matter ultrastructure. This work is the first to provide data on the impact of brain preparation for Klingler's method on the ultrastructure of human brain white matter.

Materials and methods

Five human brains obtained from the body donation program of the University of Tours, France were prepared for our study. Brains were extracted maximum 24 h after death to avoid decomposition.

Effect of freezing–defrosting on white matter histology

Two brains were immersed in formalin (formaldehyde solution at 37 % m/m, Cooper, Melun, France) diluted in tap water to obtain a formalin concentration of 5 %, as proposed in Klingler's description of the method (Ludwig and Klingler 1956). The fluid was renewed after 24 h and after 2 weeks. After a total duration of fixation of 3 months, one of these two specimens was drained and frozen for 3 weeks at -23 °C. It was then slowly defrosted in a new 5 % formalin solution for 3–5 days. The other specimen was not frozen. A median sagittal section was then performed along the corpus callosum, and samples of corpus callosum, which has well-known fiber orientation, were taken for histology. They were embedded in paraffin, sliced (3 μ m

thick), hematoxylin–eosin–safran (HES) stained, and observed under light microscopy. Sections were performed along and across the main direction of fibers of the corpus callosum and studied at magnifications of 10 \times .

Combined effect of freezing–defrosting and paraformaldehyde/glutaraldehyde (para/gluta) versus formalin fixation

Two fixation methods were compared under electron microscopy (EM) on one human brain, with regard to shrinkage on sections and to know whether the loss of cell structure integrity is due to the fixation reagent or to the addition of a freezing–defrosting cycle. Four samples of 2 cm³ of both the right and left anterior cingulate gyri, which have easily identifiable fiber orientation, were taken prior to fixation. For each hemisphere, two samples were immersed in a solution of formaldehyde 4 % w/v buffered at pH 6.9 (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France) and two other samples in para/gluta, a widely used fixative for EM (4 % paraformaldehyde and 1 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2). Only one of the formalin-fixed samples and one of the para/gluta-fixed samples were frozen–defrosted. All the samples were thereafter prepared for transmission electron microscopy (TEM) as follows. Previously fixed samples were washed in phosphate-buffered saline (PBS), post-fixed by incubation for 1 h with 2 % osmium tetroxide and dehydrated in a graded series of ethanol solutions. Samples were embedded in Epon resin (Sigma), which was allowed to polymerize for 48 h at 60 °C. Ultrathin sections (90 nm) of these blocks were obtained with a Leica EM UC7 ultramicrotome (Wetzlar, Germany). Sections were deposited on formvar/carbon-coated nickel grids and stained with 5 % uranyl acetate, 5 % lead citrate. Observations were performed on a JEOL JEM-1011 TEM operated at 120 kV. Seventy-nine TEM images were acquired on these samples using a GATAN ES1000 W Erlangshen CCD camera.

Effect of dissection on white matter ultrastructure with and without freezing–defrosting

Three extracted brains were immersed for 3 months in a buffered 4 % formalin solution (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France) and the fluid was renewed after 24 h and after 2 weeks. After fixation, brains were sagittally split at the midline, and only one hemisphere of each brain was frozen for 2 weeks at -23 °C; then defrosted for 5 days in the buffered 4 % formalin solution. To avoid any influence of the anatomical location on ultrastructure, one sample was taken in the same region of the corpus callosum for each of these six hemispheres: each sample was 3 cm long

to allow further dissection and was obtained from the body of the corpus callosum, just caudal to the genu. These samples were then “dissected” using the same wooden tools as used to raise fiber bundles during fiber dissection. Fibers were removed at the surface of the specimen, so that the surface of the samples allowed a direct view of the fibers and their orientation (Fig. 1).

A small anterior and mesial sample of each dissected sample was then prepared for scanning electron microscopy (SEM) as follows. Samples that had been previously formalin fixed and dissected were washed in PBS and post-fixed by incubation with 2 % osmium tetroxide for 1 h. Samples were then fully dehydrated in a graded series of ethanol solutions and dried in hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma, St-Louis, MO). Finally, the dry samples were glued onto SEM stubs using conductive carbon cement and coated with a 40–50 Å platinum layer, with a JEOL JUC-5000 sputtering system. Observations were performed using a ZEISS Ultra plus FEG-SEM (Oberkochen, Germany). Finally, 168 SEM images were acquired for longitudinal and transversal views.

Results

Optical microscopy of the white matter—influence of freezing/defrosting

Optical microscopy after HES staining provided limited information about white matter microstructure. Nonetheless, the global orientation of fibers appeared clearly, as did the difference between unfrozen and frozen samples (Fig. 2). The freezing–defrosting sequence enlarged the extracellular space between fibers to create lacunas, giving

the specimen a honeycomb-shaped structure on transversal sections. On longitudinal sections, these lacunas separated fibers in parallel bundles, which seemed to preserve fiber orientation. Some fibers were interrupted, but the method did not allow to precise whether these interruptions were consecutive to the lacunas themselves or to the sample slicing.

Formalin fixation did not alter white matter ultrastructure

When comparing the effects of formalin versus para/gluta fixation under TEM, both methods preserved cellular components including glial cell nuclei (Fig. 3, yellow arrowheads) with few noticeable differences in extra-axonal structures. Indeed, we only observed a better preservation of euchromatin after para/gluta fixation, i.e., euchromatin was more osmiophilic after para/gluta than after formalin fixation. By contrast, myelin sheaths and intra-axonal structures were fairly well preserved after both methods of fixation. On unfrozen samples, electron micrographs showed numerous myelinated axons of varying sizes with both fixation methods. Nevertheless, the compactness of myelin sheaths differed between axons, irrespective of the axonal diameter or thickness of myelin sheaths. High magnification EM images showed myelinated axons with preserved subcellular organelles, such as microtubules, neurofilaments and a few mitochondria (Fig. 4).

Freezing–defrosting altered extra-axonal space but preserved myelin sheaths

TEM also showed extra-axonal lacunas after freezing–defrosting of cingulum samples. Lacunas were larger

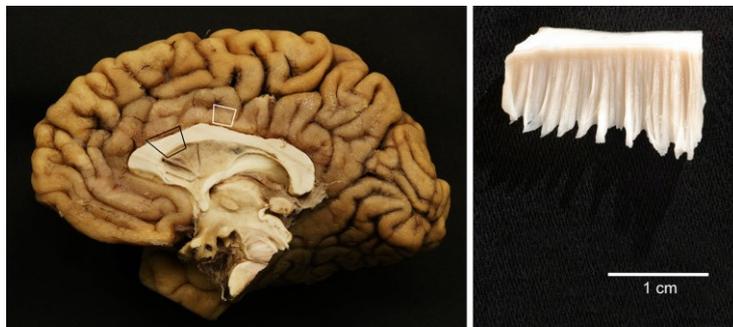


Fig. 1 Location of white matter sampling sites in the cingulum and corpus callosum. *Left panel* macrophotograph of the mesial surface of a right human hemisphere prepared with Klingler’s method (formalin fixation, freezing–defrosting). Sampling sites are delineated in *black* (anterior portion of the body of the corpus callosum) and *white* (body

of the cingulum). *Right panel* macrophotograph of a “dissected” sample of corpus callosum from a frozen–defrosted human brain. The size of the sample allowed it to be easily orientated before preparation for longitudinal and transversal views with electron microscopy

Fig. 2 Optical microscopy of human corpus callosum. Hematoxylin–eosin–safran (HES) staining of human corpus callosum with optical magnification $\times 10$. Transversal sections of axons before and after freezing–defrosting showed the emergence of lacunas (*arrowheads*) between fibers after freezing, which produced a honeycomb-shaped structure. On longitudinal sections, the same lacunas appeared on frozen–defrosted but not unfrozen samples. Lacunas respected fiber orientation

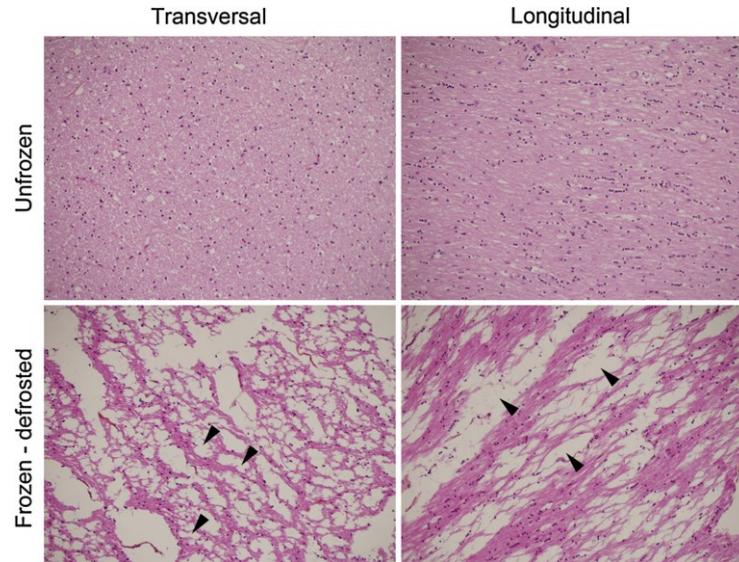
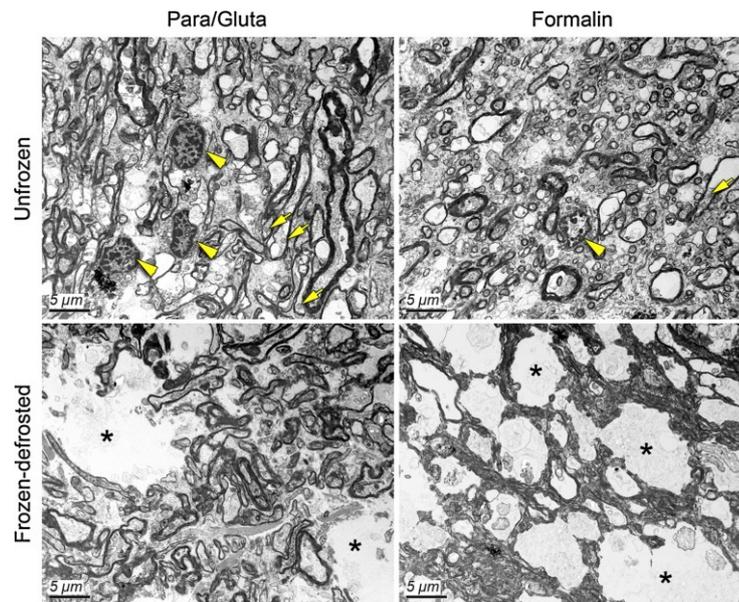


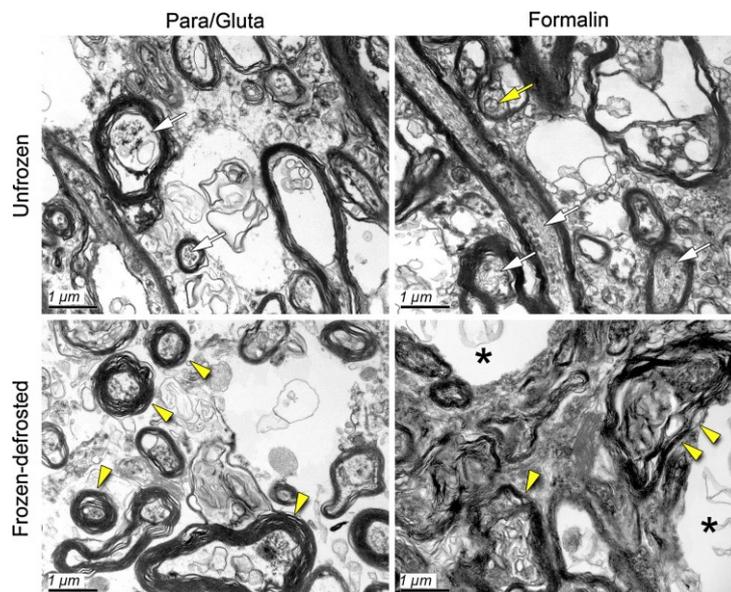
Fig. 3 Transmission electron micrographs of human cingulum samples. White matter ultrastructure was well preserved after both *para*/*gluta* and formalin fixation. Nuclear chromatin of glial cells was identifiable on unfrozen samples (*yellow arrowheads*) as well as mitochondria (*yellow arrows*). Euchromatin appeared darker, i.e. more osmiophilic, on *para*/*gluta*- than on formalin-fixed samples. The difference between the two fixatives was much greater after freezing–defrosting: extracellular lacunas (*asterisks*) were more numerous in formalin-fixed than in *para*/*gluta*-fixed samples. Magnification = $\times 4000$, bars 5 μm



for formalin-fixed than for *para*/*gluta*-fixed samples (Fig. 3, bottom row). Although membrane alterations made it difficult to identify the exact location of

lacunas, it was obvious that they were located between myelinated axons, and that they respected fiber orientation (Fig. 4).

Fig. 4 High magnification transmission electron micrographs of human cingulum samples. Cellular components were relatively well preserved after para/gluta and formalin fixation. Intra-axonal neurofilaments and microtubules (*white arrows*), and mitochondria (*yellow arrows*) were identifiable. After freezing–defrosting, the greater extracellular lacunas induced a greater compaction of extracellular matrix in formalin-fixed than in para/gluta-fixed samples. Myelin was somewhat decompressed (*yellow arrowheads*) after freezing–defrosting of formalin-fixed samples but it still ensheathed axon fibers and was not broken by the lacunas. Magnification = $\times 25,000$, bars 1 μm



After freezing–defrosting, myelin sheaths looked less compact, with variable splitting and swelling, especially when formalin was used for fixation (Fig. 4). When formalin-fixed samples were frozen–defrosted, myelin sheaths showed huge and more numerous laminated structures with increased spaces between sheaths and a greater compaction of extra-axonal components resulting in osmiophilic structures, i.e., dark compact structures between lacunas. Nevertheless, these myelin sheaths appeared partially preserved despite freezing–defrosting, since they were uninterrupted by lacunas (Fig. 4).

Klingler's dissection preserved axonal structure

The surface of dissected samples of corpus callosum was observed under SEM after superficial fibers had been removed. On unfrozen samples, fibers were very compact and intermingled with both round and linear structures transversally oriented in relation to the direction of the main axons (Fig. 5, top right panel). As corpus callosum does not contain axonal cell bodies, and as axons are parallelly oriented inside corpus callosum, these structures might correspond to glial cell bodies and processes.

Freezing–defrosting created lacunas splitting the corpus callosum into bundles of axons, nicely seen on longitudinal (Fig. 5) and transverse (Fig. 6) views, similar to the honeycomb pattern observed under optical microscopy.

Longitudinal views identified trenches and edges created by the raising of fiber bundles during dissection. The structure of observed fibers (namely, the fibers left in place after dissection) was nevertheless globally preserved (Fig. 6), except the glial cell bodies and processes, which were not identifiable on frozen samples.

Discussion

Electron microscopy provides new evidence for the effects of Klingler's preparation and dissection on white matter

Here, we present the first study exploring the impact of Klingler's method on human white matter using optic and electron microscopy. We deliberately chose to limit this study to two easily identified bundles (corpus callosum and cingulum) composed of parallel fibers of well-known direction. It would of course be more difficult to follow changes related to specimen preparation on less well-organized or oriented tracts. We found that corpus callosum and cingulum extracellular ultrastructure was altered after formalin fixation, and that these changes increased dramatically after freezing–defrosting. This step of specimen preparation indeed created interaxonal lacunas which may thus facilitate fiber bundles dissection while preserving their orientation.

Fig. 5 Scanning electron micrographs of formalin-fixed human corpus callosum samples. Longitudinal views of the surface of a ‘dissected’ sample, before and after freezing–defrosting, at $\times 100$ (left column) and $\times 2000$ (right column) magnification. Dissection creates edges and trenches after fiber bundles have been raised. Transversally oriented glial cell processes (arrowheads) and glial cell bodies (asterisk) were easily identifiable on the unfrozen sample but almost disappeared after freezing–defrosting. Left column bars 100 μm , right column bars 10 μm

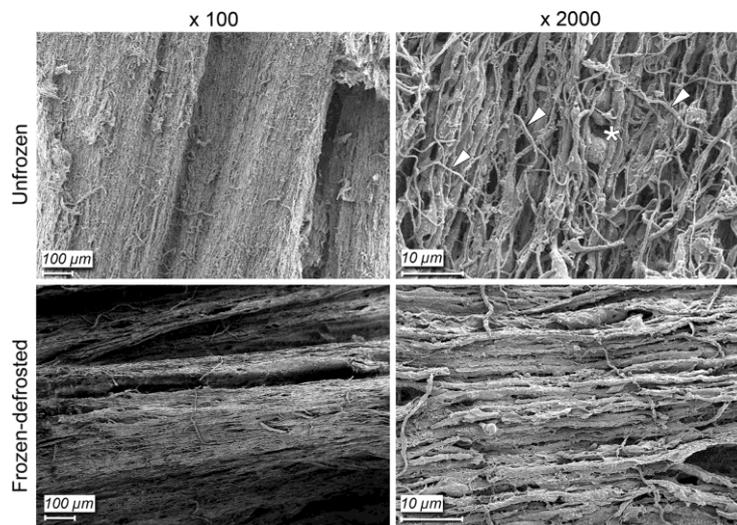
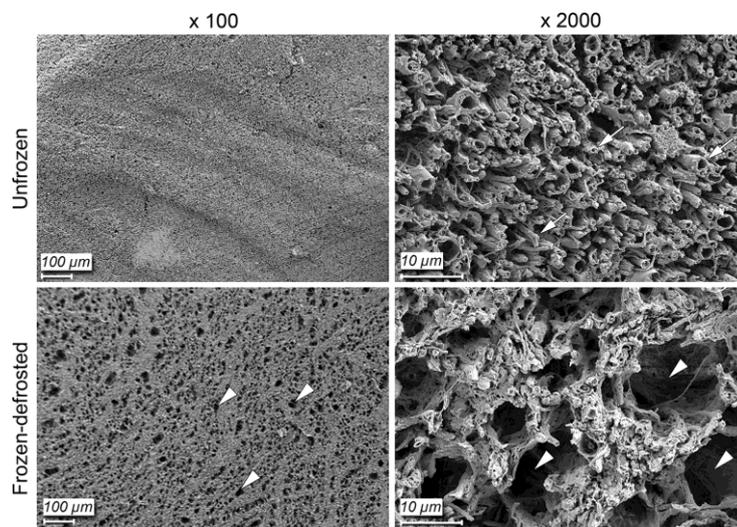


Fig. 6 Scanning electron micrographs of formalin-fixed human corpus callosum samples. Transversal views, before and after freezing–defrosting, at $\times 100$ (left column) and $\times 2000$ (right column) magnification. Before freezing, we can observe myelinated axons of different calibers (arrows). After freezing–defrosting, we can observe the lacunas created by freezing–defrosting (arrowheads) between axons. Left column bars 100 μm , right column bars 10 μm



A second factor helping dissection is the relative preservation of the myelin sheaths when using Klingler’s preparation. These sheaths lining the axons were indeed preserved by formalin fixation and only appeared less compact after freezing–defrosting. They nevertheless remained easily identifiable using both TEM and SEM techniques and may act as “guides” during fiber dissection.

Indeed, even if it has been shown that both neurons and glial cells are very soft (Lu et al. 2006), recent works have demonstrated that demyelination significantly lowers axonal stiffness and ultimate tensile stress (Shreiber et al. 2008). It is then probable that myelin sheaths mechanically protect axons both during Klingler’s preparation and dissection.

Finally, dissection was also helped by the destruction of the transversally oriented and round structures, which were visible on the unfrozen samples only. These elements, which joined adjacent axons may, respectively, correspond to macroglial (fibrous astrocytes and oligodendrocytes) and microglial cell processes and bodies. Whatever their origin, these transversal processes acted as bridges between myelin sheaths, and their destruction may facilitate dissection. After “dissecting” and removing superficial fibers of a previously frozen–defrosted specimen, SEM also demonstrated that the fibers left in place kept their natural parallel organization.

In other words, the well-known facilitating effect of freezing–defrosting on dissection may be regarded as the consequence of the two changes induced by Klingler’s preparation—creation of inter-axon lacunas and destruction of inter-myelin bridges—together with the preservation of axons, thanks to the protective role of myelin sheaths. It also preserves the direction of the fibers, the method proposed by Klingler being only prone to remove fibers along their main direction. If, for example, fibers had been destroyed by Klingler’s method, this would have artificially created false fiber bundles. Fortunately, myelin, which ensheathes axons and is known to provide long-term integrity of axons *in vivo* (Nave 2010), remains well organized after fixation, freezing and defrosting, and preserves the integrity of fibers during preparation and dissection of the human brain.

The specificity of Klingler’s freezing process

With regard to freezing, it seems surprising to obtain alterations of microstructure, as many EM studies use a freezing step before slicing with microtomes. For example, Liu and Schumann (2014) demonstrated that although axonal density might differ from one subject to another (range 0.14–0.19 axons/ μm^2 for the white matter of the superior temporal gyrus), axonal ultrastructure “is preserved through the freezing process (...) and does not impact measures of myelinated axon density”. Nonetheless, it is important here to emphasize that they presented flash-frozen cut human brain sections. Flash-freezing is known to preserve the ultrastructure of biological tissues (Rosene et al. 1986) in contrast to slow freezing, as performed during Klingler’s preparation. This explains why electron microscopy of slowly frozen brain matter, *i.e.*, deliberately altered by putative ice crystals, has never been used in histological and EM studies, which conversely aimed to obtain maximally preserved white matter.

Electron microscopy, an under-used method to explore white matter ultrastructure

Surprisingly, EM has not been extensively used to explore human white matter. Indeed, since the study of Aboitiz et al. (1992), who described the fiber composition of the human corpus callosum using both light microscopy and EM, the few studies that have used EM on human cerebral white matter mostly investigated axonal diameters (Zikopoulos and Barbas 2010; Liu and Schumann 2014; Liewald et al. 2014) to compare their results to those provided by diffusion MRI (Assaf et al. 2008; Barazany et al. 2009; Alexander et al. 2010). Another interesting point is that little is known about the impact of fixation on white matter ultrastructure observed under EM. Indeed, it is thought that formalin-fixed extracellular space is not as large as it is in the intact brain when it is observed under EM (Cragg 1979). In fact, little is known about the influence of fixation on the ultrastructure of human cerebral white matter, since EM can obviously not be performed without prior fixation. To study the influence of the fixation protocol on white matter ultrastructure, we compared the effects of formalin fixation with those of para/gluta fixation. We did not observe significant differences between the two methods, but after freezing–defrosting, ultrastructure alterations were more pronounced using formalin than para/gluta. This result might be explained by the known effects of glutaraldehyde, a widely used fixative for EM containing more aldehyde groups than formaldehyde, thus with greater potential for cross-linking than formaldehyde (Kiernan 2000). Nonetheless, glutaraldehyde has the major disadvantage of penetrating tissues less deeply than formaldehyde, limiting its use to small samples. As our study did not focus on characterizing white matter ultrastructure nor on measuring axonal diameter, we mainly analyzed whether axons and myelin sheaths were preserved, which is ultimately the main factor that might produce errors of interpretation during fiber dissection.

Finally, to our knowledge, no study has previously provided SEM images of human white matter fibers. The SEM images we present here, therefore, provide a unique opportunity to observe the organization of axons and their surrounding cells in a fiber bundle from a new perspective.

Taken together, our results provide strong arguments to confirm that fiber dissection using Klingler’s preparation method is a valuable method to explore the structural connectivity of major association tracts of the human brain.

The place of dissection as an exploration tool of brain structural connectivity

Far from being an anatomical technique, MR diffusion tractography only provides indirect information based on

the preferential direction of water molecule diffusion along the axons. Since results of diffusion tractography can vary considerably, depending on acquisition and post-processing parameters (Jones and Cercignani 2010; Jones et al. 2013; Thomas et al. 2014), they need to be fully validated against an anatomical ground truth.

While non-human models, such as autoradiography of monkey brains (Schmahmann et al. 2007), and synthetic phantoms (Poupon et al. 2008) have shown a good correlation between anatomy and diffusion tractography, the uniqueness and complexity of the human brain make direct comparison between human anatomy and human MR tractography necessary. For obvious ethical reasons, only the three methods described below are currently used as anatomical validation tools of MR tractography. First, polarized light imaging (PLI) records light transmission through an anatomical slice; due to optical birefringence of the myelin sheaths, light transmission depends on the relative orientations of white matter fibers and informs on their organization (Dammers et al. 2010; Palm et al. 2010). Refinements of this promising technique enable fiber direction to be evaluated at a micrometer-scale resolution, but it has the same limitation as histological preparation for axonal tracing, i.e., loss of 3D coherence of fiber tracts due to the preparation of slices. Second, optical coherence tomography (OCT) directly studies fiber orientation at the surface of the anatomical blockface (Wang et al. 2011; Goergen et al. 2012; Magnain et al. 2014) and thus does not suffer artifacts induced by specimen slicing. Convincing images have been published for the rat (Wang et al. 2011) but not the whole human brain, mainly because of technical limitations, notably related to specimen size. And third, Klingler's method which, compared to other techniques, has several advantages: (1) it provides direct visualization of the fibers (Fig. 7), (2) fibers do not lose their 3D

coherence; thus, it does not depend on reconstruction algorithms such as PLI, OCT or post-mortem tractography, (3) it has the same resolution as diffusion tractography of the order of the millimeter (Zemmoura et al. 2014), and (4) it can be applied to the human brain.

Fiber dissection has been extensively used to support diffusion tractography and intraoperative electrostimulation data, to demonstrate the existence of fiber bundles that are difficult to track (Kinoshita et al. 2012; Maldonado et al. 2013), to illustrate surgical applications (De Benedictis et al. 2012; Martino et al. 2013a), or to study cortical terminations that are difficult to assess with diffusion tractography (Martino et al. 2013b; Sarubbo et al. 2013). Nevertheless, dissection based on Klingler's method sometimes appears as a historical technique in the Neuroscience community and several limitations regarding its use as a validation tool for tractography have been raised. We previously described these limitations (see Zemmoura et al. 2014 for details): dissection has a lower spatial resolution than histology, PLI or OCT; it is time consuming and requires experienced operators to obtain satisfactory results; it is unable to study crossing fibers on the same anatomical specimen; it is said not to follow fiber tracts up to their cortical endings. Despite these limitations, dissection is nowadays the only validation method that can be used in the human while preserving the 3D-coherence of fiber bundles, and that directly visualizes the human connectome at about the same scale as MR tractography. An additional—and major—criticism of Klingler's method is that no clear demonstration of the way it acts to help dissection was previously published; it is generally accepted in the anatomy community that freezing–defrosting forms ice crystals, which are supposed to help dissection by dilacerating fiber bundles at a microscopic scale (Ludwig and Klingler 1956), but this mechanism remained unproved. The changes we observed in white matter



Fig. 7 Illustration of Klingler's dissection of a human hemisphere (author's personal data). *Left panel* photograph of the lateral aspect of a left human hemisphere showing the long segment of the arcuate fasciculus connecting frontal to temporal areas. *Right panel* enlargement of the posterosuperior angle of the insula and its surrounding

white matter fibers forming the arcuate fasciculus. Macroscopic view can easily identify that a small part of arcuate fibers terminate in the posterior part of the superior temporal gyrus (within the so-called Wernicke's area) while most of the arcuate fibers caudally connect with the middle and inferior temporal gyri

ultrastructure after freezing–defrosting—appearance of interfibers lacunas, disappearance of interfibers bridges and preservation of myelin sheaths—may explain how this process facilitates dissection.

Conclusion

The preparation method plays a crucial role in the identification of white matter during dissection. Klingler's method (Ludwig and Klingler 1956; Klingler and Gloor 1960) was widely adopted by anatomists studying the structure of fiber bundles, even though no ultrastructural study had ever demonstrated the effect of the preparation on white matter. Thus, our results are the first to demonstrate the effects of this method, which preserves myelin sheaths—and, therefore, axonal structure—while altering the extracellular matrix. Lacunas arise in the latter during freezing, destroying glial cells and thus facilitating the separation of fibers during dissection, which do not in fact destroy axons. This observation explains why fiber dissection using Klingler's method is possible, and also why fiber crossings are problematic, as the anatomist has to “cut” the fibers that “cross” to continue following the tract of interest. Therefore, it is not possible to expose the entire cerebral network in a unique specimen using this method, but dissection can track one bundle through a crossing region efficiently and is, therefore, an interesting way of testing the robustness of tracking algorithms. Finally, in the light of our findings, we will extend our electron microscopic studies by investigating regions of crossing fibers using our FIBRASCAN method (Serres et al. 2013; Zemmoura et al. 2014) to locate the studied sample in the MRI of the same specimen precisely, and we will test the dissectability of other fixing agents that could enhance the efficacy of fiber dissection.

Acknowledgments Our data were obtained with the assistance of the RIO EM facility of François-Rabelais University. We would like to express our gratitude to the donors involved in the body donation program of the Association des dons du corps du Centre Ouest, Tours, who made this study possible by generously giving their bodies to Science. We thank Christine Hayot and Julien Gaillard for technical assistance with EM sections, and Daniel Bourry for the macrophotography of white matter samples. We are grateful to Philippe Roingard for his careful reading of the manuscript and helpful comments.

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest to declare.

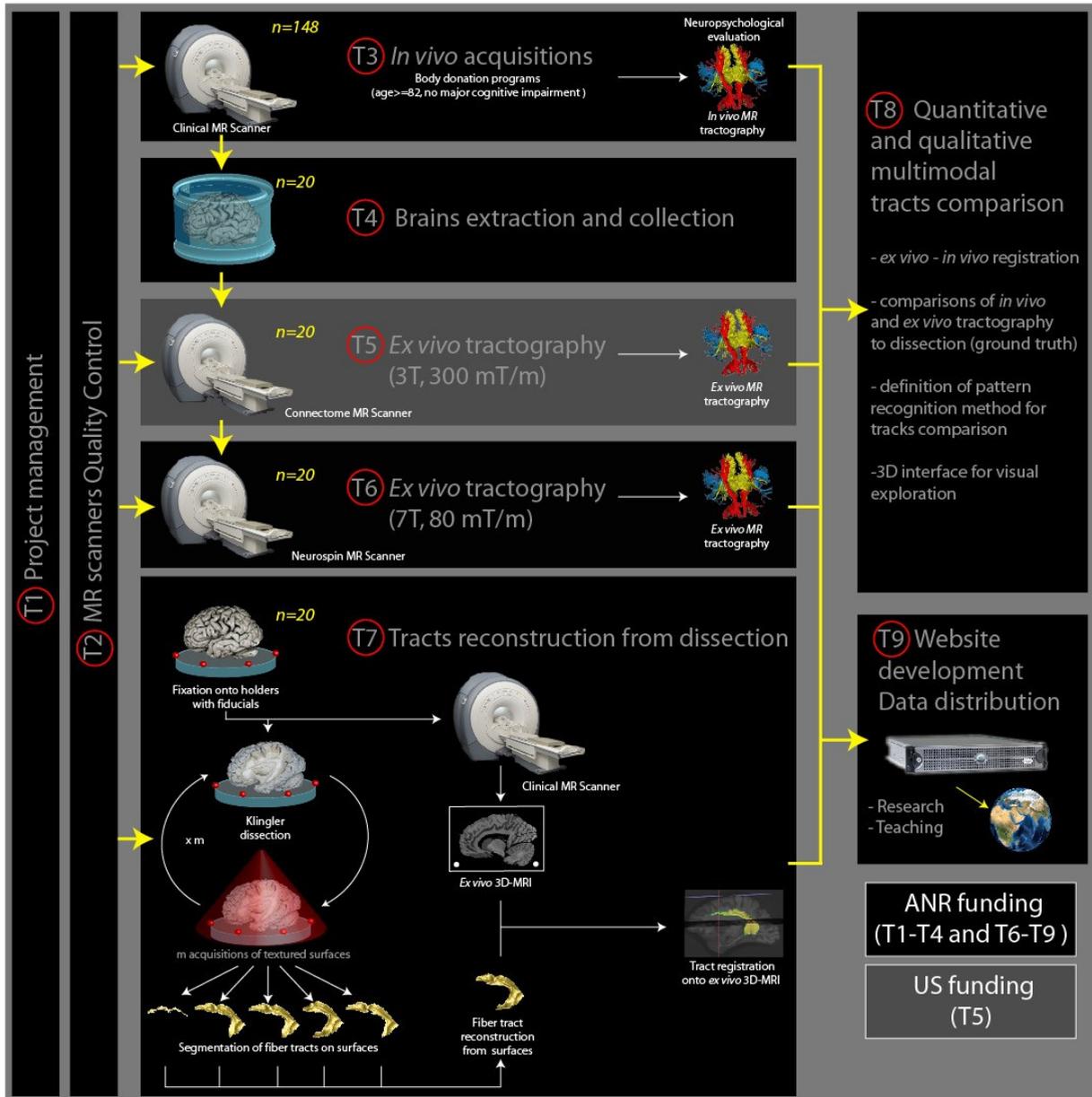
References

Aboitiz F, Scheibel AB, Fisher RS, Zaidel E (1992) Fiber composition of the human corpus callosum. *Brain Res* 598:143–153

- Alexander DC, Hubbard PL, Hall MG et al (2010) Orientationally invariant indices of axon diameter and density from diffusion MRI. *NeuroImage* 52:1374–1389
- Assaf Y, Blumenfeld-Katzir T, Yovel Y, Basser PJ (2008) AxCaliber: a method for measuring axon diameter distribution from diffusion MRI. *Magn Reson Med* 59:1347–1354
- Barazany D, Basser PJ, Assaf Y (2009) In vivo measurement of axon diameter distribution in the corpus callosum of rat brain. *Brain J Neurol* 132:1210–1220
- Cragg B (1979) Brain extracellular space fixed for electron microscopy. *Neurosci Lett* 15:301–306
- Dammers J, Axer M, Grassel D et al (2010) Signal enhancement in polarized light imaging by means of independent component analysis. *NeuroImage* 49:1241–1248
- De Benedictis A, Sarubbo S, Duffau H (2012) Subcortical surgical anatomy of the lateral frontal region: human white matter dissection and correlations with functional insights provided by intraoperative direct brain stimulation: laboratory investigation. *J Neurosurg* 117:1053–1069
- Dejerine JJ, Dejerine-Klumpke A (1895) *Anatomie des centres nerveux*. Rueff, Paris
- Fernandez-Miranda JC, Rhoton AL Jr, Alvarez-Linera J et al (2008) Three-dimensional microsurgical and tractographic anatomy of the white matter of the human brain. *Neurosurgery* 62:989–1026 (discussion 1026–1028)
- Goergen CJ, Radhakrishnan H, Sakadžić S et al (2012) Optical coherence tractography using intrinsic contrast. *Opt Lett* 37:3882–3884
- Jones DK, Cercignani M (2010) Twenty-five pitfalls in the analysis of diffusion MRI data. *NMR Biomed* 23:803–820
- Jones DK, Knösche TR, Turner R (2013) White matter integrity, fiber count, and other fallacies: the do's and don'ts of diffusion MRI. *NeuroImage* 73:239–254
- Kiernan JA (2000) Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microsc Today* 1:5
- Kinoshita M, Shinohara H, Hori O et al (2012) Association fibers connecting the Broca center and the lateral superior frontal gyrus: a microsurgical and tractographic anatomy. *J Neurosurg* 116:323–330
- Klingler J (1935) Erleichterung der makroskopischen Präparation des Gehirns durch den Gefrierprozess. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 36:247–256
- Klingler J, Gloor P (1960) The connections of the amygdala and of the anterior temporal cortex in the human brain. *J Comp Neurol* 115:333–369
- Liewald D, Miller R, Logothetis N et al (2014) Distribution of axon diameters in cortical white matter: an electron-microscopic study on three human brains and a macaque. *Biol Cybern* 108:541–557
- Liu X-B, Schumann CM (2014) Optimization of electron microscopy for human brains with long-term fixation and fixed-frozen sections. *Acta Neuropathol Commun* 2(1):42
- Lu Y-B, Franze K, Seifert G et al (2006) Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proc Natl Acad Sci* 103:17759–17764
- Ludwig E, Klingler J (1956) *Atlas humani cerebri*. Karger Publications, New York
- Magnain C, Augustinack JC, Reuter M et al (2014) Blockface histology with optical coherence tomography: a comparison with Nissl staining. *NeuroImage* 84:524–533
- Maldonado IL, de Champfleury NM, Velut S et al (2013) Evidence of a middle longitudinal fasciculus in the human brain from fiber dissection. *J Anat* 223:38–45
- Martino J, Vergani F, Robles SG, Duffau H (2010) New insights into the anatomic dissection of the temporal stem with special emphasis on the inferior fronto-occipital fasciculus: implications

- in surgical approach to left mesiotemporal and temporoinular structures. *Neurosurgery* 66:4–12
- Martino J, da Silva-Freitas R, Caballero H et al (2013a) Fiber dissection and diffusion tensor imaging tractography study of the temporoparietal fiber intersection area. *Neurosurgery* 72:87–97 (**discussion 97–98**)
- Martino J, De Witt Hamer PC, Berger MS et al (2013b) Analysis of the subcomponents and cortical terminations of the perisylvian superior longitudinal fasciculus: a fiber dissection and DTI tractography study. *Brain Struct Funct* 218:105–121
- Nave K-A (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244–252
- Palm C, Axer M, Grassel D et al (2010) Towards ultra-high resolution fibre tract mapping of the human brain—registration of polarised light images and reorientation of fibre vectors. *Front Hum Neurosci* 4:9
- Peltier J, Travers N, Destrieux C, Velut S (2006) Optic radiations: a microsurgical anatomical study. *J Neurosurg* 105:294–300
- Peuskens D, van Loon J, Van Calenbergh F et al (2004) Anatomy of the anterior temporal lobe and the frontotemporal region demonstrated by fiber dissection. *Neurosurgery* 55:1174–1184
- Poupon C, Rieul B, Kezele I et al (2008) New diffusion phantoms dedicated to the study and validation of high-angular-resolution diffusion imaging (HARDI) models. *Magn Reson Med* 60:1276–1283
- Rosene DL, Roy NJ, Davis BJ (1986) A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *J Histochem Cytochem* 34:1301–1315
- Sarubbo S, Benedictis A, Maldonado IL et al (2013) Frontal terminations for the inferior fronto-occipital fascicle: anatomical dissection, DTI study and functional considerations on a multi-component bundle. *Brain Struct Funct* 218:21–37
- Schmahmann JD, Pandya DN, Wang R et al (2007) Association fibre pathways of the brain: parallel observations from diffusion spectrum imaging and autoradiography. *Brain* 130:630–653
- Serres B, Zemmoura I, Andersson F et al (2013) Brain virtual dissection and white matter 3D visualization. *Stud Health Technol Inf* 184:392–396
- Shreiber DI, Hao H, Elias RA (2008) Probing the influence of myelin and glia on the tensile properties of the spinal cord. *Biomech Model Mechanobiol* 8:311–321
- Thomas C, Ye FQ, Irfanoglu MO et al (2014) Anatomical accuracy of brain connections derived from diffusion MRI tractography is inherently limited. *Proc Natl Acad Sci* 111:16574–16579
- Ture U, Yasargil MG, Friedman AH, Al-Mefty O (2000) Fiber dissection technique: lateral aspect of the brain. *Neurosurgery* 47:417–426 (**discussion 426–427**)
- Wang H, Black AJ, Zhu J et al (2011) Reconstructing micrometer-scale fiber pathways in the brain: multi-contrast optical coherence tomography based tractography. *NeuroImage* 58:984–992
- Zemmoura I, Serres B, Andersson F et al (2014) FIBRASCAN: a novel method for 3D white matter tract reconstruction in MR space from cadaveric dissection. *NeuroImage* 103:106–118
- Zikopoulos B, Barbas H (2010) Changes in prefrontal axons may disrupt the network in autism. *J Neurosci* 30:14595–14609

Annexe 3 : Plan expérimental du projet FIBRATLAS



Annexe 4 : Article scientifique publié en tant que
collaborateur — Brain virtual dissection and white matter 3D visualization. Serres B,
Zemmoura I, Andersson F, Tauber C, Destrieux C, Venturini G. *Studies in Health
Technology and Informatics* 2013;184:392-396.

Brain Virtual Dissection and White Matter 3D Visualization

Barthélemy SERRES^{a,b,1}, Ilyess ZEMMOURA^b, Frédéric ANDERSSON^b,
Clovis TAUBER^b, Christophe DESTRIEUX^b, Gilles VENTURINI^a
^aComputer Science lab, EA 6300, University François Rabelais, Tours, France
^bUMRS INSERM U930 – University François Rabelais, Tours, France

Abstract. This paper presents an immersive visualization tool that helps anatomists to establish a ground truth for brain white matter fiber bundles. Each step of a progressive anatomical dissection of human brain hemisphere is acquired using a high resolution 3D laser scanner and a photographic device. Each resulting surface is textured with a high resolution image and registered into a common 3D space using fiducial landmarks. Surfaces can be visualized using stereoscopic hardware and are interactively selectable. The tool allows the user to identify specific fiber bundle parts. Extracted fiber bundles are stacked together and rendered in stereoscopy with the corresponding MR volume. Surgeons have validated this tool for creating ground truth in medical imaging with the perspective of validating tractography algorithms.

Keywords. 3D Laser Acquisition, Interactive segmentation, Stereoscopic Visualization, Fiber bundles reconstruction

Introduction

Current medical imaging techniques (CT scanner, MRI) make it possible to acquire 3D volume data of the body and to study specific substructures. To do so, pattern recognition methods can be used to objectively segment or classify the images. However, the validation of such methods usually requires the knowledge of ground truth, which is not always available. While physical or numerical phantoms can be used as a first validation step, it is often necessary to further validate the method on real sample images. Building digital ground truth from a real specimen is a challenging task in medical imaging. The work presented in this paper is in the context of the validation of tractography algorithms, which reconstruct in 3D white matter (WM) fiber bundles from diffusion MRI raw data [1]. Building a ground truth in this domain requires 1) the acquisition of data with a high precision in order to obtain, at the end of the process, a ground truth with the highest possible accuracy, 2) a 3D visualization and selection methods for the identification of specific substructures, 3) an overall 3D visualization of the resulting ground truth for its visual validation. In this paper, we will describe point 1) and we will show how Virtual Reality (VR) can be used for points 2) and 3).

¹ Corresponding Author.

Acknowledgment: This work has the support of the European Union which partially funds this project through the European Regional Development Funding program (FEDER).

1. Material And Methods

1.1. Data acquisition and preprocessing

Methods used in tractography take as input a diffusion MRI and output the detected fibers bundles [2]. In order to define, for such approaches, a ground truth based on the brain real anatomy, we had to use a different modality for the acquisition of data. We have therefore conceived a destructive acquisition process based on the dissection of the brain. At each dissection step, the anatomist acquires the 3D surface of the specimen as well as a photograph that is mapped onto the surface, which becomes textured. These steps are repeated until the whole brain has been dissected. The result of this process is a set of textured surfaces that are registered using fiducial landmarks.

More precisely, the brain, previously prepared with Klingler's method [3], is fixed on a small platform. This platform has fiducial landmarks that can be both detected with the laser head and within an MRI. Then, the anatomist performs the dissection, step by step. At each dissection step, he acquires the brain surface (with a laser scanner), the fiducial landmarks (with the scanner probe) and an ortho-photograph of the surface. These steps are repeated until the whole brain has been dissected.

After this acquisition process, the data is pre-processed with no loss of accuracy (250 μm with the laser scanner): all degenerated, isolated and non-manifold triangles are removed. Then, surfaces must be registered using the four fiducial and non coplanar landmarks located on the edge of the acquisition platform. Acquired surfaces are registered onto the first acquired surface (reference) using the ICP algorithm [4].

1.2. Visualization and interactive selection in Virtual Reality

After data acquisition and pre-processing, the anatomist must visualize the acquired data in order to select and label regions of interest (ROIs). ROIs with the same label are further used to reconstruct a given substructure of the brain in 3D.

Several approaches have been developed for the visualization of WM bundles, mainly in the context of reconstructed fibers from MRI tractography algorithms. An early work that deals with white fibers bundles polygon rendering is for instance [5] where these structures are rendered using stream tubes and stream surfaces. Recent work proposed a technique based on DTI results, with a hybrid visualization method of WM using triangles and point-based rendering [6]. Thanks to the graphics hardware improvements, the rendering possibilities have dramatically increased and have allowed the representation of fibers within a volumic context. Examples of such techniques also involve volume rendering with clipping boxes [7] or image fusion [8]. Concerning the immersive visualization, we mention the use of immersive CAVE setup [9] where fiber tracts are presented to experts. Such an installation can provide a good immersion feeling, but is expensive and non-portable.

Our goal is to design an interface for exploring the acquired surfaces, which includes data importation, texturing tools, surfaces 3D visualization, and navigation. We have designed a selection tool to be specifically used by the anatomist while proceeding to the selection and labeling step. Selection on meshes is needed to create ROIs. Using this tool, the expert can draw directly onto the surface to label the boundaries of the region of interest, and can automatically fill in the closed region to obtain a complete selection of the ROI. "Select" and "unselect" commands provide the anatomist a fine tuned control of the labeling process.

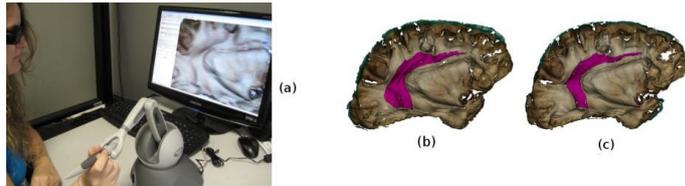


Figure 1. Selection task – (a) VR setup with stereo display and haptic feedback. (b) (c) 2 digitized hemisphere brain surfaces, representing 2 successive dissection steps of the total 10. In purple, we can see expert-highlighted SLF parts identified on each dissection.

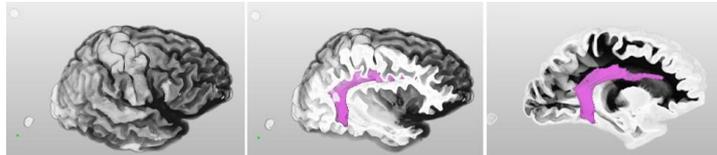


Figure 2. SLF reconstruction visualized in the volumic context. The cutter tool consist of freely moving a cutting plane among the volume to let fiber bundles reconstructions appears. This makes the anatomist explore connexions with others brain parts, like other bundles, but also cortical or sub-cortical areas.

The proposed tool includes a haptic device, the Phantom Omni [10], allowing the anatomist to move a 3D cursor onto the surface (see Figure 1(a)). This 3D cursor is sliding on the surface and makes the anatomist feel the relief. A snap distance is set to create an attraction force as the cursor flows closely to the surfaces. This force also ensures that the cursor stays onto the surface during labeling. In order to enhance the immersion of the user, textured surfaces are displayed with stereoscopic hardware (120Hz LCD screen with shuttering glasses). This makes the anatomist closer to his usual working conditions, i.e. under stereo-microscopic magnification.

1.3. Visual validation of substructures: combining surfaces and volumes

After the selection of several parts of a substructure, the anatomist must check that these parts are relevant and that no errors occurred. This step is necessary in order to validate the discovered substructures. For this validation procedure, our tool proposes a visualization of the selected surfaces within a volumic representation of the brain that consists in an MRI of the brain acquired before the dissection. As described in section 1.1, fiducial landmarks are also detected in the MRI and used to register the surfaces onto the MRI, using the ICP algorithm. It is then possible to represent the surfaces within the brain volume (see Figure 2). Our method provides the expert with a visual validation tool, called virtual cutter. This tool makes it possible to freely move a virtual cutting plane in the data, uncovering global context of the MRI acquisition. This helps the anatomist to point out connections between the labeled structure and its surrounding. This task is performed by our expert inside our immersive visualization.



Figure 3 : (a) Multiple surfaces labeled parts, allow the 3D reconstruction of the targeted substructure (Surface Rendering). (b) Shows the voxelized version of the reconstruction result (Volume Rendering).

1.4. Ground Truth 3D Reconstruction from surfaces

Once the different parts of a substructure are selected and labeled in the surfaces, a volume can be reconstructed (see Figure 3) and further used to validate pattern recognition methods. For generating this volume, the user selects the desired output resolution in voxels. Then, a sampling is performed: in the output image, each voxel which has a non zero intersection with the labeled parts of surfaces is set to "1", and all other voxels are set to "0". In order to avoid empty spaces between surfaces, we artificially increase the number of triangles in the surfaces by sub-sampling techniques. The output volume can be represented in any standard volumic visualization software and can be used to validate pattern recognition methods.

2. Results

We have applied our technique to a brain hemisphere with the objective of reconstructing the Superior Longitudinal Fasciculus (SLF). Our aim was also to obtain a formative feedback from experts. The brain was prepared and fixed in our platform. After the MRI acquisition, the anatomist (neurosurgeon) has performed the iterative dissection and acquisition process. Dissection lasted one day. Then all surfaces and their corresponding textures were loaded into our software that can handle very large meshes (>3 Millions faces). Textured triangle meshes were displayed at interactive frame rate (above 25 frames per second) and the anatomist was able to freely navigate through the different dissection steps. Surfaces were accurately registered together using the detected fiducial landmarks (surfaces registration error < 0.3 mm). The anatomist has identified, on each surface, the SLF bundle parts (see Figure 1(b,c)). Then the labeled parts of surfaces were used to reconstruct the SLF in 3D (see Figure 3). The expert has used the combined surfacic-volumic visualization to finally validate the reconstructed object. He was satisfied with the results.

The expert feedback was as follows. First we gave the anatomist an overview of the proposed software and interface, including the use of 3D stereoscopy and the haptic device. The user interface was considered as intuitive and well organized. The anatomist managed to achieve the knowledge extraction task (i.e. the ROI selection task on every digitized dissection step) in a short time, approximately 15 minutes. We have asked the expert about his opinion on the use of VR and haptic devices. Haptic set up gave the expert a good global perception of the surface to be explored. However, surfaces with holes caused sudden changes of the feedback forces and could punctually alter the immersion feeling. In a second evaluation step, we have asked four other experts to use our interface for solving the ROI selection task (with the same SLF surfaces), and we have used a post-task questionnaire to obtain their evaluations. The results were as follows: 3 experts were satisfied with the tool, and have not suggested

improvements. One expert highlighted also difficulties with the haptic feedback and requested for a longer training step. Due to particular bundle shape, haptic feedback may give useful railing constraints for the selection task, avoiding false-positive selection.

3. Conclusion & Discussion

We have presented a tool that makes it possible to create ground truth for medical imaging from dissection, with a first application in the context of WM reconstruction. We have defined an acquisition procedure, and tools for data preprocessing. We have given anatomists the opportunity to interactively "replay" the dissection and browse the dissection steps through an immersive setup. Our software has been designed to label any kind of substructure parts, visible on the different dissection steps, using a force feedback haptic device. To add depth perception, the working scene has been displayed using stereoscopic-enabled hardware. Collected parts on the different surfaces acquired during anatomical progressive dissection make it possible to reconstruct 3D models of the studied structures, and to visualize these models in 3D within a volumic context.

We have presented an application of our technique in the specific case of human brain dissection for WM retrieval. One of the significant fiber bundles, the SLF has been dissected by an anatomist and reconstructed, producing a 3D model. The experts have visualized the SLF reconstruction result in its MR T1 volume context, and were satisfied by the results. Our software is currently used in a clinical research protocol to create further ground truth of WM fibers bundles from different specimens.

The next step in this work consists in defining a protocol for comparing the obtained ground truth volumes with WM tracts detected with tractography algorithms. A further study with many more specimens will result in an expert validated atlas of white fibers, along with the corresponding diffusion MRI, thus providing the research community with a complete framework for tractography algorithms validation.

References

- [1] Tuch D.: Q-ball imaging. *Magn. Reson. Med.* 52 (2004), 1358–1372. 1
- [2] Basser P., Mattiello J., Le Bihan D.: *M.R. diffusion tensor spectroscopy and imaging*. *Biophysical Journal* 66, 1 (1994), 259–267. 1
- [3] Ludwig E., Klingler L.: *The inner structure of the brain*. Atlas Humani Cerebri (1956).
- [4] Besl P. J. and McKay N. D., "A method for registration of 3-d shapes", *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 14, (1992), pp. 239–256.
- [5] Zhang S., Curry C., Morris D. S., Laidlaw D. H.: D.h.: *Visualizing diffusion tensor MR images using streamtubes and streamsurfaces*. *IEEE TVCG* 9 (2003). 1
- [6] Merhof D., Sonntag M., Enders F., Nimsy C., Hastreiter P., Greiner G.: *Hybrid visualization for white matter tracts using triangle strips and point sprites*. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics* 12 (September 2006), pp. 1181–1188.
- [7] Nimsy C., Ganslandt O., Enders F., Merhof D., Hammen T., Buchfelder M.: *Visualization strategies for major white matter tracts for intraoperative use*. *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery* 1 (2006), pp. 13–22.
- [8] Schultz T., Sauber N., Anwander A., Theisel H., Seidel H.-P.: *Virtual Klingler dissection: Putting fibers into context*. *Computer Graphics Forum* 27, 3 (2008), pp. 1063–1070.
- [9] Zhang S., Demiralp C., Keefe D. F., DaSilva M., Basser P., Pierpaoli C., Chiocca E., Deisboeck T., Laidlaw D. H., Greenberg B. D.: *An immersive virtual environment for dt-mri volume visualization applications: a case study*. In *Proceedings of IEEE Visualization 2001* (2001), pp. 437–440.
- [10] Phantom Omni, Sensable - Geomagic inc., Research Triangle Park, NC, USA

Annexe 5 : Présentation de poster dans un congrès scientifique

– FIBRASCAN: a novel method for 3D white matter tract reconstruction in MR space from cadaveric dissection. **Zemmoura I**, Serres B, Andersson F, Tauber C, Barantin L, Filipiak I, Venturini G, Destrieux C. *ISMRM Workshop on Diffusion as a Probe of Neural Tissue Microstructure in Podstrana, Croatia 14-18 October 2013*



FIBRASCAN: a novel method for 3D white matter tract reconstruction in MR space from cadaveric dissection

I Zemmoura^{1,2,4}, B Serres^{1,5}, F Andersson^{1,6}, L Barantin¹, C Tauber¹
I Filipiak¹, JP Cottier^{1,3}, G Venturini⁵, C Destrieux^{1,2,4}

1: UMRS "Imagerie et Cerveau", INSERM U830, CNRS ERL3106, Université François Rabelais de Tours, Tours, France
2: Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, Service de Neurochirurgie, Tours, France
3: Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, Service de Neuroradiologie, Tours, France
4: Université François Rabelais de Tours, Laboratoire d'Anatomie, Tours, France
5: Université François Rabelais de Tours, Laboratoire d'Informatique, EA6300, Tours, France
6: Institut Fédératif de Recherche 135 "Imagerie Fonctionnelle", Tours, France

contact : ilyess.zemmoura@univ-tours.fr

Purpose

- Dissection with Klingler's method (formaldehyde fixation, freezing-defrosting) is usually considered the "goldstandard" technique for 3D study of cerebral white matter tracts gross anatomy.

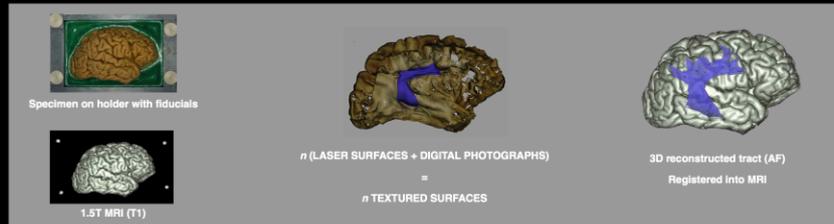


- Cerebral tractography relies on complex mathematical models that indirectly provide anatomical information, and needs to be validated.
- Comparison between MRI tractography and Klingler's method could be used for the validation of tractography. In humans, up to now, tractography was mainly validated by qualitative comparison with data obtained from dissection. No quantitative comparison was possible since MRI and dissection data are obtained in different reference spaces, and because fiber tracts are progressively destroyed by dissection.
- The challenge is to compare a method providing surface data (Klingler) to another providing volume data (MRI) in different anatomical spaces.
- We propose a novel method and software (FIBRASCAN) that allow accurate reconstruction of fiber tracts from dissection in MRI reference space.

Description

- Four human hemispheres, obtained from three formalin-fixed brains were prepared for Klingler's dissection, placed on a holder with fiducial markers, MR scanned, and then dissected to expose the arcuate fasciculus.
- During dissection, we performed iterative acquisitions of the surface and the texture of the specimens using a laser scanner ((ScanArm V2®), FARO Technology Inc, Lake Mary, FL, USA) and a digital camera (Pentax® K-20 camera with Pentax® lens D-FA 100 mm f/2.8 Macro). Each texture was projected onto the corresponding surface and the resulting set of textured surfaces was coregistered thanks to the fiducials. The arcuate fasciculus was then interactively segmented on each textured surface and reconstructed from the pile of surface segments.
- Finally, the reconstructed tract was coregistered onto *ex vivo* MRI thanks to the fiducials.

Methods

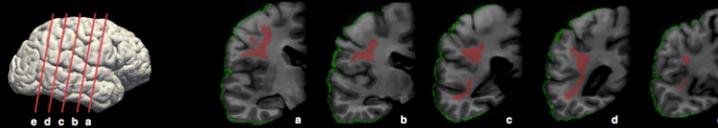


Evaluation / Validation

- Each critical step of the process was assessed to measure the precision of the method:
 - Deformation of the specimen during dissection
 - Distance between 2 consecutive steps of dissection
 - Surface-to-surface registration
 - Coregistration surface-MRI

Results

- We were able to reconstruct the arcuate fasciculus from cadaveric dissection and to port the reconstructed tract into *ex vivo* MRI reference space.



- The overall accuracy of the method was of the order of 1 mm: surface-to-surface registration = 0.138 mm, deformation of the specimen during dissection = 0.356 mm, coregistration surface-MRI = 0.6 mm. The spatial resolution of the method (distance between two consecutive surface acquisitions) was 0.345 mm.

- In conclusion, we here present the robustness of a novel method for accurate reconstruction of fiber tracts from dissection in the *ex vivo* MR reference space. This is a major step toward a quantitative comparison of MRI tractography with dissection results.
- Event though dissection has its own limitations, it is nowadays the only technique to provide a direct visualisation of human fiber tracts 3D anatomy. Crossing, kissing and fanning fibers still remain a challenge with our technique, as for tractography. However, the ability to reconstruct "in reverse" a fiber bundle allows us to recognize with a very good precision the cortical terminations of the studied tract.

Supports



Refs.

- Catani, M. (2008), A diffusion tensor imaging tractography atlas for virtual in vivo dissections, *Cortex*, vol. 44, no. 8, pp. 1105-1132.
- Kinoshita, M. (2005), Fiber-tracking does not accurately estimate size of fiber bundle in pathological condition: initial neurosurgical experience using neuronavigation and subcortical white matter stimulation, *NeuroImage*, vol. 25, no. 2, pp. 424-429.
- Klingler, J. (1960), The connections of the amygdala and of the anterior temporal cortex in the human brain, *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 115, no. 3, pp. 333-369.
- Ludwig, E. & Klingler, J. (1956), 'atlas humani cerebri', Basel, New York, Karger, S.

Ilyess ZEMMOURA

Reconstruction des fibres blanches cérébrales à partir de la dissection et recalage dans l'IRM post-mortem

pour la comparaison à la tractographie cérébrale par IRM de diffusion

Résumé

La connaissance de la morphologie des faisceaux de fibres blanches, qui connectent des régions cérébrales distantes, est indispensable à la compréhension du fonctionnement cérébral. La tractographie par IRM de diffusion reconstruit indirectement cette anatomie à partir d'algorithmes mathématiques complexes. Après une revue des méthodes proposées pour la validation de la tractographie, nous proposons une méthode originale basée sur la reconstruction 3D de faisceaux disséqués. Notre méthode, FIBRASCAN, utilise des acquisitions itératives de surface en cours de dissection. Les faisceaux étaient segmentés sur chaque surface puis reconstruits par empilement. Un support rigide permettait le recalage entre surfaces puis vers l'IRM. Nous avons démontré la précision de chaque étape de reconstruction, et sa faisabilité sur plusieurs faisceaux. Dans la dernière partie de ce travail, la structure des fibres blanches et les modifications induites par la préparation et la dissection sont explorées en microscopie électronique. Nous avons montré que la dissection préservait la structure des axones et peut ainsi être considérée comme un outil de validation de la tractographie.

Mots-clés : Substance blanche ; Dissection ; Klingler ; Tractographie ; Microscopie électronique

Abstract

The knowledge of the morphology of white matter fiber tracts, which connect distant cerebral areas, is essential to better understand brain functions. Diffusion MR tractography indirectly reconstructs this anatomy using complex mathematical algorithms. After a review of the existing methods for tractography validation, we propose an original method based on 3D reconstruction of dissected tracts. Our method, FIBRASCAN, used iterative surface acquisitions during dissection. The tracts were segmented on each surface and then reconstructed by stacking these surfaces. A rigid support allowed registration between surfaces and then registration to MRI. We demonstrated the accuracy of each reconstructing step, and the feasibility of our method on several tracts. In the last part of this work, the structure of white matter fibers and the changes induced by preparation and dissection were investigated using electron microscopy. We showed that dissection preserves the structure of axons and can thus be considered as a validation tool for tractography.

Keywords: White matter; Dissection; Klingler; Tractography; Electronic microscopy