



**HAL**  
open science

# Élastographie par résonance magnétique multifréquence in vitro et ex vivo pour la caractérisation d'agrégats fibrillaires cérébraux

Mathilde Bigot

► **To cite this version:**

Mathilde Bigot. Élastographie par résonance magnétique multifréquence in vitro et ex vivo pour la caractérisation d'agrégats fibrillaires cérébraux. Biotechnologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1207 . tel-02475585

**HAL Id: tel-02475585**

**<https://theses.hal.science/tel-02475585>**

Submitted on 12 Feb 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT :

2019LYSE1207

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° ED 205**  
**École Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé (EDISS)**

**Spécialité de doctorat :**  
Ingénierie biomédicale, biotechnologie

Soutenue publiquement le 16/10/2019, par :  
**Mathilde Bigot**

---

# **Élastographie par résonance magnétique multifréquence *in vitro* et *ex vivo* pour la caractérisation d'agrégats fibrillaires cérébraux**

---

Devant le jury composé de :

Chèze, Laurence	Professeure des Universités	Université Lyon 1	Présidente
Dhenain, Marc	Directeur de recherche	CNRS	Rapporteur
Granziera, Cristina	Professeure des Universités	University of Basel	Rapporteuse
Vappou, Jonathan	Chargé de recherche	CNRS	Examinateur
Chèze, Laurence	Professeure des Universités	Université Lyon 1	Examinatrice
Beuf, Olivier	Directeur de recherche	CNRS	Directeur de thèse
Lambert, Simon	Maître de conférences	Université Lyon 1	Co-directeur de thèse
Chauveau, Fabien	Chargé de recherche	CNRS	Co-directeur de thèse, Invité



# Remerciements

Tout d'abord, je remercie mon jury : Laurence Chèze, Marc Dhenain, Cristina Granziera et Jonathan Vappou. Merci d'avoir évalué mon travail et de vous être déplacés pour assister à ma soutenance.

Merci également à Olivier Beuf, Fabien Chauveau et Simon Lambert qui ont encadré cette thèse, ont largement contribué à sa réalisation et ont permis d'améliorer le manuscrit.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de CREATIS et en particulier l'équipe 5 au sein de laquelle j'ai été accueillie, la plateforme PiLoT qui m'a permis et aidée à réaliser les expériences de ma thèse et les membres du labex PRIMES, toujours disponibles pour résoudre les problèmes administratifs.

Un grand merci à l'ensemble des doctorants qui m'ont prodigué leurs conseils et soutenu au cours de ma thèse, ainsi qu'à l'ensemble de ma famille et de mes amis, toujours présents pour moi au cours de ces trois ans.



# Résumé

Parmi plusieurs processus biologiques impliqués dans la démence, l'agrégation fibrillaire de protéines endogènes arborant un défaut de conformation est une caractéristique précoce des maladies neurodégénératives. L'élastographie par résonance magnétique (ERM), une technique d'imagerie qui permet de cartographier les propriétés mécaniques des tissus, a récemment été appliquée dans le cadre des maladies neurodégénératives. Bien que des changements mécaniques associés à ces maladies aient été détectés, l'effet mécanique des fibrilles n'a pas encore été isolé dans des études cliniques ou précliniques. Ce travail de thèse vise à exploiter les propriétés fractales des fibrilles pour les différencier de protéines non agrégées. L'exposant de la loi puissance, obtenu par ajustement des données ERM multifréquences acquises sur fantôme et sur cerveau de rat *ex vivo*, permettrait de révéler à l'échelle macroscopique la présence à l'échelle microscopique de ces agrégats fibrillaires.

Au cours de cette thèse, un banc d'élastographie IRM pour l'imagerie d'échantillons *in vitro* et *ex vivo* a été développé. Ce dispositif a permis de mettre en œuvre une série de mesures ERM multifréquences (400 à 1200 Hz) sur des échantillons d'agarose contenant deux types de fibrilles,  $\alpha$ -Syn et A $\beta$ , et une protéine non agrégée utilisée comme témoin. Le même dispositif a permis de caractériser en ERM multifréquence (800 à 1200 Hz) des cerveaux de rats *ex vivo* préalablement injectés avec de l' $\alpha$ -Syn au niveau du striatum. Pour chaque rat, le striatum controlatéral a été injecté avec une solution saline et utilisé comme témoin. L'ensemble des données ERM ont été acquises sur un système préclinique 4.7 T à l'aide d'une séquence RARE modifiée. Après une inversion 3D directe, le module de stockage, l'angle de phase et la vitesse des ondes ont été extraits des élastogrammes. L'exposant de la loi puissance  $y$  a été obtenu par ajustement des données multifréquences.

Dans les inclusions contenant des fibrilles,  $y$  était significativement plus élevé que dans celles contenant la protéine non agrégée. Ce résultat est d'autant plus intéressant que les paramètres mono-fréquence sont peu affectés par la présence des fibrilles : l'ERM multifréquence apporte une information sur la microstructure des tissus et permet de caractériser aussi petites soient-elles (quelques  $\mu\text{m}$ ) les protéines fibrillaires.

Chez les rats, les modules de stockage et de perte ont diminué sur l'ensemble des fréquences étudiées par rapport au striatum controlatéral. Les paramètres  $y$  et  $\varphi$  en revanche ne permettent pas de discriminer l'injection de fibrilles de l'injection contrôle. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour comprendre l'absence de détection *ex vivo*.

Cette thèse constitue une contribution méthodologique originale dans le domaine de l'ERM, en isolant *in vitro* pour la première fois l'effet biomécanique de structures fibrillaires impliquées dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.

**Mots-Clefs** : élastographie par résonance magnétique – multifréquence – microstructure - démences – *in vitro* – *ex vivo*

# Abstract

Among several biological processes involved in dementia, fibrillar aggregation of endogenous proteins with altered conformation is an early characteristic of neurodegenerative diseases. Magnetic resonance elastography (MRE), an imaging technique that maps the mechanical properties of tissues, has recently been applied in neurodegenerative diseases. Although mechanical changes associated with these diseases have been detected, the mechanical effect of fibril has not yet been isolated in clinical or preclinical studies. This thesis work aims to exploit the fractal properties of fibrils to differentiate them from non-aggregated proteins. The exponent of the power law, obtained by adjusting multi-frequency MRE data acquired on phantom and rat brain *ex vivo*, could reveal at the macroscopic scale the presence of these fibrillar aggregates at the microscopic scale.

During this thesis, an MRI elastography bench for imaging *in vitro* and *ex vivo* samples was developed. This device made it possible to implement a series of multi-frequency MRE measurements (400 to 1200Hz) on agarose samples containing two types of fibrils,  $\alpha$ -Syn and A $\beta$ , and a non-aggregated protein used as a control. The same device has made it possible to characterize with multi-frequency MRE (800 to 1200Hz) rat brains *ex vivo* previously injected with  $\alpha$ -Syn in the striatum. For each rat, the contralateral striatum was injected with saline solution and used as a control. All MRE data were acquired on a 4.7T preclinical system using a modified RARE sequence. After a direct 3D inversion, the storage modulus, phase angle and wave velocity were extracted from the elastograms. The power law exponent is obtained by adjusting to the multi-frequency data.

In inclusions containing fibrils,  $\gamma$  was significantly higher than in those containing non-aggregated protein. This result is all the more interesting because the mono-frequency parameters were not affected much by the presence of fibrils: multi-frequency MRE provides information on the microstructure of tissues and makes it possible to characterize fibrillar proteins, however small they may be (a few  $\mu\text{m}$ ).

In rats, storage and loss modules decrease significantly over all frequencies studied compared to contralateral striatum. The parameters  $\gamma$  and  $\varphi$  on the other hand do not allow discriminating between fibril injection and control injection. Further experiments would be needed to understand the absence of *ex vivo* detection.

This thesis constitutes an original methodological contribution in the field of MRE, by isolating for the first time the biomechanical effect of fibrillar structures involved in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease.

**Key-Words:** *magnetic resonance elastography – multifrequency – microstructure - dementia – in vitro – ex vivo*

# Glossaire

G*	Magnitude du module de cisaillement
$\mu$	Module de rigidité
$\alpha$	Exposant de la loi puissance associé à $\mu$ /Significance threshold
$\alpha$ -Syn	$\alpha$ -synucléine/ $\alpha$ -synuclein
$\beta$	Effect size
$\varphi$	Angle de phase/Phase angle
A $\beta$	$\beta$ -Amyloïde/ $\beta$ -amyloid
BSA	Albumine de serum de bovin/Bovine Serum Albumin
c	Vitesse de l'onde/Wave speed
CI	Confidence Interval
ERM/MRE	Élastographie par Résonance Magnétique/Magnetic Resonance Imaging
f	Fréquence/Frequency
FLASH	Fast Low Angle SHot
G'	Module de conservation/Conservation modulus
G''	Module de perte/Loss modulus
G*	module de cisaillement /Shear modulus
GEM/MEG	Gradients d'encodage du mouvement/Motion Encoding Gradients
IRM/MRI	Imagerie par Résonance Magnétique/Magnetic Resonance Imaging
k	Nombre d'onde/Wave number
k <sub>r</sub>	Nombre d'onde réel/Real part of the wave number
LCS/CSF	Liquide Cérébro Spinal/Cerebro Spinal Fluid
AD	Alzheimer's Disease
MSME	Multi-Slice Multi-Echo
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffer Solution
RARE	RApid imaging with Refocused Echoes
RF	Radio-fréquence/Radiofrequency
ROI	Région d'intérêt/Region Of Interest
RSB/SNR	Rapport signal à bruit/Signal to Noise Ratio
SLIM	SamPLe Interval Modulation
SRM	Spectroscopie par Résonance Magnétique
T1	Temps de relaxation longitudinal/Longitudinal relaxation time
T2	Temps de relaxation transversal/Transversal relaxation time
TE	Temps d'écho/Time of echo
TEP/PET	Tomographie par émission de positons/Positron Emission Tomography
TR	Temps de répétition/Time of Repetition

# Liste des Figures

Figure 1 : Schéma d'un neurone et des différentes parties le constituant .....	7
Figure 2 : Schéma d'une coupe frontale du centre du cerveau (Figure adaptée de icm-institute.org) .....	9
Figure 3 : Schéma de coupes sagittales de cerveaux a) humain et b) murin, avec une représentation des principales régions du cerveau .....	10
Figure 4 : Schéma de protéines endogènes dans leur forme monomérique, sous forme oligomérique, pendant l'agrégation, et sous la forme d'un agrégat fibrillaire (Figure extraite de Cheon, 2015) .....	12
Figure 5 : Schéma représentant différentes étapes du développement de la maladie d'Alzheimer et les anomalies associées. (Figure adaptée de Sperling, 2011) .....	12
Figure 6 : Protéines formant des agrégats fibrillaires et les liens les associant aux phénotypes correspondants. Abréviations : SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique, DFT : Démence Fronto-Temporale, PNM : Pathologie des Neurones Moteurs, DS : Démence Sémantique, ANF : Aphasie Non Fluente, DCB : Dégénération Cortico Basale, PSP : Paralyse Supranucléaire Progressive, APP : Aphasie Phonologique Progressive, DCL : Démence à Corps de Lewy, MP : Maladie de Parkinson, MA : Maladie d'Alzheimer, MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob, SGSS : Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, DFTvc : Démence Fronto-Temporale avec variante comportementale (Image extraite de Villemagne, 2015).....	13
Figure 7 : Images microscopiques d'agrégats fibrillaires de type a) A $\beta$ , b) Tau et c) $\alpha$ -Syn, et schémas de leurs propagations respectives au cours du développement de la pathologie e), f), et g) (Figure extraite de Jucker et al. 2013).....	14
Figure 8 : Microscopie par transmission électronique de fibrilles dont les mères ont été incubées au repos ou avec une légère agitation. Les fibrilles filles et petites-filles ont été préparées respectivement à partir de fragments (noyaux) de fibrilles mères et filles, (Image extraite de Petkova et al. 2005).....	15
Figure 9 : Tissu cérébral humain d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer observé en microscopie confocale. Un marquage à la thioflavine vert indique la présence de fibrilles. Le marquage rouge indique la présence d'oligomères A $\beta$ . Échelle : 20 $\mu$ m (Image extraite de Kaye et al. 2003) .....	16

Figure 10 : Chronologie de l'établissement des mécanismes pathologiques des démences, et des méthodes investiguées dans le cadre de la recherche pouvant y apporter une réponse diagnostique. .... 20

Figure 11: Images of human (on the right) and murine (on the left) brains. On the human brain and on the zoomed murine brain are represented waves of 100 Hz and 1000 Hz respectively, as well as the average width of 10 pixels. Since the human brain is 10 times larger than the murine brain, the imaging frequency is multiplied by 10 in order to probe the same structures in both species. *[Images from the University and Michigan State Comparative Mammalian Brain Collections and from the National Museum of Health and Medicine. Available at: <http://neuroscielibrary.org/index.html>. The preparation of all these images and specimens have been funded by the National Science Foundation and by the National Institutes of Health].* ..... 25

Figure 12: Illustration of different brain MRE set-ups reported in the litterature: 1) Picture of a piezoelectric actuator linked to a bite-bar by a plastic rod, Clayton 2011; 2) schema of a modal actuator driving a vertical piston hitting the back of the the rodent head, Chatelin 2016; 3) electromagnetic actuator driving a vertical piston glued on the mouse skull, Atay 2008; 4) schema of the external transducer transmitting excitation to a nose cone maintained on the mouse head by rubber bands and picture of the nose cone and plots maintaining the mouse head, Patz 2017. Advantages (+) and drawbacks (-) of the actuation transmitters and actuators are listed. Actuation movements are symbolized by orange arrows. .... 27

Figure 13: Summary of the rodent brain areas studied by MRE, labeled as follows: ..... 32

Figure 14 : représentation de la vitesse en fonction de la fréquence dans un gel dans lequel des microbilles rigides ont été incluses. Les courbes représentées ont été ajustées selon une loi puissance pour des densités de billes nulle, de 5 et 10 %. La valeur de l'exposant de la loi puissance  $y$  est indiquée dans la légende (Figure extraite de Lambert et al. 2015) ..... 40

Figure 15 : En haut de l'image, microscopie optique de microvaisseaux à différents jours après leur implantation. Le graphe représente les vitesses normalisées, calculées à partir d'images ERM au niveau des vaisseaux, représentées en fonction de la fréquence d'excitation. L'ajustement paramétrique a été fait selon une loi puissance et les exposants extraits sont indiqués à droite (Figure extraite de Jugé et al. 2015) ..... 40

Figure 16 : Schematic view of 1) the sample holder and 2) the mold used to create inclusions. The different layers of the phantom are represented: 3a) 1% agarose. The mold put on the sample holder was used to create the 4 imprints in which 3b) inclusions were created, containing 1.35% agarose and BSA or fibril solutions. After cooling, 3c) a third layer of 1% agarose was

added. Lastly, 4) a thin layer of paraffin adhering to the edges of the sample holder was poured.

5) A photograph of the phantom in its holder. .... 48

Figure 17 : a) Bright field image of a phantom with a 1x magnification. A needle (presented in Figure 3) mark is shown by a white arrow. b) Macrofluorescence image of an  $\alpha$ -Syn inclusion with a 5X magnification. Green fluorescence, appearing here in white, indicates binding of thioflavin-T to fibrils. In this inclusion, the edges of the inclusion are clearly visible, indicating that no leakage of fibrils has happened. An ROI is drawn, avoiding the edges of the inclusion (white dashed square)..... 49

Figure 18 : Elastography bench dedicated to small samples: 1) a piezoelectric driver for wave generation (APA100M Cedrat Technologies), cooled by 2) an air intake; 3) a star-shaped rod transmitted movement to 4) a cactus needle, in direct contact with the sample; 5) a 36 mm diameter Helmholtz coil and 6) associated coupling loop used for signal acquisition and transmission. 7) The sample holder was slid inside the coil. .... 50

Figure 19 : a) Image of a 20x20x20 mm<sup>3</sup> NiSO<sub>4</sub> sample made with a 32 mm diameter volume coil in quadrature (Bruker, Ettlingen, Germany). A white line shows the direction in which the b) associated SNR profile has been made. c) Profile made in the same direction with the handmade Helmholtz coil used in this study. SNR was  $50 \pm 1$  in the 32 mm coil, i.e. about  $50/\sqrt{2} \approx 35 \pm 1$  without quadrature detection, and  $32 \pm 1$  in the Helmholtz coil. Results were obtained using the MRI characterization tool (Mahieu-Williams, 2019, [https://vip.creatis.insa-lyon.fr/documentation/mri\\_charact.html](https://vip.creatis.insa-lyon.fr/documentation/mri_charact.html)) which is available online through the Virtual Imaging Platform (Glatard, 2013, <https://vip.creatis.insa-lyon.fr/>)..... 51

Figure 20 : MRE unwrapped phase and wave speed obtained at 400 and 1,200 Hz (motion encoding direction orthogonal to the slice). A $\beta$ ,  $\alpha$ -Syn and BSA inclusions and agarose ROIs are represented in green, red, blue and black, respectively..... 53

Figure 21 : Boxplots of a) storage modulus G' and b) wave speed c computed from ROI included in inclusions containing  $\alpha$ -Syn, A $\beta$  fibrils and BSA for frequencies varying between 400 and 1,200 Hz. For each frequency, 11, 10 and 7 values are represented for  $\alpha$ -synuclein, A $\beta$ 40 and BSA, respectively. Each box of the plot contains values from the 25th to the 75th percentile. Maximum and minimum values are symbolized by crosses, mean value by a square and median by a line in the box..... 55

Figure 22 : a) Boxplots of exponent  $\gamma$  for  $\alpha$ -Syn, A $\beta$  and BSA. 11, 10 and 7 values are represented as dots for  $\alpha$ -Syn, A $\beta$  and BSA, respectively. b) Boxplots of phase angle  $\phi$  for  $\alpha$ -Syn, A $\beta$  and BSA inclusions. 11, 10 and 7 values are represented at each frequency for  $\alpha$ -Syn, A $\beta$ 40 and BSA, respectively. Each box of the plot contains values from the 25<sup>th</sup> to the 75<sup>th</sup>



percentile. Maximum and minimum values are symbolized by crosses, mean value by a square and median by a line in the box.....	56
Figure 23: Transmission electronic microscopy of a) $\alpha$ -Syn and b) A $\beta$ fibrils. Scale at the right corner corresponds to 100 nm. ....	57
Figure 24 : Box-plots de $G''$ pour les inclusions d' $\alpha$ -Syn, d'A $\beta$ et de BSA. Respectivement 11, 10 et 7 valeurs sont représentées à chaque fréquence. Les limites de chaque boîte représentent les valeurs du 25 <sup>ème</sup> au 75 <sup>ème</sup> percentile. Les valeurs maximales et minimales sont représentées par des croix, la valeur moyenne par un carré et la médiane par une ligne dans la boîte. ....	61
Figure 25 : Cartographies du paramètre $y$ obtenues par ajustement linéaire des logarithmes du nombre d'onde réel $k_r$ pour chaque pixel, et cartographies associées du coefficient de détermination $R^2$ . Les ROIs représentées en rouge, vert, bleu et noir contiennent respectivement des fibrilles $\alpha$ -Syn, A $\beta$ , de la BSA ou de l'agarose simple. ....	62
Figure 26 : Représentation des exposants de la loi puissance $y$ pour des inclusions de fibrilles $\alpha$ -Syn et A $\beta$ , de BSA et une région d'agarose, obtenus avec un ajustement linéaire pixel à pixel (boîtes hachurées) et avec un ajustement selon une loi puissance sur des moyennes de ROIs. ....	64
Figure 27 : a) Image par RM en magnitude d'un échantillon de fibrine entouré par un gel de paraffine. Deux inclusions contenant des fibrilles A $\beta$ sont contourées en vert et bleu, des ROIs dessinées dans la fibrine sont représentées en jaune et rose, et une ROI a été tracée en cyan dans la paraffine ; b) Cartographie de la vitesse d'onde obtenue à 600 Hz ; c) $y$ moyens calculés dans les inclusions de fibrilles et dans la fibrine ; d) Image de macrofluorescence de l'échantillon, sans la paraffine (grossissement 1x).....	66
Figure 28 : Schéma de la préparation des échantillons, de gauche à droite : injection du cerveau de rat <i>in vivo</i> , après récupération post-opératoire et sacrifice, le cerveau (2)est prélevé, placé dans le porte-échantillon (1). Il est recouvert par de l'agarose à 1 % fabriqué à base de LCS à 40°C (3) et de la paraffine (4). L'image 5 montre une photographie du porte-échantillon contenant un cerveau recouvert de la solution d'agarose. ....	72
Figure 29 : a) Image en lumière blanche d'une lame de cerveau de rat (grossissement 1x), b) Image de macrofluorescence faite avec le même champ de vue et le même grossissement. La fluorescence verte apparaît ici en blanc (pointée par une flèche rouge) et indique la présence de fibrilles liées avec la thioflavine-T. Échelle : 2 mm. ....	73
Figure 30 : à gauche, superposition de l'image RARE anatomique et de l'image de macrofluorescence, les marques roses indiquent les points de repères utilisés pour le recalage des images de macrofluorescence. Les ROIs violette et blanche sont les ROIs utilisées pour	

extraire les paramètres correspondant à l'injection d' $\alpha$ -Syn et à l'injection controlatérale (CL). Ces ROIs sont reportées sur l'image de la partie réelle du nombre d'onde  $k_r$  issue de la reconstruction des images ERM..... 76

Figure 31 : Cartographies de la phase déroulée à 800 Hz (B) et 1200 Hz (B) et du module de cisaillement  $|G^*|$  pour ces mêmes fréquences (C et D), ainsi que le coefficient  $\gamma$  cartographié à partir d'un ajustement linéaire pixel à pixel des cartographies à toutes les fréquences des cartographies  $k_r$  (E), et cartographie des coefficients de corrélation linéaire  $R^2$  associée (F) pour un rat. Les ROIs dessinées sur les cartographies correspondent à l'injection d' $\alpha$ -Syn (rouge), la ROI controlatérale (bleu) et au cerveau entier (noir). ..... 78

Figure 32 : Graphes du module de conservation  $G'$  et du module de perte  $G''$  en fonction de la fréquence d'excitation mécanique chez les 5 rats étudiés, dans la ROI contenant l' $\alpha$ -Syn, la ROI controlatérale (CL) et le cerveau entier (WB). ..... 80

Figure 33 : Diagramme en boîte de l'exposant de la loi puissance  $\gamma$  obtenu à partir d'ajustements des cartographies  $k_r$ , dans le cerveau entier (WB), la ROI contenant l' $\alpha$ -Syn et sa controlatérale (CL). Les valeurs pour chacun des 5 rats sont représentées à droite des boîtes, chaque couleur correspond à un rat particulier..... 82

Figure 34 : Angle de phase  $\varphi$  calculé pour 5 rats dans la région de l'injection d' $\alpha$ -Syn, la région controlatérale ayant reçu une injection de PBS (CL) et le cerveau entier (WB), les boîtes à moustache sont représentées a) séparément pour chaque fréquence d'acquisition (5 valeurs par boîte) et b) avec un regroupement de toutes les fréquences d'acquisition, avec 21 valeurs représentées pour chaque boîte. .... 83

Figure 35 : Module de cisaillement  $|G^*|$  (en kPa) a) pour un rat imagé avec une fréquence d'excitation de 1000 Hz, sur laquelle un anneau avec des très fortes valeurs de  $|G^*|$  ( $> 20$  kPa) et b) pour un rat imagé à 900 Hz et sur laquelle deux flèches noires indiquent des points chauds ( $\approx 25$  kPa). ..... 85

Figure 36 : Graphes des non-linéarités en fonction a) de la fréquence d'excitation et b) de l'amplitude totale, pour les ROIs contenant l'injection d' $\alpha$ -Syn, l'injection controlatérale (CL) et le cerveau entier (WB). Les points colorés en jaune indiquent les acquisitions supprimées de l'ajustement selon la loi puissance. .... 86

Figure 37 : Amplitude des ondes A dans les trois directions x, y et z (correspondant aux directions de lecture, de phase et de coupe, respectivement) et module de cisaillement  $|G^*|$  à 900 Hz. A et  $|G^*|$  ont été calculés dans le cas d'une reconstruction réussie (cas 0) et dans le cas de deux rats (cas 1 et 2) pour lesquels les non-linéarités et l'amplitude étaient importantes. Des flèches rouges pointent des zones où l'amplitude est particulièrement élevée. Les ROIs



indiquées représentent le lieu de l'injection (en rouge), le contrôle controlatéral (en bleu) et le contour du cerveau (en noir). .....	87
Figure 38 : Images de phase non déroulées encodées dans les trois directions de l'espace x, y et z pour un rat (cas 1).....	88
Figure 39 : partie réelle du nombre d'onde $k_r$ en fonction de la fréquence d'excitation pour deux rats (cas 1 et cas 2) dont des acquisitions ont été supprimées lors de l'ajustement selon la loi puissance. Les points posant problème lors d'un ajustement réalisé avec toutes les données sont pointés par une flèche noire .....	89
Figure 40 : Cartographies des écarts relatifs entre les valeurs de $k_r$ pour la première et la deuxième acquisition à 1000 Hz réalisées pour quatre rats dont les deux valeurs ont été utilisées dans des ajustements selon la loi puissance. Les ROIs utilisées pour l'analyse sont représentées sur ces cartographies : cerveau entier en noir, injection d' $\alpha$ -Syn en rouge et injection controlatérale en bleu. ....	91
Figure 41 : Graphes du module de cisaillement en fonction de la fréquence d'excitation évalués dans le cerveau entier (WB) et les deux striatums (S-1 et S-2) dans le cas de deux rats sains.	92
Figure 42 : Exposant de la loi puissance $\gamma$ dans le cerveau entier (WB) et les striatums de chaque hémisphère, dans le cas de deux rats sains.....	93
Figure 43 : a) Image anatomique d'un cerveau <i>ex vivo</i> ayant reçu une injection de LPS (striatum du côté gauche de l'image) ; b) cartographie associée des valeurs du module de cisaillement $ G^* $ (en kPa) pour des acquisitions à 800. Sont représentées les ROIs du cerveau entier (en noir), de l'injection de LPS (en vert) et controlatérale (en bleu). Une flèches rouges indique l'emplacement d'une zone de faible $ G^* $ sur l'image b. ....	95
Figure 44 : Graphe représentant le module de cisaillement $ G^* $ en fonction de la fréquence d'excitation pour un rat injecté avec du LPS, dans le cerveau entier (WB), la zone injectée au LPS et visiblement affectée sur les images IRM anatomiques (LPS) et la ROI dessinée dans le striatum controlatéral, non injecté (CL). ....	95
Figure 45 : a) Module de cisaillement $ G^* $ en fonction de la fréquence d'excitation et b) exposant de la loi puissance $\gamma$ pour différentes zones du cerveau : CC : corps calleux ; C : cortex ; H : région de l'hippocampe ; S : striatum ; TC : tronc cérébral ; WB : cerveau entier. 11 rats au total ont été utilisés, les ROIs n'ont été dessinées pour certains rats que sur certaines zones, on a donc 11, 21, 8, 21, 10 et 8 ROIs exploitées respectivement pour WB, S, CC, H, TC et C (pour H et S, deux ROIs par rat peuvent être dessinées). ....	97
Figure 46 : A) Schéma d'un banc d'élastographie permettant l'imagerie de petits échantillons et l'imagerie de la tête de souris <i>in vivo</i> . B) Zoom sur la partie antenne/porte-échantillon, sur	

laquelle on peut visualiser le dispositif de réglage de la hauteur du coupleur, fonctionnant grâce à un renvoi d'angle, ainsi que les arrivées de gaz et le dispositif de chauffage. C) Détail des boucles constituant l'antenne et le porte échantillon. (Lambert et al. 2019) .....	100
Figure 47 : Image RARE T2 d'une tomate cerise obtenue avec le banc présenté Figure 46. 100	100
Figure 48 : Exposant de la loi puissance $y$ calculé à partir d'un ajustement sur la variable $k_r$ (noté $m_1$ ) et à partir d'un ajustement sur la variable $c$ dans trois régions d'intérêt (noté $m_2$ ) : le cerveau entier (WB), la zone de l'injection de fibrilles ( $\alpha$ -Syn) et la zone d'injection controlatérale (CL) pour 5 rats numérotés sur le graphe de façon arbitraire. ....	102
Figure A 1 : Photographie de l'antenne surfacique avec son boîtier – Image de l'insert emboîté dans son support – Coupe axiale issue d'une acquisition FLASH 3D réalisée sur un échantillon de fibrine homogène maintenu dans un gel de paraffine .....	112
Figure A 2 : Photographie des différents éléments du banc d'élastographie dédié aux petits échantillons.....	113
Figure A 3 : Coupe centrale d'une acquisition FLASH 3D, a) axiale pour un échantillon de fibrine entouré de gel de bougie ; b) coronale pour un cerveau de rat maintenu dans de l'agarose. Les rectangles blancs et rouges sont les ROIs utilisées pour le calcul du SNR.....	113
Figure A 4 : Améliorations proposées pour l'amélioration du banc d'ERM. ....	114
Figure A 5 : Visualisation d'un échantillon d'agarose entouré par de la bougie sur Abaqus. Au centre, l'aiguille. Des contraintes et un premier maillage ont été proposés pour cette simulation. ....	115
Figure A 6 : Fixation de la lamelle vibrante (en peek) à la tige de transmission par l'intermédiaire d'un plot et d'une tige souple à gauche. Banc d'élastographie complet à droite. ....	115
Figure A 7 : Chronogramme de la séquence d'écho de spin utilisée pour l'ERM.....	117
Figure A 8 : Amplitude de la transformée de Fourier mesurée au bout du banc d'élastographie lors d'un balayage en fréquence de 100 à 1200 Hz pour le piézoélectrique. La tension d'entrée avant amplification est de 2 V.....	121
Figure A 9 : Banc d'élastographie <i>in vivo</i> adapté à l'imagerie ERM du cerveau de souris..	123
Figure A 10 : À gauche, image d'une coupe axiale d'un cerveau de souris <i>in vivo</i> (acquisition FLASH, les zones contourées en rouge et blanc indiquent les ROIs utilisées pour le calcul du RSB) et image de phase ERM du même cerveau de souris. ....	123
Figure A 11 : Banc d'élastographie <i>in vivo</i> développé pour rats et souris. ....	124

Figure A 12 : A. Image anatomique RARE d'un cerveau de rat in vivo. B. Image de magnitude et C. image de phase d'une coupe centrale d'une acquisition ERM à 1000 Hz de ce même cerveau. .... 125

# Liste des Tableaux

Table 1: MR acquisition parameters. MRE acquisitions were repeated 3 times at each frequency, with MEGs in slice, phase and read directions (NA, not available). .....	52
Table 2 : Range of mean $\pm$ standard deviation obtained for $G'$ , $c$ and $\phi$ for all investigated frequencies and for $y$ in the agarose ROI, far from all inclusions and in the BSA inclusion, used as control for the evaluation of a fibril effect. ....	56
Table 3 : Paramètres d'acquisitions pour les séquences anatomique et ERM. Les acquisitions ERM ont été répétées 3 fois à chaque fréquence avec les gradients d'encodage du mouvement (GEM) dans la direction de coupe, de phase et de lecture (NA, non applicable). ....	75
Table A 1: Linear mixed-effects model analysis evaluating $G'$ , $\phi$ and $c$ and including the groups $\alpha$ -Syn, $A\beta$ and $\phi$ and frequency as fixed-effect. The phantom used were included as random effect.....	118

# Table des matières

Remerciements .....	i
Résumé .....	ii
Abstract .....	iii
Glossaire .....	iv
Liste des Figures .....	v
Liste des Tableaux .....	xiii
Table des matières .....	xiv
Introduction générale .....	1
<b>Chapitre 1 : Contexte clinique et scientifique.....</b>	<b>5</b>
1.1.    Vers une caractérisation précoce des maladies neurodégénératives .....	6
1.1.1.    Généralités sur le cerveau sain, humain et murin .....	6
1.1.2.    Les démences : enjeux et diagnostic.....	10
1.2.    Élastographie par Résonance Magnétique (ERM) – Application à l’imagerie des démences.....	21
1.2.1.    Bases sur la détection du signal IRM.....	21
1.2.2.    L’ERM cérébrale en préclinique .....	22
<i>Quantification of shear mechanical properties by solving an inverse problem</i> .....	30
1.2.3.    Application de l’ERM à la détection des fibrilles.....	35
<b>Conclusion.....</b>	<b>42</b>
<b>Chapitre 2 : ERM appliquée à la détection des agrégats fibrillaires <i>in vitro</i> .....</b>	<b>43</b>
2.1.    Introduction.....	45
2.2.    Methods .....	47
2.2.1.    Sample preparation.....	47
2.2.2.    Macrofluorescence.....	48
2.2.3.    MRE set-up .....	49
2.2.4.    Post-processing .....	52
2.2.5.    Image analysis .....	52
2.2.6.    Statistics.....	54
2.3.    Results .....	54
2.3.1.    Macrofluorescence results.....	54

2.3.2.	Differences in elastic properties between fibrils and BSA .....	54
2.3.3.	Difference in structural parameters $\gamma$ and $\varphi$ between fibrils and BSA .....	55
2.4.	Discussion .....	57
2.4.1.	Detection of a fibril-specific effect .....	57
2.4.2.	Relevance of multi-frequency study .....	58
2.4.3.	Perspectives for preclinical follow-up .....	59
2.4.4.	Conclusion .....	60
2.5.	Perspectives.....	60
2.5.1.	Échantillons d'agarose.....	60
2.5.2.	Vers une complexification des fantômes .....	65
<b>Conclusion.....</b>		<b>67</b>
<b>Chapitre 3 : ERM pour la détection des fibrilles <i>ex vivo</i> .....</b>		<b>69</b>
<b>ERM pour la détection des fibrilles <i>ex vivo</i> .....</b>		<b>69</b>
3.1.	Introduction.....	70
3.2.	Méthodes .....	71
3.2.1.	Préparation des cerveaux.....	71
3.2.2.	Macrofluorescence.....	73
3.2.3.	ERM .....	74
3.2.4.	Statistiques .....	78
3.3.	Résultats et discussion .....	79
3.3.1.	Effets de l'injection de fibrilles .....	79
3.3.2.	Évaluation de la qualité des données.....	84
3.4.	Perspectives.....	98
3.4.1.	Améliorations des conditions d'acquisition .....	98
3.4.2.	Améliorations de la méthode de reconstruction .....	101
3.4.3.	Amélioration du modèle & acquisitions <i>in vivo</i> .....	103
Conclusion.....		104
<b>Conclusion générale .....</b>		<b>107</b>
<b>Annexe 1 : Procédure d'agrégation des fibrilles .....</b>		<b>111</b>
<b>Annexe 2 : Mise en place du banc d'élastographie <i>ex vivo</i> .....</b>		<b>112</b>
<b>Annexe 3 : Séquence ERM.....</b>		<b>117</b>
<b>Annexe 4 : Résultats d'analyse statistique (fantômes d'agarose).....</b>		<b>118</b>
<b>Annexe 5 : Reconstruction multifréquence .....</b>		<b>119</b>
<b>Annexe 6 : Test mécanique du banc d'ERM <i>ex vivo</i> .....</b>		<b>121</b>

<b>Annexe 7 : développement de bancs d'ERM <i>in vivo</i> .....</b>	<b>123</b>
<b>Publications et communications.....</b>	<b>129</b>
<b>Animation scientifique.....</b>	<b>130</b>
<b>Références .....</b>	<b>131</b>

# Introduction générale

Le vieillissement de la population dans les sociétés occidentales et l'augmentation de la durée de vie au niveau mondial sont des enjeux de santé publique. Parmi les maladies liées au vieillissement, les démences touchent plus de 5 % de la population mondiale chez les plus de 60 ans. Selon les prévisions de l'OMS, 152 millions de personnes devraient en être atteintes en 2050 (Organisation mondiale de la santé 2019). Les démences sont des maladies neurodégénératives qui entraînent la dégradation de certaines fonctions cognitives, conduisent à la dépendance des personnes âgées et leur sont à terme fatales. Les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou la démence fronto-temporale sont des exemples de démences.

Les symptômes de déclin cognitif observés en clinique se manifestent plusieurs années après les premières modifications pathologiques du tissu cérébral. Le méplieiment de certaines protéines endogènes du cerveau et la formation de feuillets  $\beta$ , conduisant à l'agrégation de ces feuillets, précède des dysfonctionnements neuronaux et la perte massive des neurones (Sperling et al. 2011; Teipel et al. 2015). Les protéines endogènes à l'origine des différentes pathologies répertoriées comme les démences (par exemple les protéines amyloïdes  $\beta$  dans le cas de la maladie d'Alzheimer ou  $\alpha$ -synucléine dans le cas de la maladie de Parkinson) ne sont pas les mêmes et ne se développent pas dans les mêmes régions du cerveau (Jucker and Walker 2013). Elles forment cependant toutes des agrégats protéiques caractéristiques, avant l'apparition des signes cliniques de la démence.

Les agrégats de feuillets  $\beta$ , aussi appelés fibrilles ou agrégats fibrillaires, apparaissent donc comme une cible diagnostique. Une détection de la présence de ces agrégats avant le déclenchement du processus de mort neuronale pourrait permettre la mise en place de stratégies de traitement plus précoces et par conséquent plus efficaces. En imagerie, la TEP peut révéler la présence de ces agrégats et sert au recrutement des patients dans des études thérapeutiques (Perani et al. 2019). Des méthodes de dosage des fluides biologiques permettent d'estimer la quantité de fibrilles présentes dans le cerveau (Schindler et al. 2019; Lleó et al. 2015). Le dosage du liquide cérébro-spinal implique une ponction lombaire et est donc invasif. Mais des tests sanguins et salivaires en cours de développements pourraient à terme permettre d'établir la présence de certains agrégats dans le cerveau.

Ces dosages ne permettent toutefois pas la localisation des fibrilles dans le cerveau. Le diagnostic, sans information spatiale, est plus difficile à établir, d'autant plus que plusieurs



types de fibrilles peuvent être présents chez un même patient, et que les co-pathologies sont fréquentes, d'après l'examen neuropathologique des cerveaux.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte, où les méthodes de dosage des fluides, qui ne fournissent pas d'information sur la localisation des agrégats, se développent et paraissent plus accessible en termes de coût que les méthodes d'imagerie sélectives déjà développées pour les protéines agrégées. Nous avons basé notre travail sur l'hypothèse que ces dosages se développeraient à l'avenir. La localisation spatiale des agrégats fibrillaires grâce à une méthode d'imagerie complémentaire, spécifique de leur présence sans pour autant être sélective, permettrait d'obtenir une information supplémentaire et de renforcer le diagnostic. Nous nous sommes donc tournés vers une méthode d'imagerie sensible aux changements de composition du milieu et pouvant refléter cette accumulation d'agrégats fibrillaires.

L'élastographie est une méthode d'imagerie, dont le but est de « palper » virtuellement les tissus. En effet, de nombreux diagnostics passent par la palpation, des tissus plus rigides ou plus mous pouvant indiquer un dysfonctionnement des organes. Les cliniciens n'ayant pas accès aux tissus profonds, ils ne peuvent pas détecter par le toucher la présence d'une tumeur dans les zones profondes du foie, pourtant plus rigides que le reste de l'organe. Afin d'obtenir des informations quantitatives telles que la rigidité ou la viscosité des tissus en profondeur, il est possible de propager une onde mécanique au sein des tissus à caractériser. Le mouvement induit par la propagation des ondes de cisaillement peut ensuite être mesuré par imagerie ultrasonore (Ophir et al. 1991), résonance magnétique (Muthupillai et al. 1995) ou encore optique (Schmitt 1998). Des outils de post-traitement sont utilisés pour déterminer des paramètres de propagation des ondes mécaniques, ou viscoélastiques, permettant de caractériser le tissu.

L'élastographie par ultrasons, première méthode d'imagerie développée à la fin des années 1980, s'est révélée limitée pour l'étude du cerveau à cause de la difficulté de pénétration des ondes ultrasonores qui sont réfléchies par la boîte crânienne. L'élastographie par résonance magnétique (ERM) est une méthode d'imagerie plus récente qui est plus adaptée à l'imagerie du cerveau. Au cours des dernières décennies, l'ERM a démontré sa capacité à discriminer des tissus pathologiques de tissus sains par leurs propriétés mécaniques. Il est par exemple possible de détecter des tumeurs, moins rigides que le tissu cérébral les entourant (Schregel et al. 2017; Kofahl et al. 2017; Hughes et al. 2015; Simon et al. 2013).

L'ERM dynamique est généralement utilisée à une fréquence d'excitation mécanique unique pour évaluer la rigidité et la viscosité des tissus. Une caractérisation des tissus tenant compte

de plusieurs fréquences d'excitation peut pourtant révéler des informations supplémentaires sur la structure microscopique des tissus (Lambert et al. 2015) . En effet, la viscosité et la rigidité des tissus augmentent avec la fréquence d'excitation, selon une loi puissance caractérisée par son exposant, qui semble être sensible à la microarchitecture des tissus.

L'ERM a déjà été utilisée dans plusieurs études mono-fréquentielles sur les démences et les fibrilles, mais les résultats ne permettaient pas d'attribuer aux fibrilles seules les modifications des paramètres mesurés observées (Murphy et al. 2016, 2011, 2012; Gerischer et al. 2018; Munder et al. 2018; Majumdar et al. 2017). De par leur architecture microscopique composée de feuilletts  $\beta$  répétés, les fibrilles ont une structure pseudo-fractale (Lazzari et al. 2016) qui pourrait avoir des propriétés dispersives (modification de la dépendance en fréquence des propriétés mécaniques dans les tissus) et donc un effet sur l'exposant de cette loi puissance.

Durant cette thèse, nous nous sommes attachés à évaluer l'effet des fibrilles sur la propagation des ondes en ERM multi-fréquentielle. De manière à démontrer l'existence d'une variation de signal spécifique aux fibrilles, elles ont été étudiées dans un fantôme d'agarose peu dispersif dans un premier temps. L'effet des fibrilles sur le signal pourrait être masqué par la présence de nombreux phénomènes physiopathologiques des démences, comme la mort neuronale ou la présence d'inflammation, mais aussi par la présence d'éléments cérébraux possédant eux aussi des caractéristiques quasi-fractales (éléments de la matrice extracellulaire, fibres neuronales, vaisseaux sanguins...). Une seconde étude sur des cerveaux de rats injectés localement avec des fibrilles, sans mort neuronale ou inflammation massive, a été menée pour vérifier si les variations de signal mises en évidence dans des fantômes pouvaient être identifiées dans ce milieu plus complexe et plus proche des modèles de souris transgéniques ou des patients.

Ce manuscrit se présente en trois parties. Dans la première partie, le contexte scientifique de l'étude est décrit. Une présentation des démences et de leurs méthodes diagnostiques est faite, suivie par l'état de l'art de l'ERM chez le petit rongeur, sous forme d'un article de revue. Dans cette partie, il est aussi fait une description de l'ERM multifréquence et de son utilisation pour la détection de structures microscopiques. Une deuxième partie décrit les travaux réalisés afin de détecter des fibrilles dans des fantômes d'agarose et démontre que cette méthode d'imagerie permet d'établir une différence entre des protéines non agrégées et des fibrilles dans un environnement simple. Un second article récemment accepté constitue la plus grande partie de ce chapitre, qui est complété par des données non publiées, mais qui ouvrent quelques perspectives. Finalement, dans la dernière partie, nous exposons les expériences menées sur des cerveaux de rats injectés avec des agrégats fibrillaires. Les fibrilles n'ont pas pu être détectées

dans le cerveau de rat *ex vivo*, même si un effet de l'injection sur les paramètres mono-fréquentiels a pu être mis en évidence. Les limitations sont discutées, accompagnées de perspectives de développement pour la suite de ces travaux de recherche.

# Chapitre 1

## Contexte clinique et scientifique

### Sommaire

1.1.	Vers une caractérisation précoce des maladies neurodégénératives.....	6
1.1.1.	Généralités sur le cerveau sain, humain et murin.....	6
1.1.2	Les démences : enjeux et diagnostic.....	10
1.2.	Élastographie par Résonance Magnétique (ERM) – Application à l’imagerie des démences.....	21
1.2.1.	Bases sur la détection du signal IRM.....	21
1.2.2.	L’ERM cérébrale en préclinique.....	22
1.2.3.	Application de l’ERM à la détection des fibrilles.....	35
	Conclusion.....	42

Dans ce chapitre d'introduction seront présentés dans un premier temps les principaux mécanismes du développement des démences et les méthodes diagnostiques les plus utilisées en routine clinique et dans le domaine de la recherche. Dans un second temps nous introduirons l'élastographie par résonance magnétique dans le cadre d'études sur le cerveau du rongeur. Enfin, nous présenterons plus particulièrement l'élastographie multifréquence et son potentiel dans la caractérisation précoce des démences.

## **1.1. Vers une caractérisation précoce des maladies neurodégénératives**

### **1.1.1. Généralités sur le cerveau sain, humain et murin**

Dans cette première partie, des connaissances de base sur la structure et la fonction des différents éléments constitutifs du cerveau et sur leur organisation en différentes régions anatomiques seront introduites. Ces connaissances serviront de socle à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression des démences et à une meilleure appréhension des méthodes de diagnostic des démences présentées par la suite.

#### ***1.1.1.1. Composition du tissu cérébral***

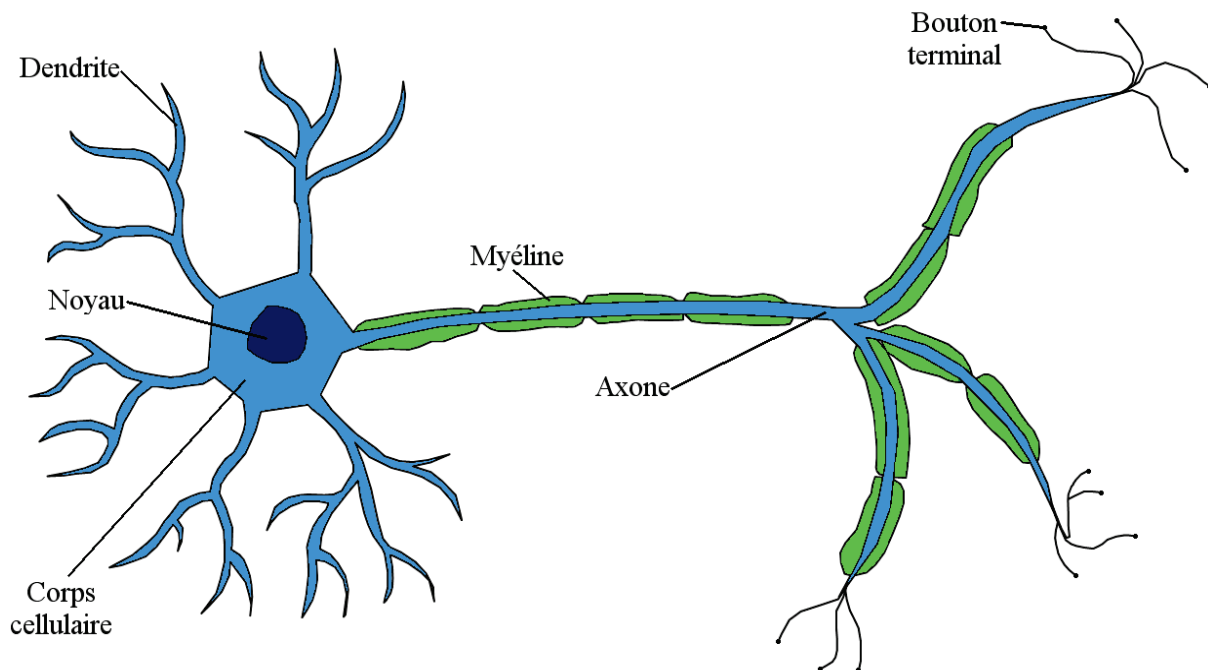
##### **Les cellules**

Le tissu cérébral est composé de cellules spécifiques, dont les plus connues sont les neurones, en charge de l'intégration et de la transmission des informations. Les neurones sont composés de plusieurs parties distinctes (cf. Figure 1) :

- Le corps cellulaire, qui contient le noyau et le cytoplasme de la cellule et dont le diamètre est compris entre 5 et 10  $\mu\text{m}$ . Les messages neuronaux qui transitent par la cellule y sont intégrés, traités et redistribués.
- Les dendrites, qui transportent le signal électrique vers le corps cellulaire du neurone.
- Les axones, qui propagent les informations sous forme de signal électrique, vers d'autres cellules. Ce sont de longues fibres qui peuvent atteindre 1 m de long. Elles ont un diamètre compris entre 5 et 120  $\mu\text{m}$  et comportent de nombreuses ramifications (jusqu'à 10 000 terminaisons) se finissant par un bouton terminal. Ce bouton est placé en regard de terminaisons d'autres neurones (axones ou dendrites).

Les neurones communiquent entre eux dans cet espace appelé synapse en transformant le signal électrique en signal chimique : des molécules chimiques ou neurotransmetteurs sont émis du bouton terminal dans l'espace extracellulaire et sont récupérés par la terminaison qui se trouve en regard.

Dans le cerveau, les neurones sont entourés par des cellules gliales, (diamètre compris entre 1



**Figure 1 : Schéma d'un neurone et des différentes parties le constituant**

et 10  $\mu\text{m}$ ) 10 à 50 fois plus nombreuses que les neurones, et responsables de l'homéostasie du cerveau. Elles jouent un rôle immunitaire, ainsi que de support et de protection pour les neurones. Elles forment en effet un intermédiaire entre le sang et les neurones, elles éliminent les déchets issus du métabolisme neuronal, assurent la nutrition des neurones et forment la barrière hémato encéphalique, qui protège le cerveau de toxines en empêchant la transmission de nombreux éléments du sang vers les neurones. Les cellules gliales sont aussi impliquées dans le fonctionnement des axones. Ainsi, elles forment une gaine de myéline, une substance grasseuse et blanche, autour de certaines fibres neuronales, contribuant à accélérer la propagation de l'influx nerveux le long du neurone.

### **La matrice extra cellulaire**

Dans les interstices entre les différentes cellules du cerveau se trouve la matrice extracellulaire, composée de plusieurs types de macromolécules qui régulent leur activité (croissance, adhésion...). Ces macromolécules forment des fibres de diamètres et de longueurs variés qui, entrecroisées, assurent une fonction de soutien « architectural » des cellules cérébrales (Ruoslahti 1996; Lei et al. 2017).

### **Le liquide cérébro-spinal**

Le liquide cérébro-spinal (LCS) est un fluide clair fabriqué de façon continue dans des cavités du cerveau, les ventricules. Ce liquide entoure l'ensemble du cerveau, assurant ainsi sa protection mécanique. Il circule aussi dans le canal central de la moelle épinière. Il est en communication avec le milieu extracellulaire et assure le maintien de sa composition (Lei et al. 2017). En effet il contribue à l'évacuation des métabolites « déchets » produits par le cerveau. Sa composition reflète donc l'état physiopathologique du cerveau. Le LCS, continuellement renouvelé, est évacué par le système veineux du cerveau.

### **La vascularisation**

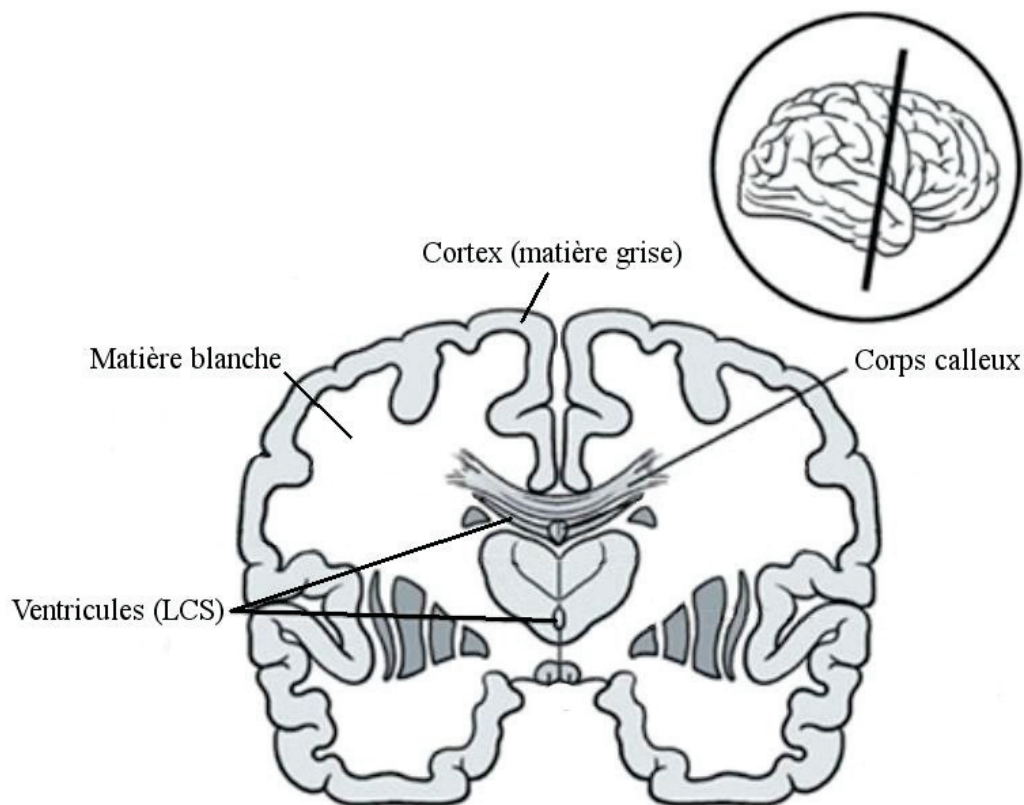
Le cerveau est un grand consommateur de glucose mais ne stocke pas de réserve, il assure donc sa nutrition grâce à une vascularisation importante : 3 à 5 % du volume du cerveau est occupé par le système sanguin (Lei et al. 2017). Comme dans le reste du corps, des artères au diamètre important se ramifient en vaisseaux de plus en plus petits répartis dans l'ensemble du volume cérébral.

#### ***1.1.1.2. Structure du cerveau***

La proportion d'espace occupée par chaque type de cellule et la composition de la matrice extracellulaire ou l'orientation des axones diffèrent selon les régions du cerveau. Cette différenciation régionale permet d'identifier des zones anatomiques ayant chacune une fonction et des caractéristiques physiologiques bien particulières. Dans cette section, des notions d'anatomie utilisées dans la suite du manuscrit seront introduites.

### **Le cerveau humain**

Le cerveau est composé de deux hémisphères, gauche et droite, symétriques. Ces deux hémisphères sont reliés par un large faisceau neuronal qu'on appelle le corps calleux ainsi que par le cervelet, situé à l'arrière du cerveau (cf. Figure 2).



**Figure 2 : Schéma d'une coupe frontale du centre du cerveau (Figure adaptée de icm-institute.org)**

On trouve deux types de tissus dans le cerveau, qui diffèrent par leur composition. Tout d'abord, la matière grise contient un grand nombre des corps cellulaires des neurones ainsi que des dendrites et des axones, myélinisés ou non. Cette matière grise se situe principalement sur la partie la plus externe du cerveau, dans une zone appelée cortex. La matière blanche quant à elle compose la plus grande partie du cerveau, elle est majoritairement composée de longs axones myélinisés qui lui confèrent son nom. Les fibres myélinisées sont regroupées dans différentes zones, anatomiques et fonctionnelles du cerveau, dont la composition et la densité cellulaire, l'orientation des fibres et le type de neurotransmetteurs émis peuvent varier. On retrouve par exemple dans la substance noire, située à la base du tronc cérébral, des neurones de type dopaminergique, dont le neurotransmetteur est impliqué dans le contrôle des mouvements. Ces différences de composition et d'organisation des tissus ont des conséquences sur leurs propriétés physiques, notamment mécaniques, qui alimentent le contraste de diverses méthodes d'imagerie. Les ventricules, producteurs de LCS, contiennent seulement du liquide et se situent dans les parties



centrales du cerveau. La localisation de plusieurs zones mentionnées dans la suite du manuscrit est indiquée sur la Figure 3a.

### Le cerveau murin

L'architecture du cerveau des rongeurs est globalement similaire à celle du cerveau humain. On y retrouve la séparation des deux hémisphères, l'organisation en matières blanche et grise, la présence de ventricules ainsi que des principales zones du cerveau (cf. Figure 3b). Ces similarités anatomiques et fonctionnelles, ainsi que l'existence de nombreux modèles transgéniques de pathologies font des rongeurs, en particulier de la souris, des modèles adaptés pour l'étude de la physiopathologie du cerveau.

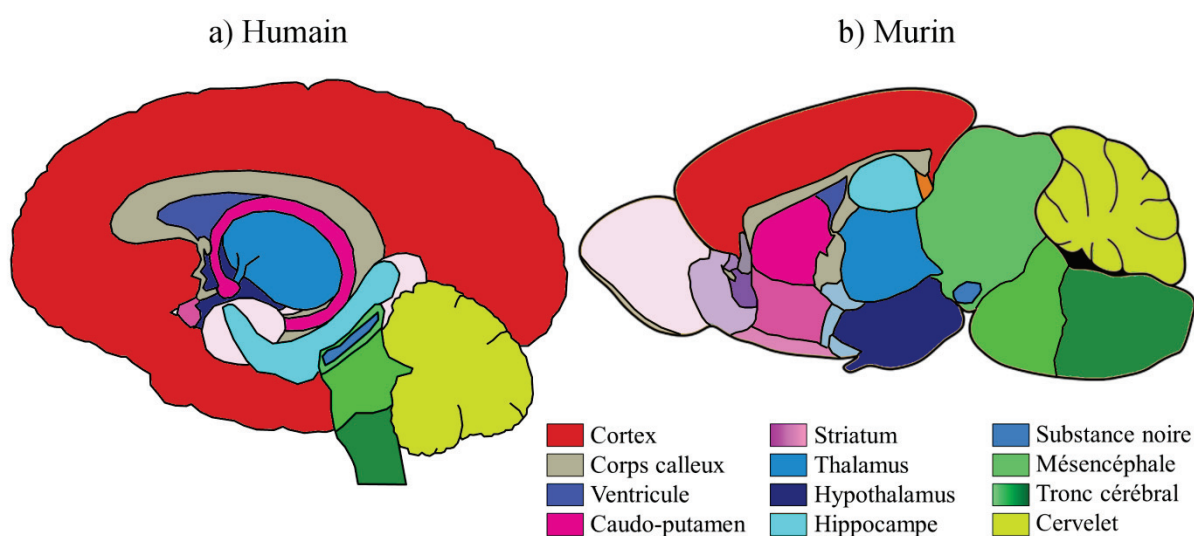


Figure 3 : Schéma de coupes sagittales de cerveaux a) humain et b) murin, avec une représentation des principales régions du cerveau

## 1.1.2. Les démences : enjeux et diagnostic

Dans cette partie, les principaux signes cliniques et mécanismes pathologiques conduisant au développement des démences sont présentés. L'intérêt et les limites de plusieurs techniques diagnostiques disponibles en routine clinique, mais aussi développées en recherche clinique et préclinique seront exposés. Les exemples se focaliseront sur les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, dont certains agrégats protéiques caractéristiques ont été reproduits et utilisés au cours de ce travail de thèse (chapitres 2 et 3).

### **1.1.2.1. *Signes cliniques et enjeux socio-économiques des démences***

La démence est un syndrome touchant aujourd'hui 50 millions de personnes dans le monde. Elle provoque une altération des fonctions cognitives comme la mémoire, le raisonnement ou le comportement et mène à l'installation progressive de handicaps et au développement de la dépendance des patients. La démence représente ainsi un enjeu social et économique important dans une société vieillissante ; l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime le coût sociétal total de la démence à 1.1 % du PIB mondial (Organisation mondiale de la santé 2019). La démence est observée chez des patients atteints de diverses maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy ou la démence fronto-temporale... L'existence de formes mixtes complique le diagnostic et donc la prise en charge précoce, pourtant nécessaire au maintien de la qualité de vie des patients. En routine clinique, aucun test de dépistage à grande échelle n'existe à ce jour. Le diagnostic, proposé à des patients présentant des troubles cognitifs légers, est constitué d'un entretien, d'un examen clinique et d'évaluations fonctionnelles et cognitives, qui peuvent être complétés par des examens biologiques afin d'éliminer d'autres causes à la présence de troubles, et par une imagerie morphologique du cerveau (Petitprez et al. 2011). Plusieurs méthodes diagnostiques présentées dans les parties suivantes et liées à la physiopathologie des maladies neurodégénératives, utilisées en routine clinique mais aussi au cours de protocoles de recherche, pourraient mener vers l'établissement d'un diagnostic plus précoce et plus précis.

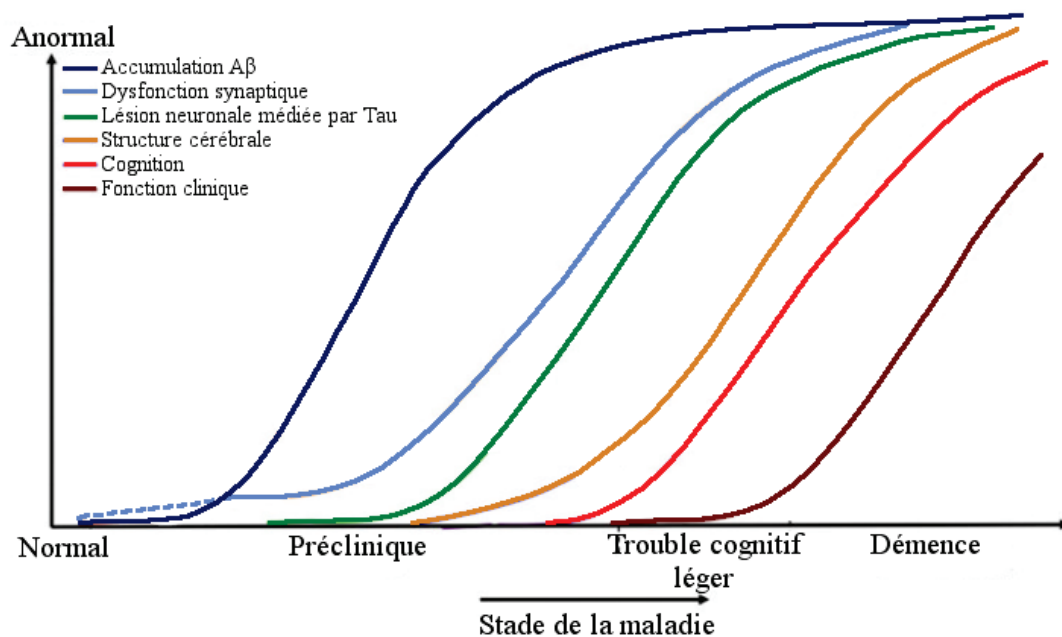
### **1.1.2.2. *Les fibrilles, une structure commune au niveau microscopique***

Les modifications pathologiques associées au développement des démences (inflammation, démyélinisation, lésions neuronales... ) commencent plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes (Sperling et al. 2011). Parmi elles, un changement de conformation et une agrégation de protéines cérébrales endogènes, habituellement monomériques, va conduire au méplieiment de ces protéines en feuillets  $\beta$ . La nouvelle conformation adoptée par les protéines mène à leur agrégation en un noyau oligomérique. Les oligomères s'allongent ensuite en provoquant le méplieiment puis l'agrégation de protéines endogènes de leur environnement (Cheon, Hall, and Chang 2015; Seelaar et al. 2010; Braak et al. 2003; Nelson et al. 2012; Jucker and Walker 2013). Les agrégats formés, appelés fibrilles, sont représentés sur la Figure 4.



**Figure 5 : Schéma de protéines endogènes dans leur forme monomérique, sous forme oligomérique, pendant l'agrégation, et sous la forme d'un agrégat fibrillaire (Figure extraite de Cheon, 2015)**

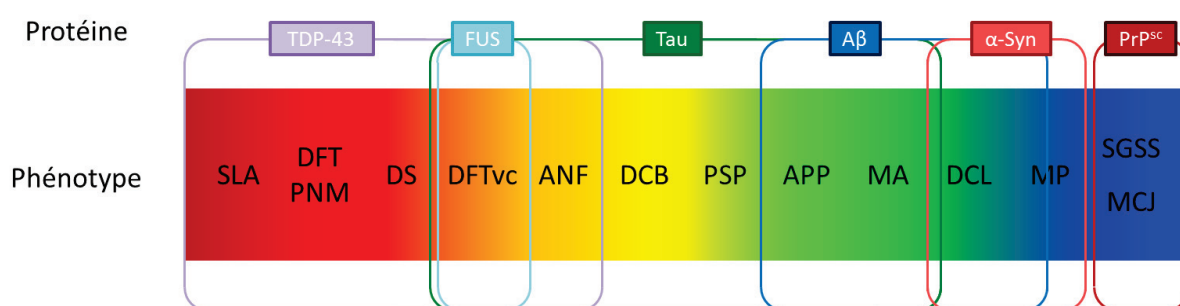
L'hypothèse selon laquelle la formation de ces fibrilles serait le premier signe annonciateur des démences est confortée par de nombreuses études (Zheng, He, and Hong 2010; Lleó et al. 2015; Frost and Diamond 2010; Teipel et al. 2015; Irvine et al. 2008). Elle précéderait l'apparition de dysfonctionnements neuronaux puis d'une dégénérescence neuronale conduisant à une modification de la structure cérébrale et finalement à l'apparition de troubles de la cognition et des symptômes de la maladie. La Figure 5 présente la chronologie hypothétique des différents phénomènes pathologiques rapportés pour la maladie d'Alzheimer. La formation de fibrilles de type  $\beta$ -Amyloïde ( $A\beta$ ) dans la matrice extracellulaire de la matière grise et leur accumulation sous forme de plaques au début du stade prodromique en est la première étape. Les protéines Tau formeraient plus tard des fibrilles à l'intérieur des neurones, provoquant ainsi des lésions neuronales.



**Figure 4 : Schéma représentant différentes étapes du développement de la maladie d'Alzheimer et les anormalités associées. (Figure adaptée de Sperling, 2011)**

De par leur apparition précoce et leur rôle présumé dans les démences, les fibrilles constituent à la fois une cible diagnostique et une cible thérapeutique potentielle.

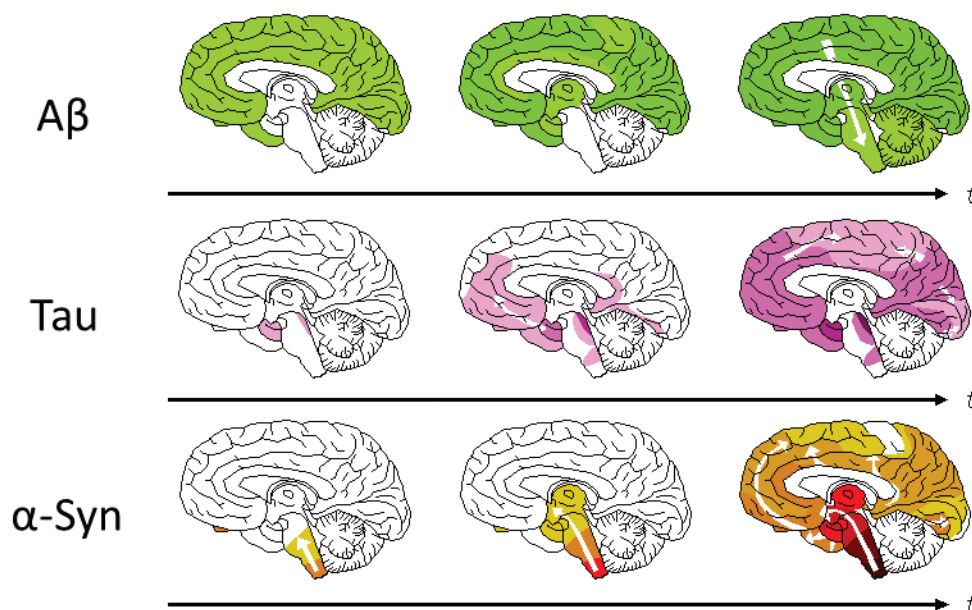
Ces dernières années a émergé une conception unifiée des démences, fondée sur l'examen neuropathologique du tissu cérébral. Selon la pathologie concernée, différents types de protéines endogènes vont être impliqués dans la formation de fibrilles. Sur la Figure 6 sont représentées les différentes protéines fibrillaires ainsi que le phénotype associé. Les recouvrements entre les différents phénotypes, qui contribuent à compliquer le diagnostic, y apparaissent clairement. On remarque que la protéine  $\alpha$ -Synucléine ( $\alpha$ -Syn), impliquée dans la maladie de Parkinson (MP) et la démence à corps de Lewy (DCL), est fréquemment présente dans la maladie d'Alzheimer (MA).



**Figure 6 : Protéines formant des agrégats fibrillaires et les liens les associant aux phénotypes correspondants. Abréviations : SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique, DFT : Démence Fronto-Temporale, PNM : Pathologie des Neurones Moteurs, DS : Démence Sémantique, ANF : Aphasie Non Fluente, DCB : Dégénération Cortico Basale, PSP : Paralyse Supranucléaire Progressive, APP : Aphasie Phonologique Progressive, DCL : Démence à Corps de Lewy, MP : Maladie de Parkinson, MA : Maladie d'Alzheimer, MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob, SGSS : Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, DFTvc : Démence Fronto-Temporale avec variante comportementale (Image extraite de Villemagne, 2015)**

Les différentes protéines impliquées semblent se comporter comme des prions : des protéines présentant des défauts de conformation spontanés, parfois liés à des mutations génétiques, sont capables d'induire le méplieiment pathologique des protéines endogènes saines de leur voisinage (Frost and Diamond 2010). Il y a donc une propagation des agrégats fibrillaires au fil du temps. L'origine des différents types de fibrilles et donc leur localisation dans le cerveau au début de la maladie change (Jucker and Walker 2013). Les fibrilles A $\beta$ , retrouvées dans la matière grise des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, envahissent d'abord le cortex, puis se répandent vers les zones intérieures du cerveau. À l'inverse, les fibrilles  $\alpha$ -Syn, caractéristiques des maladies de Parkinson, apparaissent dans le tronc cérébral et migrent ensuite vers les parties les plus extérieures du cerveau. Les protéines Tau sont d'abord repérées sous l'hippocampe puis se répandent dans le cortex par l'avant du cerveau (cf. Figure 7).

En plus de ces différences d'implantation, la structure des agrégats, bien que fondée sur une

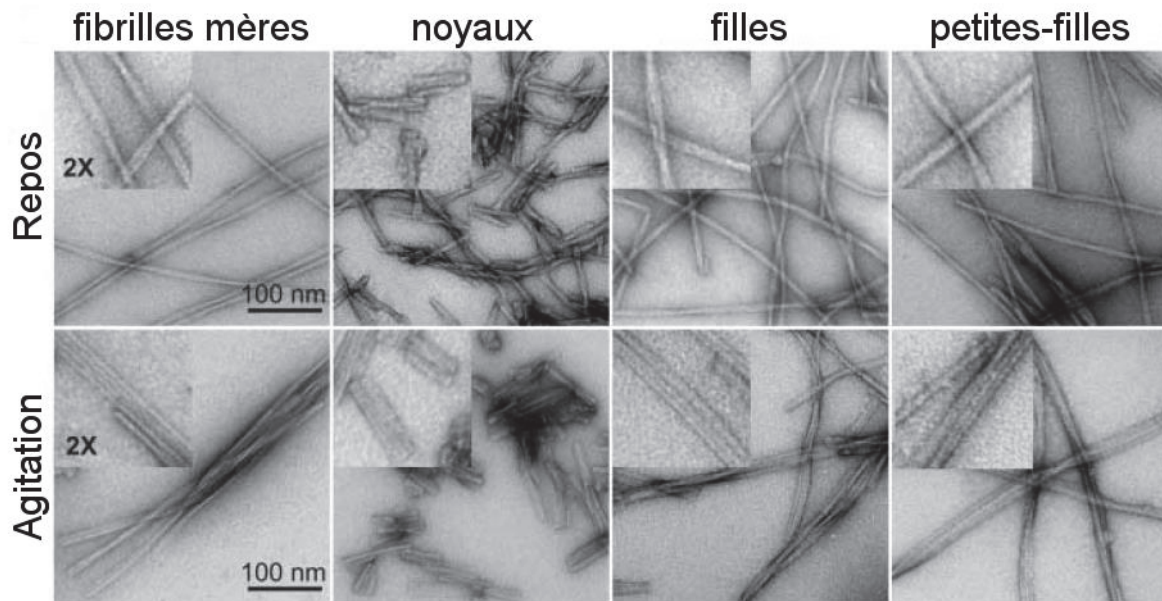


**Figure 7 : Images microscopiques d'agrégats fibrillaires de type a)  $A\beta$ , b) Tau et c)  $\alpha$ -Syn, et schémas de leurs propagations respectives au cours du développement de la pathologie e), f), et g) (Figure extraite de Jucker et al. 2013)**

brrique commune, peut varier en fonction de la protéine impliquée ou des conditions d'agrégation. Sur la Figure 8 on peut voir plusieurs architectures d'agrégats  $A\beta$  préparées dans différentes conditions : les fibrilles mères de la partie supérieure de l'image ont été incubées au repos, alors que les fibrilles de la partie inférieure ont été incubées avec une légère agitation. Les agrégats descendant des  $A\beta$  incubées au repos forment des nœuds à intervalles réguliers avec les autres fibrilles alors que les descendants des agrégats incubés avec agitation s'associent de façon latérale pour former des multimères (Petkova et al. 2005). Ces différences de structure dans l'assemblage des protéines peuvent donc découler des conditions d'agrégation, qui modifient les affinités locales et donc la structure quaternaire des agrégats, et s'ajoutent aux différences de structure des protéines endogènes. Le morphotype structural peut aussi être transmis *in vitro* à d'autres protéines. La structure des protéines est souvent liée à leur fonction, des différences à ce niveau pourraient donc avoir un impact sur le pouvoir pathogène des fibrilles.



### 1.1.2.3. Méthodes de détection des agrégats fibrillaires



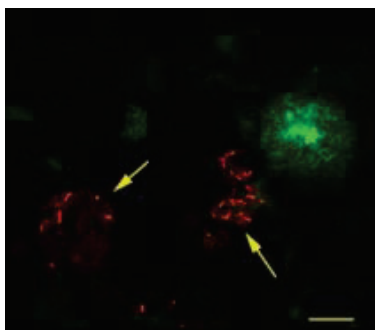
**Figure 8 : Microscopie par transmission électronique de fibrilles dont les mères ont été incubées au repos ou avec une légère agitation. Les fibrilles filles et petites-filles ont été préparées respectivement à partir de fragments (noyaux) de fibrilles mères et filles, (Image extraite de Petkova et al. 2005)**

Plusieurs méthodes visant à l'établissement d'un diagnostic précoce des démences et ciblant les fibrilles ont été développées. Leur intérêt, avantages et inconvénients sont détaillés dans cette partie.

#### Microscopie tissulaire

Des marquages histologiques ou immunohistochimiques peuvent être menés *in vitro* ou *ex vivo*. Ces tests permettent d'établir un diagnostic post-mortem. Ils sont utilisés dans de nombreuses études précliniques pour les comparer à d'autres méthodes diagnostiques ou évaluer l'efficacité de traitements. Les tissus découpés en couches minces sont déposés sur des lames. Des traceurs fluorescents ou radioactifs y sont ajoutés. Ils permettent de révéler les marqueurs d'intérêt en microscopie ou en autoradiographie. Ces marqueurs d'intérêt peuvent indiquer la présence de différents types de cellules cérébrales, d'inflammation ou d'agrégats fibrillaires. Le marquage des fibrilles à la thioflavine, une molécule qui devient fluorescente lorsqu'elle se fixe aux feuilletts  $\beta$  des fibrilles, permet par exemple de révéler la présence de fibrilles matures (cf. Figure 9). Un marquage immunohistochimique peut aussi être réalisé. Il permet de révéler la présence d'agrégats issus d'une protéine endogène particulière, grâce à des anticorps. Par exemple, le marquage rouge sur la Figure 9 cible les agrégats fibrillaires A $\beta$  en

cours de formation, lorsqu'ils sont encore des oligomères. L'histologie peut donc servir de référence comparative *post-mortem* à tous les stades de développement des démences.



**Figure 9 : Tissu cérébral humain d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer observé en microscopie confocale. Un marquage à la thioflavine vert indique la présence de fibrilles. Le marquage rouge indique la présence d'oligomères A $\beta$ . Échelle : 20  $\mu$ m (Image extraite de Kaye et al. 2003)**

### *Imagerie nucléaire pour la détection des fibrilles*

Afin de détecter les agrégats fibrillaires, la Tomographie par Émission de Positons (TEP) est la méthode d'imagerie la plus développée à ce jour. Elle permet de localiser les fibrilles dans le cerveau, grâce à des radiotraceurs spécifiques se liant avec une haute affinité à la structure en feuillets  $\beta$  des fibrilles. Les traceurs sont spécifiques à un type de protéine particulier, par exemple, plusieurs traceurs, comme le PIB, marqué au  $^{11}\text{C}$  ou le florbetapir, marqué au  $^{18}\text{F}$ , se lient aux fibrilles A $\beta$  (Teipel et al. 2015). D'autres traceurs permettent de détecter les protéines Tau agrégées (Perani et al. 2019). De par la diversité des cibles associées aux maladies neurodégénératives, un nombre important de marqueurs spécifiques a été développé, mais certains agrégats comme l' $\alpha$ -Syn restent encore invisibles. Ces traceurs présentent par ailleurs quelques limitations. Les traceurs A $\beta$ , qui permettent de diagnostiquer avec précision la présence ou l'absence de pathologie amyloïde chez des sujets jeunes, voient la prévalence de tests positifs augmenter avec l'âge, que ce soit chez des patients sans atteinte cognitive, ou chez des patients atteints de démence mais pas de la maladie d'Alzheimer. Les traceurs des tauopathies ont pu montrer un manque de sélectivité en dehors de la maladie d'Alzheimer, et peuvent se lier à des structures non fibrillaires dans la région sous-corticale. Finalement, une standardisation des protocoles de TEP pourrait permettre une meilleure quantification des agrégats fibrillaires.

La TEP permet par ailleurs la détection d'anomalies dans le métabolisme du glucose (traceur FDG) probablement liées à une dysfonction des synapses glutaminergiques (Teipel et al. 2015) qui interviendrait après l'accumulation de fibrilles dans de nombreuses maladies neurodégénératives. Les radioligands de la protéine translocatrice TSPO indiquent la présence

de macrophages ou cellules gliales activées, un phénomène neuroinflammatoire qui se retrouve dans l'ensemble des démences (Perani et al. 2019).

Aujourd'hui, la TEP est utilisée pour identifier des patients avec des pathologies amyloïdes ou Tau et les recruter dans des essais thérapeutiques. Il paraît en revanche compliqué d'utiliser cette méthode d'imagerie pour organiser des tests de dépistage à grande échelle, la TEP étant en effet coûteuse, et irradiante, associée à une imagerie scanner.

### **Détection des fibrilles en IRM**

En Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), la résolution spatiale, généralement de l'ordre du millimètre chez l'humain, est habituellement insuffisante pour visualiser directement des structures comme les agrégats fibrillaires, dont la taille est de l'ordre du micromètre. Les fibrilles, et notamment les plaques amyloïdes de la maladie d'Alzheimer, contiennent cependant du fer, qui a un impact sur le signal des tissus. Plusieurs études ont donc été menées chez la souris (Jack et al. 2004) et l'humain, permettant de détecter ces plaques. Cette approche reste limitée par une sensibilité relativement faible, seules des acquisitions à haute résolution spatiales réalisées avec un champ magnétique élevé de 7 T a permis une détection de ces plaques *in vivo* chez l'humain (Nakada et al. 2008).

Un moyen d'augmenter le contraste des images consiste à utiliser des injections de produits de contraste ciblant les fibrilles dans les ventricules, pour identifier des zones contenant de larges plaques amyloïdes (Wadghiri et al. 2013; Sigurdsson et al. 2008). Un produit de contraste non ciblé comme le gadolinium peut aussi être utilisé. Le gadolinium ne peut pas pénétrer dans les plaques amyloïdes mais rehausse le signal des tissus cérébraux. Ce gain de signal permet l'amélioration de la résolution des images IRM à rapport signal à bruit (RSB) constant, tout en indiquant la présence de fibrilles. L'injection de gadolinium peut être pratiquée dans le cerveau de façon stéréotaxique (Petiet et al. 2012), ou en intraveineuse ; une perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique assurée par un faisceau ultrasonore est alors nécessaire (Santin et al. 2013). La perméabilisation de la barrière hémato encéphalique est moins invasive qu'une injection directe dans le cerveau, mais reste délicate à transférer à l'homme.

### **Apports supplémentaires de l'IRM dans l'imagerie des démences**

L'IRM conventionnelle est déjà intégrée à la routine clinique : des images pondérées T1 permettent d'exclure d'autres causes pouvant expliquer les troubles cognitifs constatés : hématome, hydrocéphalie, tumeurs...



Des mesures de volumétrie sont aussi utilisées en recherche clinique à un stade plus précoce, lors de l'établissement des premiers troubles cognitifs. Ces mesures, faites sur l'ensemble du cerveau d'une part, et certaines régions cibles d'autre part (comme l'hippocampe dans la maladie d'Alzheimer), permettent de repérer des modifications du volume de certaines régions cérébrales liées à une mort neuronale importante et prévoir l'évolution des symptômes.

Une autre technique consiste à sensibiliser la séquence IRM au mouvement par diffusion des molécules d'eau. Leur déplacement peut être restreint par la présence de fibres ou de membranes et révéler la structure des tissus. Dans le cas de troubles cognitifs légers, cette technique a révélé qu'une augmentation de la diffusion, probablement liée à une baisse de la densité cellulaire, était associée à un risque d'évolution des troubles en maladie d'Alzheimer (Kantarci et al. 2005).

L'imagerie fonctionnelle permet quant à elle de détecter l'activité neurovasculaire dans certaines régions, grâce à une évaluation du métabolisme neuronal. Cette activité au repos ou lors de l'exécution d'une tâche par le sujet a montré des différences de connectivité neuronale liées à des baisses de performance ou à une compensation par les neurones sains (Fayed et al. 2012).

La spectroscopie par résonance magnétique (SRM) fournit des informations sur le métabolisme. Ces modifications apparaissant probablement en amont des changements structurels, cette méthode peu étudiée pourrait fournir des informations diagnostiques supplémentaires. Dans certaines zones du cerveau, des modifications de la concentration de marqueurs de la densité axonale et neuronale et de la glie ont en effet été rapportées (Teipel et al. 2015). Les résolutions spatiale et temporelle de la SRM sont cependant limitées, ce qui constitue un inconvénient pour l'utilisation de cette méthode.

Enfin, l'élastographie par résonance magnétique (ERM) fournit des informations sur les propriétés mécaniques. Des études ont pu démontrer que le cerveau devenait moins rigide lors du développement des démences, cette baisse de rigidité a été associée à une mort neuronale massive (Freimann et al. 2013; Klein et al. 2014; Hain et al. 2016). Les apports de cette dernière technique pour le diagnostic des démences sont discutés plus en détail dans la partie 1.2.

### **Dosage des fibrilles dans les fluides corporels**

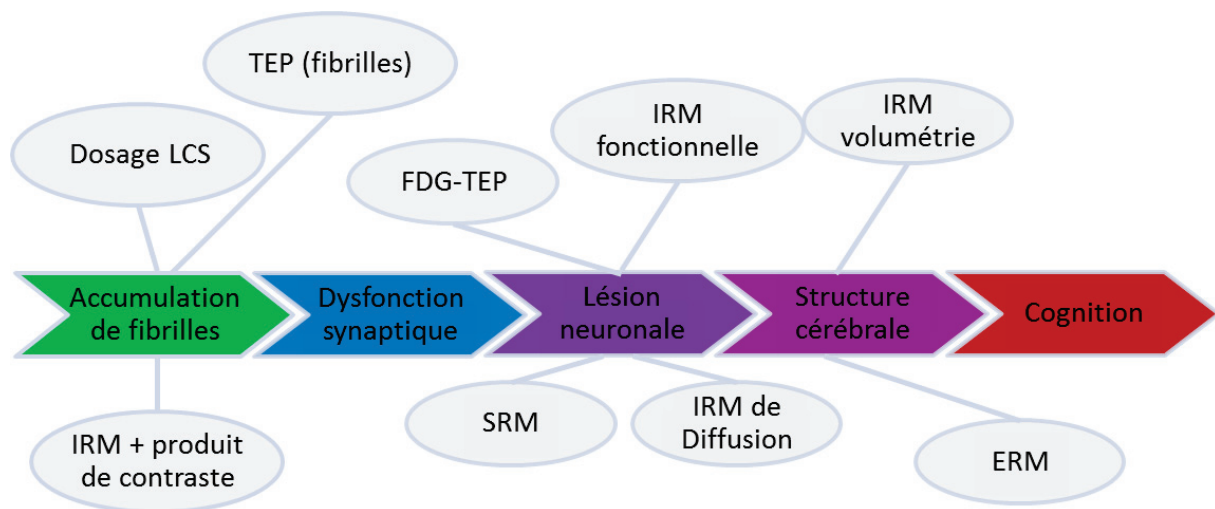
Le liquide cérébro-spinal est un fluide contenant des molécules produites par le métabolisme du cerveau, en lien avec la matrice extracellulaire. Le LCS étant présent à la fois autour du cerveau et dans le canal central de la moelle épinière, il est possible d'en prélever une

partie grâce à une ponction lombaire. L'analyse du contenu du LCS, en particulier le dosage des protéines, permet d'affiner le diagnostic mais a aussi un potentiel pour constituer un test de dépistage précoce (Rosa-Neto, Hsiung, and Masellis 2012; Lleó et al. 2015), les agrégats fibrillaires se développant très tôt dans les démences. Ces tests ont aussi l'avantage de ne nécessiter qu'un prélèvement, alors que la TEP, avec ses multiples traceurs, n'est pas idéale pour ce type de test « à l'aveugle ». Plusieurs inconvénients subsistent cependant : tout d'abord, la ponction lombaire est un examen invasif pouvant induire des complications (céphalées, douleurs lombaires, infections). Des difficultés de standardisation des protocoles empêchent également la définition de valeurs seuils séparant un état pathologique d'un état normal. Des tests sanguins et de salive sont actuellement évalués (Schindler et al. 2019). Plus simples à réaliser, ils pourraient pallier cette limitation (Bermejo-Pareja et al. 2010; Mattsson et al. 2017). Ensuite, les dosages, du LCS aussi bien que de la salive ou du sang, ne fournissent pas d'information sur la localisation des fibrilles, pourtant nécessaire à une bonne interprétation des données puisque les fibrilles ne se développent pas dans les mêmes zones en fonction de la pathologie. Une méthode d'imagerie non invasive et non spécifique à un type de fibrilles serait donc un apport bienvenu en complément du dosage.

### **Conclusion**

Les différentes méthodes de diagnostic présentées dans cette partie et les évolutions pathologiques qu'elles sont capables d'indiquer sont présentées sur la Figure 10. Les méthodes permettant une détection des démences très précoces sont la TEP et le dosage des fluides biologiques, toutes deux axées sur la détection des fibrilles.

La TEP est une méthode efficace pour détecter les fibrilles, mais qui ne paraît pas adaptée pour une application au dépistage de masse dans une population. En effet elle reste chère, nécessiterait de nombreux traceurs sélectifs de chaque protéine potentiellement agrégée, et reste une méthode irradiante, couplée au scanner. Le dosage quant à lui ne permet pas la localisation des fibrilles dans le cerveau. Une méthode d'imagerie spécifique des fibrilles serait donc un apport significatif pour la mise en place de tests de dépistage précoce et non invasif des démences. Nous nous proposons dans la partie suivante de discuter le potentiel de l'ERM dans ce contexte, sur des bases bibliographiques.



**Figure 10 : Chronologie de l'établissement des mécanismes pathologiques des démences, et des méthodes investiguées dans le cadre de la recherche pouvant y apporter une réponse diagnostique.**

## 1.2. Élastographie par Résonance Magnétique (ERM) – Application à l'imagerie des démences

L'élastographie par résonance magnétique ou ERM est une technique d'imagerie IRM permettant de mesurer localement les propriétés mécaniques des tissus. Le principe de l'imagerie ERM ainsi que son utilisation pour l'imagerie du cerveau et des démences dans un contexte préclinique seront présentés dans cette partie.

### 1.2.1. Bases sur la détection du signal IRM

L'ERM est une technique d'imagerie par résonance magnétique, dont les principes ont été décrits de façon extensive dans de nombreux ouvrages (Décorps 2011; Levitt 2001) et qui seront rappelés très brièvement dans cette section.

L'IRM est une méthode d'imagerie qui repose sur une mesure de l'aimantation des échantillons (par exemple tissus biologiques) placés dans un champ magnétique statique. Les noyaux d'hydrogène contenus dans ces échantillons possèdent un moment magnétique élémentaire. Lorsque l'échantillon est placé dans un champ magnétique statique  $B_0$ , les moments magnétiques des différents noyaux créent au niveau macroscopique une aimantation dite longitudinale selon la direction de  $B_0$ . La faible amplitude de cette aimantation ( $10^4$  fois inférieure à celle du diamagnétisme de l'échantillon et de ses électrons) ne permet pas de la mesurer dans cet état d'équilibre. Un champ magnétique oscillant  $B_1$  qui provoque la bascule de l'aimantation macroscopique dans le plan transverse est utilisé. Après cette excitation, l'aimantation retourne à l'état d'équilibre. En fonction de l'environnement des noyaux, c'est-à-dire en fonction des propriétés physico-chimiques du tissu, la vitesse de retour de l'aimantation à l'équilibre, ou vitesse de relaxation, varie. C'est cette différence qui est à l'origine du contraste en IRM. Le retour à l'équilibre de l'aimantation transversale est mesuré pendant la période de relaxation sous forme d'un signal radiofréquence aux bornes d'un capteur ou bobine, dont la géométrie varie pour s'adapter à la morphologie de la zone à imager. De façon générale, les bobines de réception ont une géométrie qui leur permet d'être le plus près possible de la zone à imager, afin de maximiser le facteur de remplissage, c'est-à-dire le rapport entre l'énergie contenue dans l'échantillon et celle contenue dans la bobine. En d'autres termes, cette quantité est maximale quand elle suit parfaitement la forme de l'échantillon à imager.

La localisation spatiale du signal est accessible grâce à l'application de champs magnétiques qui varient linéairement. Appelés gradients, ils permettent d'encoder spatialement le signal. Après une transformée de Fourier inverse, le signal recueilli forme finalement une image complexe, dont on peut extraire une image de magnitude et une image de phase.

L'ERM est une technique d'IRM particulière, pour laquelle le contraste est encodé dans l'image de phase. La partie suivante revient sur les contraintes particulières liées à ce type d'imagerie, les développements techniques associés et les différents domaines d'application de cette technique pour l'imagerie du cerveau des rongeurs.

### 1.2.2. L'ERM cérébrale en préclinique

Depuis toujours, les médecins ont utilisé la palpation pour établir le diagnostic de certaines maladies. Aujourd'hui encore, la palpation de la poitrine ou de la prostate est recommandée afin de détecter l'apparition de tumeurs, généralement plus rigides que les tissus environnants. L'appréciation des propriétés mécaniques des tissus par palpation reste cependant purement qualitative, et ne permet pas d'accéder aux tissus profonds en dehors des opérations. Une méthode permettant d'évaluer *in vivo* les propriétés mécaniques des organes non accessibles à la palpation, l'élastographie ultrasonore, a été développée à la fin des années 1980 (Ophir et al. 1991; Lerner et al. 1988) pour mesurer la déformation des tissus. En effet, en élastographie, une contrainte, dynamique ou statique, est appliquée aux tissus. À partir de cette mesure de déformation, des paramètres donnant des informations sur l'élasticité ou la viscosité des tissus peuvent être déduits. Le principe de l'élastographie a été étendu à l'IRM au cours des années 1990 (Muthupillai et al. 1995; Lewa 1991). L'IRM n'est pas limitée par la présence d'obstacles rigides comme les os ou la boîte crânienne, contrairement aux ultrasons, et, après validation de la méthode sur le foie (Rouvière et al. 2006) les premières études menées sur des cerveaux de rongeurs (Atay et al. 2008) ou humains (Klatt et al. 2007) en ERM n'ont pas tardé à faire leur apparition. La majorité des études sur le cerveau se sont consacrées à l'étude du cerveau humain, bénéficiant du développement d'excitateurs commerciaux<sup>1</sup>, accompagnés d'algorithmes de post-traitement. Des études sur le petit animal ont aussi été menées. Cette partie présente un article de revue de la littérature « Magnetic Resonance Elastography of Rodent Brain » M. Bigot, F. Chauveau, O. Beuf, S. A. Lambert. Magnetic Resonance Elastography of Rodent Brain. *Frontiers in Neurology* 2018; 10.3389/fneur.2018.01010 qui a

---

<sup>1</sup> Resoundant, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

été publié dans sa forme finale sur [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6277573/>]. Cet article est en accès libre, l'utilisation, la distribution ou la reproduction sous d'autres formes est autorisée sous condition de citation, en accord avec la licence Creative Commons Attribution License (CC-BY). Cet article est un état de l'art de l'ERM du cerveau chez le rongeur. Le résumé de l'article est traduit en français ci-dessous.

L'élastographie par résonance magnétique (ERM) est une technique d'imagerie non invasive qui utilise la propagation d'ondes mécaniques comme sonde pour palper les tissus biologiques. Elle comprend trois étapes principales : la propagation d'ondes de cisaillement à l'intérieur du tissu ; le codage des déplacements tissulaires subséquents dans les images de résonance magnétique ; et l'extraction des paramètres mécaniques à l'aide de méthodes de reconstruction spécifiques. Ces trois étapes nécessitent un actionneur mécanique fonctionnant dans la gamme des fréquences acoustiques, une acquisition d'imagerie par résonance magnétique et un outil de post-traitement, pour lequel aucune technologie clé en main n'est disponible. L'objectif de la présente étude est de faire un état de l'art des dispositifs expérimentaux utilisés pour étudier les propriétés mécaniques du cerveau des rongeurs. L'impact des conditions expérimentales, du dimensionnement du dispositif (longueur d'onde et amplitude de l'onde propagée, résolution spatiale et rapport signal/bruit de l'acquisition) sur la précision des paramètres extraits est discuté, ainsi que l'influence des différentes séquences d'imagerie, scanners IRM, bobines et algorithmes de reconstruction.

Enfin, l'efficacité de l'ERM pour établir des différences viscoélastiques entre les différentes structures constituant le cerveau physiologique des rongeurs ainsi que les changements des paramètres cérébraux dans des conditions pathologiques est résumée. Le lien récemment établi entre les propriétés biomécaniques du cerveau telles qu'obtenues en ERM et les facteurs structurels évalués par histologie est également étudié. La présente étude vise à donner un aperçu accessible de la manière de mener une expérience d'élastographie et du potentiel de cette technique comme source d'information précieuse pour les neuroscientifiques.

### 1.2.2.1. Introduction

Elastography is an imaging technique which derives mechanical property maps from a visualization of shear waves propagating within soft biological tissues. Originally developed in 2D using ultrasound imaging (Ophir et al. 1991), elastography rapidly came to be associated to magnetic resonance imaging (MRI) methods, which have the advantage of visualizing shear waves in 3D (Muthupillai et al. 1995). Magnetic Resonance Elastography (MRE) requires several basic experimental steps: i) a mechanical actuator to generate shear waves within the biological tissue; ii) encoding of consequent tissue displacements in the phase of MR images, using Motion Encoding Gradients (MEG); and iii) inversion of the motion equation for each voxel of the images, using a dedicated reconstruction method.

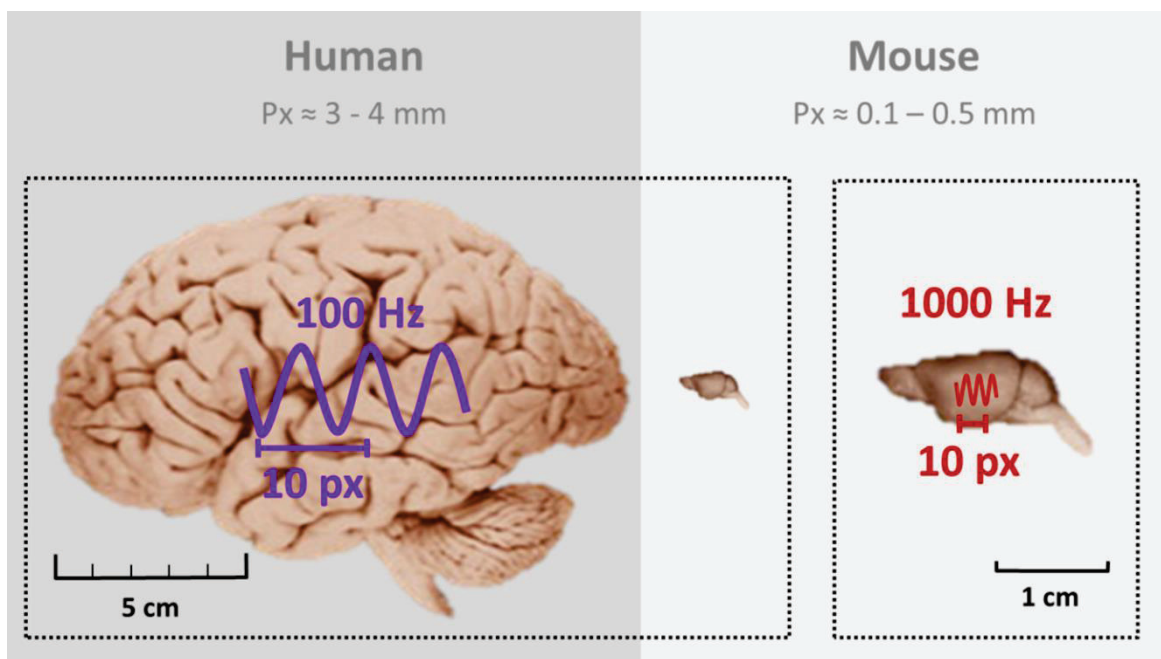
Elastography provides similar information to palpation, and the mechanical properties measured *in vivo* are derived from rheological models. Compared to other MRI methods, MRE-derived parameters provide the largest “variations [...] over 5 orders of magnitude among various physiological states” (Mariappan, Glaser, and Ehman 2010), making MRE sensitive to various kinds of microscopic change (Verdier 2003), and turning MRE into a unique non-invasive tool able to probe tissue at a microscopic scale (Lambert et al. 2015; Sack et al. 2011). In the last decade, MRE has shown itself particularly useful for studying the brain, as both palpation and ultrasound elastography are prevented by the presence of the skull. Several studies in humans reported physiological differences between brain areas, along with alterations in viscoelastic parameters in various diseases (tumor, hydrocephalus and neurodegenerative disease) recently reviewed in (Hiscox et al. 2016; Murphy, Huston, and Ehman 2017). These proof-of-concept studies motivated application of MRE in rodents as a crucial step to identify the pathophysiological processes underlying changes in viscoelasticity (Atay et al. 2008). As of today, this powerful noninvasive technique has provided first *in vivo* mechanical characterizations of healthy and pathological rodent brain even though disparity in results can be pointed out. The goal of this review is to present pros and cons of the diverse actuation, imaging and inversion methods developed so far as well as some important results drawn out in the field of rodent brain MRE, in order to identify the remaining obstacles to pulling this field out of the hands of expert only.



### 1.2.2.2. *In vivo rodent brain MRE*

#### Dimensioning MRE experiments

The accuracy and precision of MRE reconstruction methods inherently depends on the wavelength and amplitude of the propagating wave, the size of the biological structures, and the spatial resolution and signal-to-noise ratio (SNR) of the MRE acquisition. Therefore, as reported in two studies of the quality of MRE-reconstructed data, MRE experimental parameters have to present: a wavelength-to-pixel-size ratio of 15 to 30 (Papazoglou et al. 2008) or 6 to 10 (Yue et al. 2017), depending on the reconstruction technique; a minimum phase accrual induced by motion encoding (i.e., wave amplitude) about 10-fold higher than the standard deviation of the phase noise; and, like in morphological MRI, a minimum number of pixels per unit length to image the structure of interest. For rodent MRE, a brain size of about 1 cm implies a working frequency of about 1,000 Hz, i.e. a wavelength of 1 to 2.5 mm. To satisfy the previous wavelength-to-pixel-size ratio criteria, the spatial resolution needs to be in the range of 0.1x0.1 to 0.5x0.5 mm<sup>2</sup>. Wave amplitude should range between a few micrometers and 40 μm. Figure 11 illustrates frequency and resolution relationship in human and mice brain.



**Figure 11: Images of human (on the right) and murine (on the left) brains. On the human brain and on the zoomed murine brain are represented waves of 100 Hz and 1000 Hz respectively, as well as the average width of 10 pixels. Since the human brain is 10 times larger than the murine brain, the imaging frequency is multiplied by 10 in order to probe the same structures in both species. [Images from the University and Michigan State Comparative Mammalian Brain Collections and from the National Museum of Health and Medicine. Available at: <http://neuroscielibrary.org/index.html>. The preparation of all these images and specimens have been funded by the National Science Foundation and by the National Institutes of Health].**



### *MRE transducer*

For monochromatic wave propagation in the brain, the rodent head should be kept immobilized, with permanent contact with the actuator. Head locking is usually secured with bite and/or ear bars (Atay et al. 2008) integrated in the anesthesia mask (Feng et al. 2013; Vappou et al. 2008; Clayton, Garbow, and Bayly 2011; Majumdar and Klatt 2017; Klein et al. 2014). Custom-made head-holders have also been developed: basket-shaped (Schregel et al. 2012) and plaster baskets (Chatelin et al. 2016) keeping the animals (young rats or mice) supine to further maximize coupling with the actuator, or 3D-printed plastic neck holders (Schregel et al. 2017; Patz et al. 2017).

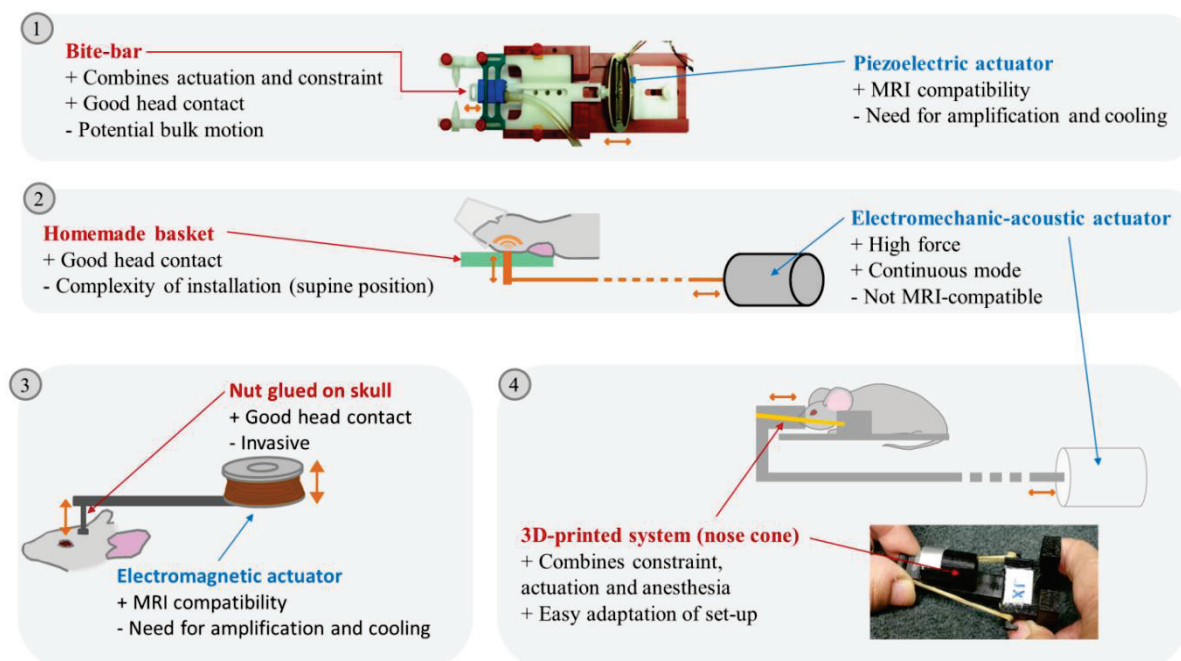
In the first mouse brain MRE experiments, effective actuator binding was ensured by a nut directly glued to the skull after scalp incision (Atay et al. 2008). Now, one of the most widespread non-invasive actuation methods avoids the skull (and its associated wave attenuation or reflection) and relies on bite-bars, already used for constraint (Vappou et al. 2008; Clayton, Garbow, and Bayly 2011; Kearney et al. 2017). However, this can provoke bulk motion, diminishing transmission efficiency and impairing wave quality. It was therefore replaced in certain cases by a simple piston positioned on the top of the head of animals lying supine (Schregel et al. 2012; Chatelin et al. 2016). 3D-printing techniques facilitated the development of new designs. A nose-cone held in place by an elastic band can both deliver gaseous anesthesia and transmit mechanical vibration (Schregel et al. 2017; Patz et al. 2017).

Waves can be produced in continuous mode using electromechanical or acoustic transducers (Vappou et al. 2008; Schregel et al. 2012; Chatelin et al. 2016; Patz et al. 2017; Jugé et al. 2016; Salameh, Souris, and Sarraçanie 2011) in order to establish the mechanical steady-state required to satisfy the motion equation used for reconstruction (Clayton, Garbow, and Bayly 2011). The magnetic components of such transducers compel their positioning outside the MRI bore. This relatively long distance (50-100 cm, depending on the fringe field) requires high transducer force and minimal friction in order to achieve efficient transmission (Jugé et al. 2016; Patz et al. 2017). Some piezoelectric drivers are compatible with MRI and can be placed in close proximity to the animal (5-15 cm) to preserve wave amplitude (Clayton, Garbow, and Bayly 2011; Kearney et al. 2017; Feng et al. 2016; Boulet, Kelso, and Othman 2011, 2013; Yin et al. 2017).

Finally, electromagnetic transducers have been built based on a shielded solenoid coil positioned with its axis perpendicular to the static magnetic field (Atay et al. 2008; Klein et al. 2014; Freimann et al. 2013; Hain et al. 2016; Munder et al. 2018; Riek et al. 2012; Millward et

al. 2015; Diguet et al. 2009). Both piezoelectric and electromagnetic transducers require a wave generator combined with an amplifier.

Actuators are able to generate waves from 100 (Vappou et al. 2008) to 2,500 Hz (Othman et al. 2013). To increase amplitude, frequencies corresponding to the resonance of the loaded system can be used, determined using accelerometers (Vappou et al. 2008) or vibrometers (Boulet, Kelso, and Othman 2011, 2013).



**Figure 12: Illustration of different brain MRE set-ups reported in the litterature: 1) Picture of a piezoelectric actuator linked to a bite-bar by a plastic rod, Clayton 2011; 2) schema of a modal actuator driving a vertical piston hitting the back of the the rodent head, Chatelin 2016; 3) electromagnetic actuator driving a vertical piston glued on the mouse skull, Atay 2008; 4) schema of the external transducer transmitting excitation to a nose cone maintained on the mouse head by rubber bands and picture of the nose cone and plots maintaining the mouse head, Patz 2017. Advantages (+) and drawbacks (-) of the **actuation transmitters** and **actuators** are listed. Actuation movements are symbolized by orange arrows.**

Pictures extracted from [14] © Institute of Physics and Engineering in Medicine. Reproduced by permission of IOP Publishing. All rights reserved; and Patz et al. 2017.

Overall, a large number of actuation devices for MRE have been reported, combined with various constraint and coupling devices. This technological diversity is bound to produce waves with differences in amplitude and relative proportions of shear and compression waves, and artifacts (e.g., wave wrapping at different parts of the brain). For instance, the use of a piezoelectric actuator coupled with an incisor bar was able to generate waves with amplitudes of 1 to 2.5  $\mu\text{m}$  for a frequency range of 600-1,800 Hz for a specific set-up (Clayton, Garbow, and Bayly 2011), whereas it reached 40  $\mu\text{m}$  at 877 Hz in another set-up (Boulet, Kelso, and Othman 2013). A summary of the advantages and drawbacks of the various experimental set-up elements can be found in Figure 12.

In conclusion, a large span of set-ups is reported in the literature, an evolution towards an easy to handle standardized solution could facilitate direct comparison between the results from different teams.

### **MRE pulse sequences**

MRE sequences are generally based on conventional MRI sequences, but MEGs are added to sensitize movement in the phase image. These MEGs are synchronized at different wave propagation time-points in order to obtain an image at different steps over this propagation period. To avoid other phase encoding (for example, due to static magnetic field) being superimposed on shear wave motion, a straightforward solution is to acquire MRE images without inducing vibration, to be subtracted from the image with vibration (Atay et al. 2008; Kearney et al. 2017). Another solution to increase phase-to-noise ratio is to invert the MEG polarity (Clayton, Garbow, and Bayly 2011; Klein et al. 2014; Yin et al. 2017; Freimann et al. 2013; Hain et al. 2016; Munder et al. 2018; Murphy et al. 2012) of the image to be subtracted. Most of the sequences are spin-echo-based, to avoid signal loss due to magnetic field inhomogeneity (Boulet, Kelso, and Othman 2011), but a gradient-echo FLASH sequence has also been used to shorten acquisition time and reduce echo time, especially at low frequency (Riek et al. 2011). Encoding motion with 2D sequences in the three directions for 8 time-steps takes approximately 1 hour, with pixels from 0.2x0.2 to 0.55x0.55  $\text{mm}^2$  and slice thickness of 0.2 to 2 mm. Decreasing acquisition time requires single-slice acquisition, motion encoding in a single direction and a smaller number of time-steps, but impairs reconstruction quality and may limit the reconstruction methods able to be used. A Sample Interval Modulation (SLIM) sequence, simultaneously encoding the three directions of motion with MEGs of different frequencies, has been newly developed, shortening total acquisition time from 51 to 17 minutes, without noticeable change in SNR (Kearney et al. 2017).

In conclusion, reducing acquisition time while preserving SNR is still a challenge in MRE, but new encoding strategies could contribute to a more efficient MRE imaging technique.

### *Static magnetic field, gradients and radio frequency coils*

High-field MR scanners offer the possibility of greater spatial resolution and SNR, but at the cost of greater absolute magnetic field inhomogeneity and artifacts. For small-animal imaging, 0.1 (Vappou et al. 2008) to 11.7 T (Atay et al. 2008) fields have been used. Recently, a 0.5 T benchtop scanner to study *ex vivo* tissue in tube was described, coupled with a preamplifier and amplifier, raising MEG strength to  $1.2 \text{ T}\cdot\text{m}^{-1}$  and motion sensitivity to that of high-field micro-MRE (Braun et al. 2017). Using low-field MRI scanners does not appear to be a major drawback for MRE imaging, especially when filling factors are maximized. With this in mind, surface coils (Schregel et al. 2017; Patz et al. 2017), custom-built birdcages (Feng et al. 2012) and small RF coils (Vappou et al. 2008) have been used; although no comparisons of SNR have been made between scanners and coils, reconstruction of viscoelastic parameters appeared possible with similar spatial resolution (voxel volume  $< 0.03 \text{ mm}^3$ ) for magnetic fields  $\geq 4.7 \text{ T}$ . Another obstacle to high frequency MRE can be gradient rise-time. Yasar *et al.* reported difficulty in working beyond 3.8 kHz as gradients could not reach its maximum strength sufficiently fast and without image artefacts (Yasar, Royston, and Magin 2013).

### *Reconstruction*

The objective of this section is to give a quick overview of how wave (speed and attenuation) and mechanical parameters (complex shear modulus) can be derived from MRE phase images. Different methods have been developed: wavelength estimation method (Knutsson, Westin, and Granlund 1994; Manduca et al. 2001), nonlinear inversion finite-element method (Fovargue et al. 2018), or direct inversion (Oliphant et al. 2000; Sinkus et al. 2005). The first does not accurately detect interfaces and is not suitable for detection of viscoelastic changes in small areas within the brain. Finite-element-based methods are recent, accurate techniques, but are not widespread as they require large calculation capacity and expertise in numerical computation. Finally, direct inversion is the most widely used method in small-animal studies. A thorough explanation of reconstruction methods can be found in (Hirsch, Braun, and Sack 2017; Lambert and Sinkus 2017). For the sake of simplicity, only the direct inversion method is briefly described below. It consists in two main steps.

### *Extraction of shear wave field from measured phase images*

This step consists first in getting rid of phase shifts greater than  $2\pi$ . This can be done using commercial solutions (Atay et al. 2008) or unwrapping algorithms previously developed

in other contexts (Spottiswoode et al. 2007; Goldstein, Zebker, and Werner 1988; Costantini 1998). Next, the first harmonic component of motion  $u$ , also called the displacement field, is isolated in the frequency domain with a temporal Fourier transform in order to get rid of the static offset caused by susceptibility and  $B_0$  inhomogeneity (Hirsch, Braun, and Sack 2017). Then, shear waves are extracted from  $u$  by calculating the curl operator of the measured displacement field or by applying a high-pass filter to remove low-frequency bulk-waves. The curl-based technique has the disadvantage of being sensitive to noise, and hence greatly depends on SNR and filtering methods.

### *Quantification of shear mechanical properties by solving an inverse problem*

The displacement field is linked to the shear mechanical properties of tissues by complex motion equations. A locally homogenous, linear isotropic viscoelastic medium is often assumed. Inversion methods taking account of anisotropy have also been proposed to eliminate possible errors caused by myelin fibers that could propagate waves in a particular direction and thus skew the estimate of mechanical properties (Schmidt et al. 2017). To our knowledge, no studies confirmed an effect of these fibers on propagation in mice; however, studies on human brain are beginning to show the interest of such a method, as indicated by Murphy et al. in their review (Murphy, Huston, and Ehman 2017). To perform reconstruction, displacement field matrices can be inverted directly, but fit algorithms help to reduce discrepancies in the field.

Various algorithms have been developed to post-process MRE data. However, at different steps of the preprocessing and inversion algorithm, a wide variety of filters (high-pass, bandpass, Gaussian, median, directional) have been used for different purposes (compressional waves suppression, noise reduction, data smoothing and direction weight assessment, respectively). Attributing cut-off frequencies and determining the size of the filter is delicate, and often empirically determined from simulations or phantom experiments, and so may not fit complex living tissues.

Despite this apparent diversity of reconstruction methods (Fovargue, Nordsletten, and Sinkus 2018), standardized solutions such as the Elastography Software Pipeline (Barnhill et al. 2017) recently appeared. Some are available online: the [multi-frequency wave number recovery](#) (Tzschätzsch et al. 2016) and the [multi-frequency direct inversion](#) (Streitberger et al. 2014) [and wavelength estimation and direct inversion methods](#) (Li et al. 2017; Xiang et al. 2013).

Finally, depending on the rheological model used for the reconstruction method, different parameters can be used to characterize the mechanical properties of the tissue. One major

consequence is the difficulty of comparing different MRE studies. Most recent studies used the curl-based method, allowing extraction of the complex shear modulus  $G^*$  (kPa), the real and imaginary parts of which comprise the storage modulus  $G'$ , representing elasticity, and the loss modulus  $G''$ , representing viscosity. Fewer studies have reported wave velocity and attenuation, as these parameters are completely entangled compared to  $G'$  and  $G''$ , although these are well-known in the ultrasound community, and have direct and intuitive interpretation. Finally the parameters of the spring pot model,  $\mu$  (kPa) and  $\alpha$  (dimensionless), representing frequency-independent elasticity and structure, respectively, can help in inferring structural information from tissues at a microscopic scale (Sinkus et al. 2007).

### 1.2.2.3. *MRE-derived brain parameters in rodents*

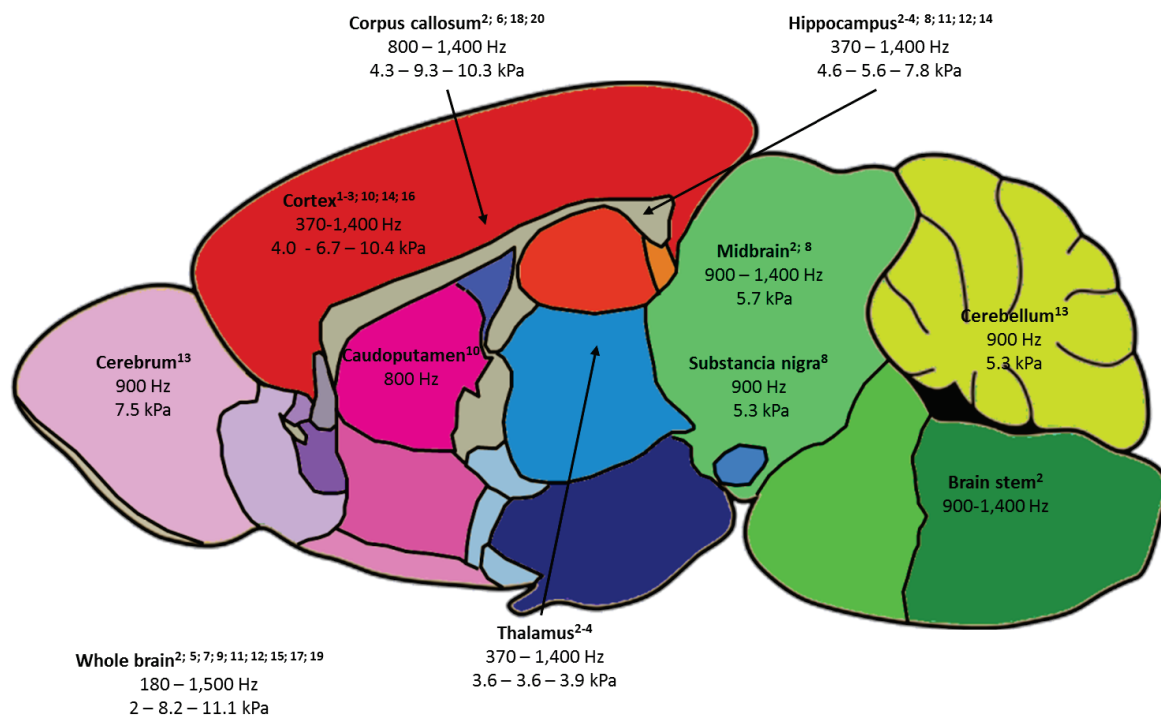
#### Healthy animals

Reported values of viscoelastic parameters for healthy animals vary widely. For example, whole-brain magnitude of the complex shear modulus  $|G^*|$  ranges from 2 to 11 kPa (Vappou et al. 2008; Clayton, Garbow, and Bayly 2011) and cortical  $\mu$ , computed for the sake of comparison as indicated by Hiscox *et al.* (Hiscox et al. 2016), from 3 to 13 kPa (Vappou et al. 2008; Munder et al. 2018). A first explanation is the large frequency range used (180-1,800 Hz): according to the power-law model (Clayton, Garbow, and Bayly 2011), loss and conservation moduli are expected to increase with frequency. Other methodological differences in the MRE imaging set-up, reconstruction method, or filters may contribute to these discrepancies. Even though absolute quantitative MRE has not yet been achieved, several reports comparing brain structures showed agreement between animal and human studies: hippocampus was found to be stiffer than thalamus and cortex by Boulet *et al.* (Boulet, Kelso, and Othman 2011), which was confirmed in subsequent studies in rodents (Chatelin et al. 2016; Munder et al. 2018) and corresponds to human findings (Hiscox et al. 2016). Cerebellum was found to be softer than cerebrum in mice (Millward et al. 2015) and in several human studies (Hiscox et al. 2016). Except for one recent study (G. Bertalan et al. 2017), corpus callosum was generally identified as the stiffest area in the brain (Schregel et al. 2012), corroborating findings in humans (Arani et al. 2015). Generally, structures with higher fiber density appear stiffer (Diguet et al. 2009). Figure 13 summarizes the frequency and  $|G^*|$  ranges reported in healthy rodents. Moreover, MRE demonstrated sensitivity to structural changes occurring with age in



maturing rodents (Schregel et al. 2012; Munder et al. 2018) and older humans (Arani et al. 2015).

Finally, agreement with a power-law model has been established for small animals (Clayton,



**Figure 13: Summary of the rodent brain areas studied by MRE, labeled as follows:**

-(first line) name of brain area, with relevant publications listed below;

-(second line) frequency ranges used to probe the area;

-(third line) when available, the minimum value of  $|G^*|$  - the average of  $|G^*|$  values reported at 900 and 1,000 Hz – maximum reported  $|G^*|$  value.  $|G^*|$  was chosen as it is the most frequently reported parameter and 900-1,000 Hz studies the most frequent in the literature.

1 - Atay 2008; 2 - Bertalan 2017; 3 - Boulet 2011; 4 - Châtelin 2016; 5 - Clayton 2012; 6 - Diguët 2009; 7 - Freimann 2013; 8 - Hain 2016; 9 - Jamin 2015; 10 - Jugé 2016; 11 - Klein 2014; 12 - Majumdar 2017; 13 - Millward 2015; 14 - Munder 2017; 15 - Murphy 2012; 16 - Patz 2017; 17 – Salameh 2011; 18 - Schregel 2012; 19 - Vappou 2008; 20 – Yin 2017.

Garbow, and Bayly 2011), larger animal and humans (Weickenmeier et al. 2017), allowing multi-frequency studies to explore the brain's dispersive properties. These studies could lead to a precise estimate of mechanical parameters independent of frequency (e.g.,  $\mu$ ,  $\alpha$  and  $\varphi = \arctan(G''/G')$ ) and to more accurate elastograms.

### Pathological conditions

Several pathologies affect the biomechanical properties of the brain. In models of traumatic brain injury, both  $G'$  and  $G''$  were reduced (Boulet, Kelso, and Othman 2011, 2013). Brain tumors were softer (i.e., less elastic and viscous) than the surrounding parenchyma by a factor 0.6 to 0.8, and biomechanical parameters might help in grading brain malignancies (Schregel et al. 2017; Feng et al. 2016; Jamin et al. 2015; Li et al. 2015). This decrease in both  $G'$  and  $G''$  could be associated with cell death and decreased microvessel density (Li et al. 2015).  $|G^*|$  decrease was of the same order of magnitude ( $< 40\%$ ) in hydrocephalus (Jugé et al. 2016), stroke (Freimann et al. 2013) and multiple sclerosis models (Riek et al. 2012; Millward et al. 2015), while  $\varphi$  remained constant over disease course. This loss was correlated with decreased mean diffusivity on Diffusion Tensor Imaging (Jugé et al. 2016) and with neuron loss on histopathology (Freimann et al. 2013). Reduction in phase angle was associated with demyelination and diminution of  $|G^*|$  with the destruction of the extracellular matrix (Schregel et al. 2012). In mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease,  $|G^*|$  also appeared to drop with the number of neurons (Klein et al. 2014; Hain et al. 2016; Munder et al. 2018; Murphy et al. 2012; Majumdar and Klatt 2017).

To summarize, MRE appears to be a promising non-invasive tool to diagnose and stage various brain diseases, by probing changes in viscoelasticity. However, multiple pathophysiological processes, such as inflammation, neuron and glial cell density and organization, and vascularization, can potentially affect biomechanical parameters. The link between microstructure revealed by optical microscopy and its impact on the macroscopic mechanical properties of the tissue is delicate to establish as i) brain microstructure in healthy and pathological states is still not well established (Midroit et al. 2018; Niedworok et al. 2016); the development of quantitative and 3D histological methods and registration pipeline might help furthering recent works aiming to establish brain atlases (Coelho et al. 2018); ii) Question addressed by Verdier et al. subsists: "Are tissues just a macroscopic generalization of the cell properties?" (Verdier 2003). Comparison between elastograms and other *in vivo* imaging techniques such as DTI or PET are also used to decipher the links between the various parameters evaluated by MRE and the underlying microscopic structure and organization of the brain. Interestingly, vasodilatation caused by activation of cannabinoid receptors showed that blood-flow-dependent tissue softening should not be overlooked when interpreting brain viscoelasticity changes (Chatelin et al. 2016). On the other hand, such findings suggest that



MRE may also be used for functional brain imaging under a stimulation paradigm (Patz et al. 2017). Although MRE offers a wide range of potential applications, most exploratory studies published so far have not demonstrated increased sensitivity to specific changes of the tissue microstructure in comparison to other methods. This is a necessary prior step for MRE to be developed as a powerful diagnostic and brain research tool.

#### **1.2.2.4. Conclusion**

MRE is still a recent imaging technique and lacks standardization at small-animal scale, making reliable quantitative data difficult to obtain. It could benefit from concertation of different MRE experts and, as for human MRE, the development of a commercial solution could help to democratize rodent MRE and ascertain preliminary results. The gold standard for measuring elasticity and viscosity is currently rheometry, which operates at frequencies far lower than those used in small-animal MRE (50- 200 Hz vs. 200-1,800 Hz). Phantom and *ex vivo* comparisons with rheometry and simulation are currently the best leads toward establishing a gold standard in MRE, but the use of various homemade elements in the imaging and reconstruction chains, along with an empirical approach to filter setting currently prevent standardization in *in vivo* systems.

Nevertheless, MRE already proved effective in comparing brain structures and physiological and pathological states. Recent studies have begun to unveil the link between brain structure and the changes in various parameters. For example, some MRE studies claim that neuron density is the most important element affecting loss and conservation moduli; this was shown in neurodegenerative disease models, but also in healthy rodents, where the neuron-rich hippocampus is stiffer than the cortex or thalamus. The composition of the extracellular matrix and its disorganization by inflammation or edema can also impact viscoelastic parameters. More detailed comparisons between MRE, histology, microscopy and other imaging techniques are mandatory to disentangle the relationship between mechanical parameters in the brain and biological processes.

## 1.2.3. Application de l'ERM à la détection des fibrilles

### 1.2.3.1. Études chez des patients et des modèles de souris Alzheimer

Comme indiqué dans la section 1.2.2.3, l'ERM a déjà prouvé sa sensibilité à des modifications tissulaires caractéristiques des démences.

Que ce soit dans des modèles de souris mimant la maladie de Parkinson (Hain et al. 2016; Klein et al. 2014) ou d'Alzheimer (Murphy et al. 2012), une baisse du module de cisaillement a été mesurée. Les modèles de souris Parkinson sont des modèles où la mort des neurones dopaminergiques est massive, cette baisse apparaît donc corrélée à une neurodégénérescence importante, en accord avec les observations faites dans un modèle d'accident vasculaire cérébral (Freimann et al. 2013).

Chez l'humain, plusieurs études ont démontré une baisse de la rigidité chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, dans le cerveau entier, le lobe temporal (ElSheikh et al. 2017) et l'hippocampe (Gerischer et al. 2018). Cette dernière étude n'a par ailleurs trouvé aucun lien entre la rigidité mesurée entre 30 et 60 Hz de l'hippocampe et la présence de fibrilles A $\beta$ , déterminé par un dosage du LCS. Elle s'est aussi intéressée à l'étude d'un paramètre de structure, l'angle de phase  $\varphi$ , qui a aussi été trouvé réduit dans l'hippocampe.

Des études ont plus spécifiquement exploré le lien entre la présence de plaques amyloïdes A $\beta$  et la rigidité du milieu. Une première étude menée en 2012 compare 3 groupes : 1) des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, 2) des sujets avec un bilan cognitif normal et une absence de plaques amyloïdes dans le cerveau confirmée par un examen TEP (CN-) et 3) des sujets dont le bilan cognitif était normal mais dont un examen de TEP avait révélé la présence de fibrilles A $\beta$  dans le cerveau (CN+). Une baisse de la rigidité du cerveau chez les patients Alzheimer, comparée aux groupes CN- et CN+ a été mise en évidence, mais aucune différence entre les groupes CN- et CN+ n'a été montrée. De plus, la baisse ne concernait pas seulement le cortex, où sont localisées les plaques amyloïdes, ce qui implique que la baisse de la rigidité dans le cerveau Alzheimer ne peut pas être expliquée seulement par la présence de fibrilles. Les auteurs suggèrent qu'une modification de la structure du cerveau, liée à la neurodégénérescence ou à des modifications de la structure de la matrice extracellulaire, pourraient être à l'origine de ces modifications (Murphy et al. 2011).

Une seconde étude concerne des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, des sujets CN-, CN+ et des patients atteints de trouble cognitif léger, avec un examen TEP positif pour la

présence de plaques amyloïdes. L'examen ERM a été complété par une IRM fonctionnelle (tâches mémorielles) et des mesures volumétriques. Une valeur de la charge amyloïde standardisée a aussi été calculée pour chacun des participants à l'étude.

Une baisse globale de la rigidité a été observée dans le cerveau Alzheimer en général comparé aux groupes CN- et CN+, mais concerne particulièrement les régions des lobes frontal, temporal et pariétal, c'est-à-dire les régions identifiées comme constituantes du réseau de mode par défaut<sup>2</sup>. Cette baisse de rigidité a aussi été corrélée aux mesures de volume faites dans ces régions. Chez les patients présentant des troubles cognitifs légers, la rigidité des tissus n'est pas intermédiaire entre celle des sujets CN- et CN+ mais très variable. Chez ces patients, la rigidité peut être corrélée négativement avec la charge amyloïde standardisée, alors qu'aucun lien n'est apparu chez les patients Alzheimer. Une corrélation négative ressort aussi pour les patients CN- et une corrélation positive pour les patients CN+. En conclusion, la rigidité des régions pariétale, temporale et frontale connaîtrait au début de la maladie d'Alzheimer une hausse liée à l'augmentation de la charge amyloïde. Lors de l'apparition des premiers troubles cognitifs, alors que la charge amyloïde continue à croître, la rigidité de ces zones baisserait pour atteindre un niveau plus bas que chez les sujets sains une fois la maladie d'Alzheimer installée. La rigidité ne serait pas directement liée à la charge amyloïde mais à des modifications structurales causées par la présence des fibrilles aux premiers stades de la maladie (Murphy et al. 2016).

À notre connaissance, peu de groupes ont étudié la relation entre la présence des fibrilles A $\beta$  et les paramètres viscoélastiques ; ces études mono- ou multifréquence n'ont pas détecté de modification majeure directement liée à la présence des plaques. Gerischer et al. suggèrent d'étudier le lien entre les fibrilles et la rigidité sur des modèles de souris, afin de pouvoir avoir accès à une analyse histologique.

Des études, conduites sur des souris transgéniques, modèles de la maladie d'Alzheimer, ont complété ces études cliniques. La première étude a comparé des souris Alzheimer (APP-PS1) âgées ayant une pathologie amyloïde et une inflammation à des souris saines. Comme chez l'humain, une baisse de la rigidité du cerveau entier a été constatée chez la souris transgénique (Murphy et al. 2012). Cette étude n'incluait pas d'analyse histologique et n'a pas confirmé la cause des modifications observées.

---

<sup>2</sup> Les régions du mode par défaut se désactivent lors de l'exécution de la tâche par le sujet, et se réactivent à la fin de l'exécution de la tâche, et sont visibles en IRM fonctionnelle.

Plus récemment, une étude a suivi des souris Alzheimer amyloïdes et des souris saines au fil de leur croissance. Les souris ont été sacrifiées le lendemain de l'imagerie, et des lames ont été préparées avec un marquage ciblant les fibrilles A $\beta$  et les noyaux des cellules, puis imagées au microscope. L'étude a mis en évidence une baisse des modules de conservation G' et de perte G'' dans l'hippocampe des souris jeunes comparées aux souris contrôles au même âge. L'écart en G'' croît avec l'âge des souris, traduisant une complexification du cerveau sain alors que l'hippocampe des souris Alzheimer ne s'enrichit pas avec de nouvelles structures absorbant les ondes. G' augmente ensuite chez la souris Alzheimer, de pair avec une accumulation des fibrilles dans les cellules. Les auteurs font l'hypothèse que l'accumulation des fibrilles intracellulaires entraînerait une modification des propriétés des cellules et augmenterait la rigidité du milieu. Une fois les agrégats A $\beta$  passés dans le milieu extracellulaire cependant, G' diminue derechef. Dans le cortex, où des plaques amyloïdes se forment aussi, aucune différence entre les contrôles et les souris Alzheimer n'a été observée. L'étude conclut que la présence de fibrilles dans le milieu extracellulaire ne permet pas d'expliquer à elle seule les modifications de rigidité observées, mais indique que l'augmentation de la rigidité avant le relargage des fibrilles dans le milieu extracellulaire pourrait être un marqueur de suivi des souris pertinent (Munder et al. 2018).

Une dernière étude est en cours sur deux populations de souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer : quatre souris APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 qui développent une pathologie amyloïde et des symptômes de façon tardive (6 et 8 mois, respectivement), sans tauopathie, et cinq souris 5xFAD, un modèle Alzheimer plus agressif (apparition des plaques à 2 mois, symptômes à 4 mois) ont été imagés en ERM à un âge de 3 ou 4 mois. Une étude histologique a suivi, pour vérifier la présence des plaques A $\beta$ . Dans la région de l'hippocampe et du cortex, une diminution non significative de G' a été constatée pour le modèle le moins agressif alors qu'une augmentation de G' dans la zone de l'hippocampe (non significative) et dans le cerveau entier a été observée pour le modèle agressif de la maladie. Pour ces deux modèles de souris, des plaques amyloïdes ont été observées en histologie, en nombre plus important pour le second modèle. Les évolutions du module de conservation n'apparaissent donc pas directement corrélées avec la présence de fibrilles. Les auteurs suggèrent cependant que lorsque la densité des plaques est très importante, elles pourraient constituer un support rigide pour le cerveau, augmentant ainsi sa rigidité (Majumdar et al. 2017).

Dans toutes ces études, l'ERM a manifestement été un outil d'intérêt au suivi des démences. Cependant, le lien entre la présence des fibrilles dans le cerveau et les paramètres

viscoélastiques étudiés ne se distinguent pas de façon claire. En premier lieu, même lorsque l'ERM est complétée par des analyses histologiques ou des examens de TEP, les phénomènes physiopathologiques pouvant potentiellement affecter les propriétés mécaniques du cerveau (inflammation, mort neuronale, démyélinisation, modification de la structure des cellules ou de la matrice extracellulaire...) ne peuvent pas tous être suivis. Les modèles de souris transgéniques permettent de s'affranchir de certains phénomènes (pas de fibrilles Tau dans le modèle APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 par exemple), mais restent très complexes. Un effet spécifique des fibrilles est donc difficile à identifier parmi ces nombreux signaux potentiels. Par ailleurs, une étude mono-fréquence des démences pourrait aussi être insuffisante pour détecter le signal des fibrilles, car les études spécifiques sur les plaques amyloïdes ont montré des relations contradictoires entre rigidité et présence des fibrilles. Dans la partie suivante, nous présenterons l'ERM multifréquence et la possibilité de révéler la présence d'obstacles microscopiques par cette méthode. La structure en feuillets  $\beta$  particulière des fibrilles pourrait ainsi permettre d'être détectée spécifiquement en ERM multifréquence.

### ***1.2.3.2. ERM pour la détection de petits obstacles***

L'ERM est utilisée dans la plupart des études cliniques et précliniques à une fréquence d'excitation mécanique unique, choisie en fonction de la taille de l'objet observé. Par exemple, la longueur d'onde utilisée dans le cerveau humain (correspondant à une fréquence d'environ 100 Hz) est généralement bien plus grande que celle utilisée dans le cerveau murin (fréquence correspondante d'environ 1000 Hz), pour répondre à des contraintes de propagation et de résolution spatiale, comme précédemment indiqué (cf. 1.2.2.2). Des études multifréquentielles peuvent cependant donner accès à des informations sur la géométrie des matériaux sondés à l'échelle microscopique, en s'appuyant sur leurs propriétés fractales.

Un objet purement fractal serait constitué d'un élément de base ou motif répété à l'infini. Dans la réalité, des objets vont avoir un comportement fractal dans un espace et à une échelle limitée. Pour ces objets, le terme « quasi-fractal » peut être utilisé. La plupart des objets présents dans la nature sont quasi-fractals, c'est le cas des arbres, des rivières, mais aussi des vaisseaux sanguins, de certains polymères comme le PMMA mais aussi des agrégats fibrillaires. Pour qu'un objet soit considéré comme quasi-fractal, il faut que son motif de base soit répété au moins 20 fois (Lazzari et al. 2016).

Dans un milieu complexe, la propagation des ondes mécaniques peut être altérée par des réflexions multiples aux interfaces entre milieux (comme les régions du cerveau), ou avec des

structures tissulaires : vaisseaux, macromolécules, neurones etc... En ERM, il a récemment été démontré que dans un milieu quasi-fractal, la superposition de réflexions multiples sur des obstacles de taille bien inférieure à la résolution des images peut rendre compte de la dispersion en fréquence de paramètres d'ondes tel que la vitesse  $c$ . Ainsi dans le cadre d'une étude ERM multifréquence, la relation entre la fréquence d'excitation  $f$  et la vitesse de l'onde  $c$  prend la forme d'une loi puissance :  $c = af^y$ , où  $a$  est une constante et  $y$  reflète la dispersion de l'onde. Lorsque  $y$  est proche de zéro, le milieu est considéré comme non dispersif (en ne considérant que les réflexions et pas l'absorption des ondes dans le milieu) et la vitesse de l'onde est constante. Lorsque  $y$  est proche de 1, le milieu est très dispersif (Lambert et al. 2015). Dans ce cas, les objets diffuseurs ou fractals ont une dimension très inférieure à la longueur d'onde. La condition pour observer un effet dispersif est que la fractalité apparente, et non la dimension de l'objet, ait une échelle comparable à celle de la longueur d'onde. À titre d'exemple, la fractalité apparente calculée par Lambert et al. pour des billes rigides de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre et espacées de 30  $\mu\text{m}$  est de 8 mm. Des longueurs d'onde de l'ordre du millimètre peuvent donc les détecter. Ces calculs théoriques ont été confirmés par la mesure expérimentale de l'évolution de l'exposant de la loi puissance en fonction de la densité des microbilles de polystyrène dans un fantôme de gélatine (cf. Figure 14).

L'exposant de la loi puissance est nul en l'absence de billes car le gel est non dispersif, il augmente ensuite avec la densité des billes. Lorsque la densité des billes est trop importante, l'exposant de la loi puissance diminue car les billes retrouvent une distribution de norme Euclidienne.

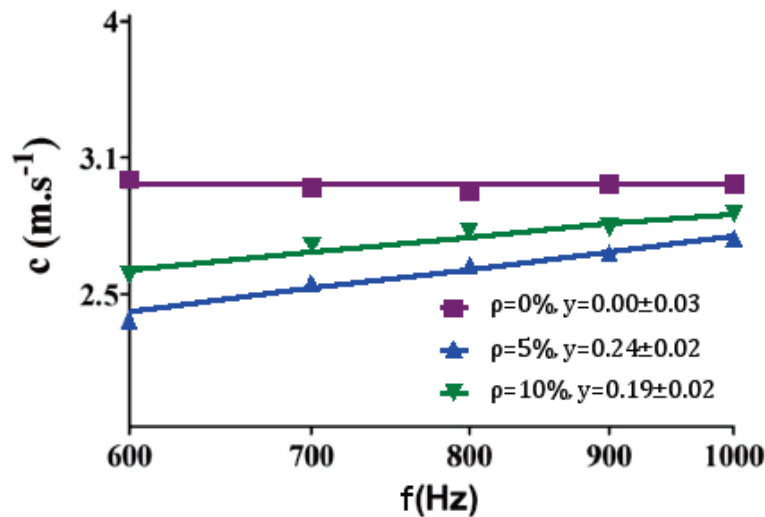


Figure 15 : représentation de la vitesse en fonction de la fréquence dans un gel dans lequel des microbilles rigides ont été incluses. Les courbes représentées ont été ajustées selon une loi puissance pour des densités de billes nulle, de 5 et 10 %. La valeur de l'exposant de la loi puissance  $y$  est indiquée dans la légende (Figure extraite de Lambert et al. 2015)

Une seconde étude a appliqué cette théorie pour mettre en évidence la croissance de microvaisseaux dans un fantôme de Matrigel™, un gel s'apparentant à la matrice basale des cellules (Jugé et al. 2015). L'évolution de l'exposant  $y$ , au cours de la croissance vasculaire (cf. Figure 15) a pu confirmer la possibilité d'étudier l'effet de la présence d'obstacles rigides microscopiques, la dimension des vaisseaux ne dépassant pas 900  $\mu\text{m}$ , grâce à une observation macroscopique de la propagation d'ondes (longueurs d'ondes comprises entre 2.0 et 2.7 mm).

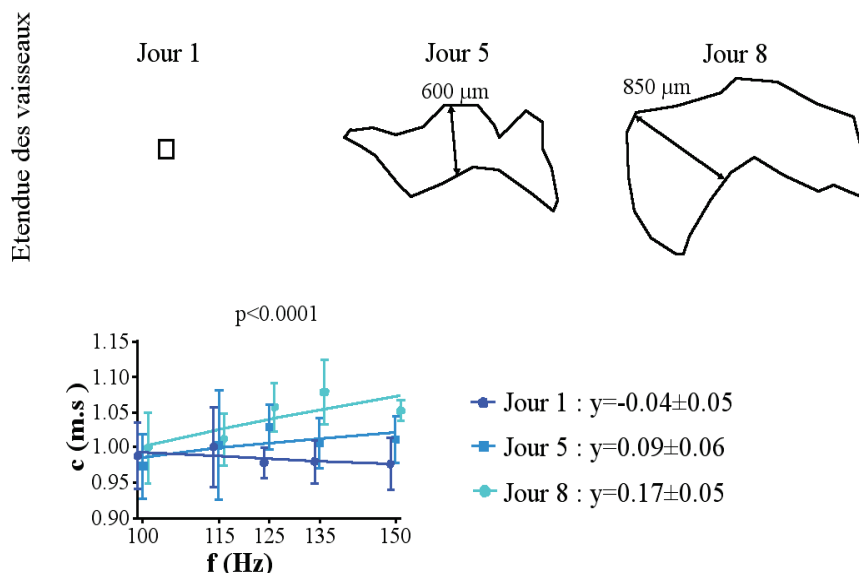


Figure 14 : En haut de l'image, microscopie optique de microvaisseaux à différents jours après leur implantation. Le graphe représente les vitesses normalisées, calculées à partir d'images ERM au niveau des vaisseaux, représentées en fonction de la fréquence d'excitation. L'ajustement paramétrique a été fait selon une loi puissance et les exposants extraits sont indiqués à droite (Figure extraite de Jugé et al. 2015)



L'exposant de la loi puissance se retrouve aussi dans le modèle rhéologique dit du « springpot ». Dans ce modèle, la matière est décrite comme une séquence infinie de ressorts, qui retournent à leur position d'équilibre sans perte d'énergie après avoir subi une déformation, et d'amortisseurs qui convertissent l'énergie mécanique en une autre forme d'énergie pendant la déformation (Sack et al. 2009). Deux paramètres, le module de rigidité  $\mu$  (ou second coefficient de Lamé) et l'exposant de la loi puissance  $\alpha$  caractérisent la matière.  $\mu$  représente la force des liens entre les composants du matériau et l'intégrité du réseau, et  $\alpha$  sa dispersion. Dans les études utilisant ce modèle, le lien entre  $\alpha$  et la géométrie sous-jacente de la matière examinée a été exploré : une réduction d'emblée du paramètre  $\alpha$  chez des patients atteints de sclérose en plaques progressive alors qu'il reste constant dans le cas de la sclérose en plaques rémittente avec poussée. Cette différence pourrait être expliquée par une altération de la géométrie sous-jacente du cerveau dans le cas chronique, provoquée par une neuroinflammation répétée. La récurrence des modifications du milieu (dilatation des vaisseaux, œdèmes...) pourrait entraîner un remodelage de la structure cérébrale (Wuerfel et al. 2010; Streitberger et al. 2012). Guo et al. ont établi un modèle probabiliste du tissu pour estimer la relation entre la dimension fractale et  $\alpha$ , complété par un fantôme d'agarose avec des bandes de papier utilisées pour complexifier le réseau. Ils ont constaté que lorsque le nombre de réticulations augmente,  $\alpha$  augmente également (Guo et al. 2012; Posnansky et al. 2012) et l'ont associé à une augmentation de la dimension fractale dans le fantôme.

Bien que cette approche fondée sur le modèle du springpot repose sur une théorie rhéologique, les résultats obtenus dans ces études confirment que des modifications de la microstructure, que ce soit chez des patients *in vivo* ou dans des fantômes, ont bien un impact sur l'exposant de la loi puissance en ERM, et viennent conforter cette approche des réflexions multiples contribuant à une modification de la dispersion.

Les lois puissances utilisées dans les études précédemment citées reposent sur la relation entre la fréquence et la vitesse  $c$ , mais aussi sur le module de cisaillement  $G^*$ . Des travaux ont étudié les paramètres des lois puissance, fondées sur un ajustement du module de conservation  $G'$  ou du nombre d'onde réel  $k_r$ . Des relations mathématiques entre les exposants de ces lois ont été établies, facilitant ainsi les comparaisons de l'évolution de ces exposants (Holm and Sinkus 2010). Elles permettent aussi d'établir un lien entre ces exposants et l'angle de phase  $\varphi$  :

$$\varphi = \tan^{-1} \left( \frac{G''}{G'} \right) = \frac{2}{\pi} \alpha = \pi y$$



Comme nous l'avons déjà mentionné, les fibrilles sont quasi-fractales (Lazzari et al. 2016) de par leur architecture en empilement de feuillets  $\beta$ . Leur dimension micrométrique est proche de celle des microbilles utilisées dans une étude précédente. Leur dimension fractale pourrait donc se situer autour du millimètre et les rendre détectables par des ondes millimétriques, adaptées à des études précliniques. De plus, les fibrilles sont des agrégats très rigides comparés aux cellules gliales les entourant (Smith et al. 2006; Lu et al. 2006). À l'instar des microbilles dans un fantôme, elles pourraient donc modifier la dispersion des ondes mécaniques par réflexions multiples. Finalement, l'ERM multifréquence pourrait permettre la détection des fibrilles. C'est ce que nous avons essayé de confirmer pendant cette thèse, dans des milieux permettant de s'affranchir des autres phénomènes induits par les pathologies de démences. Une étude sur des fantômes non dispersifs a été menée afin d'évaluer l'effet propre des fibrilles sur l'exposant de la loi puissance. Elle a été suivie par une étude sur cerveau de rat *ex vivo* ayant reçu une injection intracérébrale de protéine fibrillaire, qui devait permettre de vérifier si d'autres structures quasi-fractales présentes dans le cerveau masquaient ou non l'effet induit par les fibrilles.

## Conclusion

Ce premier chapitre a présenté le rôle central des agrégats fibrillaires au cours de la phase asymptomatique des démences. Parmi les différentes méthodes diagnostiques présentées, seul le dosage de ces agrégats dans les liquides biologiques apparaît comme un outil complètement sélectif, nécessitant cependant d'être complété par un examen d'imagerie spécifique permettant la localisation des fibrilles.

L'ERM, une méthode d'imagerie permettant la reconstruction des paramètres mécaniques des tissus, n'a pas pu démontrer une sensibilité aux fibrilles lors d'études précliniques et cliniques. Cependant, des études ont démontré la capacité de l'ERM multifréquence à détecter des modifications de la microstructure à partir de l'exposant  $\gamma$  de la loi puissance. Cette méthode d'imagerie apparaît donc comme un outil potentiel pour la localisation des fibrilles.

Dans les chapitres suivants, des études *in vitro* et *ex vivo* ayant pour but la caractérisation d'agrégats fibrillaires en ERM multifréquence, réalisées au cours de cette thèse, sont présentées.

# Chapitre 2

## ERM appliquée à la détection des agrégats fibrillaires *in vitro*

### Sommaire

---

2.1. Introduction.....	45
2.2. Methods.....	47
2.2.1. Sample preparation.....	47
2.2.2. Macrofluorescence.....	48
2.2.3. MRE set-up.....	49
2.2.4. Post-processing.....	52
2.2.5. Image analysis.....	52
2.2.6. Statistics .....	54
2.3. Results.....	54
2.3.1. Macrofluorescence results.....	54
2.3.2. Differences in elastic properties between fibrils and BSA.....	54
2.3.3. Difference in structural parameters $\gamma$ and $\varphi$ between fibrils and BSA.....	55
2.4. Discussion.....	57
2.4.1. Detection of a fibril-specific effect.....	57
2.4.2. Relevance of multi-frequency study.....	58
2.4.3. Perspectives for preclinical follow-up.....	59
2.4.4. Conclusion.....	60
2.5. Perspectives.....	60
2.5.1. Échantillons d'agarose.....	60
2.5.2. Vers une complexification des fantômes.....	65
Conclusion.....	67

---

Ce chapitre présente un article « The apparent mechanical effect of isolated A $\beta$  and  $\alpha$ -Syn aggregates revealed by multi-frequency MRE » M. Bigot, F. Chauveau, C. Amaz, R. Sinkus, O. Beuf, S. A. Lambert qui a accepté pour publication dans le journal NMR in Biomedecine en 2019. Cet article traite d'expériences menées sur des échantillons d'agarose, un milieu peu dispersif, afin d'isoler le signal de fibrilles de type A $\beta$  et  $\alpha$ -Syn. Le résumé de cet article est traduit ci-dessous.

Plusieurs processus biologiques sont impliqués dans la démence, et l'agrégation fibrillaire de protéines endogènes mépliées semble être l'une des premières caractéristiques des maladies neurodégénératives. L'élastographie par résonance magnétique (ERM), une technique d'imagerie qui étudie les propriétés mécaniques des tissus, est un moyen récemment exploité pour étudier les maladies neurodégénératives. Bien que des changements mécaniques associés à ces maladies aient été détectés, le signal spécifique des fibrilles n'a pas encore été isolé dans des études cliniques ou précliniques. La présente étude vise à exploiter les propriétés fractales des fibrilles pour les séparer de protéines non agrégées à partir de l'exposant de la loi puissance multifréquence mesuré par ERM dans une étude sur fantôme.

Deux types de fibrilles,  $\alpha$ -Syn et A $\beta$ , et une protéine non agrégée, l'albumine de sérum bovin, utilisée comme référence, ont été incorporés dans un fantôme d'agarose non dispersif. L'élastographie a été réalisée à de multiples fréquences, comprises entre 400 et 1200 Hz. Après une inversion 3D directe, le module de stockage G', l'angle de phase  $\varphi$ , la vitesse de l'onde c et l'exposant de la loi puissance  $\gamma$  ont été calculés.

Aucune différence significative n'a été détectée pour G' et  $\varphi$ . Les inclusions  $\alpha$ -Syn et A $\beta$  présentaient toutes deux des valeurs de  $\gamma$  significativement plus élevées que les inclusions témoins ( $p = 0,005$ ), mais ne différaient pas entre elles.

Cette étude sur fantôme a mis en évidence un effet spécifique des agrégats  $\alpha$ -Syn et A $\beta$ , plus évident sur l'exposant de la loi puissance dérivé de l'ERM multifréquence qu'avec des paramètres déterminés à partir d'une seule fréquence.

## 2.1. Introduction

Dementias are neurodegenerative diseases characterized by a decline in mental ability. Progression involves several biological processes such as impaired neurotransmission, inflammation, neurodegeneration and, from the early stages, fibrillar aggregation of misshaped endogenous proteins (Seelaar et al. 2010; Braak et al. 2003; Nelson et al. 2012). These fibrils appear to be hallmarks of dementia: in the wide span of neurodegenerative diseases, distinct endogenous proteins, such as amyloid- $\beta$ ,  $\alpha$ -synuclein or Tau, share a common mechanism of pathological aggregation and spreading across brain areas (Jucker and Walker 2013). They also share a microstructural feature: all misshape to form  $\beta$ -sheets.

A recent means of studying neurodegenerative diseases is Magnetic Resonance Elastography (MRE), an imaging technique investigating mechanical properties of tissues (Muthupillai et al. 1995). The most popular MRE method uses a monochromatic shear wave propagated through tissue and synchronized with oscillating motion encoding gradients (MEG). The wave fields acquired are typically processed using a viscoelastic wave equation, leading to mechanical property maps: i.e., information on elasticity and viscosity.

MRE has been used in both preclinical and clinical studies on dementia. Recent clinical studies showed that brain stiffness varied between areas according to pathology (ElSheikh et al. 2017). Stiffness was decreased in frontal and temporal lobes in frontotemporal dementia (Huston et al. 2016), lentiform nucleus in Parkinson's disease (Lipp et al. 2013), and frontal, temporal and parietal lobes in Alzheimer's disease (AD) (Murphy et al. 2016). Small-animal studies confirmed decreased stiffness and further suggested an association with neuronal loss (Majumdar and Klatt 2017; Klein et al. 2014; Hain et al. 2016; Munder et al. 2017; Murphy et al. 2012; Bigot et al. 2018). A biomechanical study in a multiple sclerosis mouse model showed that phase angle was sensitive to demyelination and remyelination (Schregel et al. 2012).

Few studies have specifically focused on the influence of AD amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) fibrils on MRE parameters. In humans, a study comparing AD patients testing positive versus negative for presence of  $A\beta$  according on PET-CT suggested that amyloid load alone could not explain the changes in stiffness observed (Murphy et al. 2011). In a mouse model of AD, increased storage modulus (representing elasticity) correlated with intracellular fibril load during adolescence, attributed to change in cell structure. However, in older mice, no link was found between extracellular presence of  $A\beta$  and viscoelastic parameters (Munder et al. 2018). Overall, most

studies suggested that protein aggregation might not be the main factor driving brain stiffness changes. However, concurrent pathological phenomena such as inflammation, neurodegeneration or vascular impairment cannot be easily disentangled in living organisms.

In the last decade, various teams reported that multi-frequency MRE could reveal the underlying microstructure of matter at a macroscopic scale. Whatever the mechanical model, the frequency-dependence of the MRE-derived parameters could be fitted to a power law, and the exponent of this power law could be linked to the underlying microarchitecture. The exponent was reported to be reduced in chronic multiple sclerosis while remaining constant in relapsing-remitting multiple sclerosis. Altered cerebral structures in the chronic case were a possible explanation for this difference (Wuerfel et al. 2010; Streitberger et al. 2012). To establish the link between the power law exponent and the underlying microarchitecture, some studies used calibrated phantoms, made with a single type of microstructure such as paper strips (Guo et al. 2012), microvasculature (Jugé et al. 2015) or polystyrene microsphere distribution (Lambert et al. 2015). In a polystyrene microsphere phantom, Lambert et al. used wave propagation to show that multiple wave scattering on microscopic rigid scatterers resulted macroscopically in power law frequency-dependence of wave speed. The exponent of the power law was linked to the apparent fractality of the medium. Importantly, for the geometrically induced power law to be established, the scattering objects need to be not too small compared to the shear wavelength; otherwise, apparent attenuation vanishes and only the material's constitutive dispersion matters.

Like microspheres and vessels, fibrils are more rigid than their surrounding glial cells (Smith et al. 2006; Lu et al. 2006) and can induce multiple scattering of propagating shear waves. Moreover, their repetitive  $\beta$ -sheet structure over a large scale (from protein diameter to a few mm) confers fractal-like properties. This fractality in the empirical data can be observed only over a limited range (Hamburger, Biham, and Avnir 1996; Ciccotti and Mulargia 2002) as long as it is sufficiently large: i.e., according to Lazzari et al., the upper limit should be “20 times larger than the primary particle” (Lazzari et al. 2016). We propose here to exploit these properties, using multi-frequency MRE to study the effect of two types of fibril on shear wave scattering in a non-dispersive agarose medium. This phantom study seeks to improve understanding of the specific contribution of protein fibrils to mechanical changes observed in the brain.

## 2.2. Methods

### 2.2.1. Sample preparation

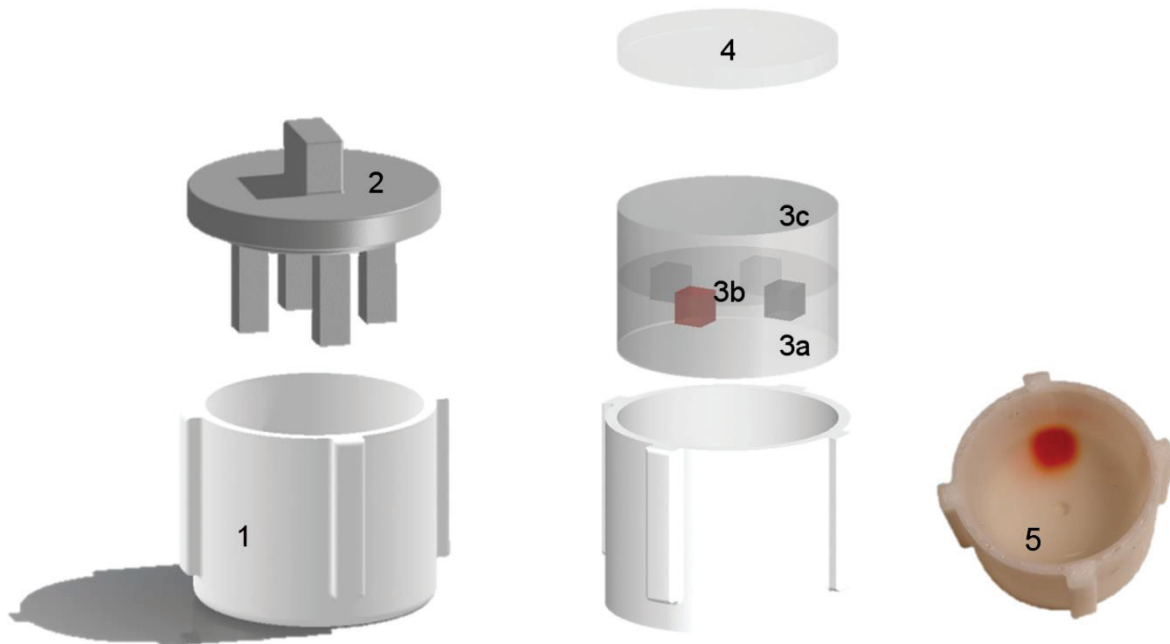
Dedicated phantoms with well-delineated fibril inclusions were produced to isolate the effect of fibrils using a purely elastic agarose base. In this lossless environment, any frequency dependence of speed mainly originates from multiple scattering of waves due to the presence of obstacles, such as fibrils (Lambert et al. 2015; Yamakoshi, Sato, and Sato 1990).

Fibrils of human recombinant proteins (rPeptide), amyloid- $\beta$  peptide 1-40 ( $A\beta$ ) and full-length A53T-mutated  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -Syn) were prepared as previously described<sup>3</sup> (Verdurand et al. 2016, 2018). Aggregation was controlled with thioflavin-T fluorimetry and transmission electron microscopy after uranyl-acetate staining.

Phantoms were made with 1% agarose powder (Sigma A9414) diluted in artificial cerebrospinal fluid (Alzet® 2018), to have composition and mechanical properties similar to the brain. In each phantom, a maximum of four  $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$  inclusions were made, using a mold (Fig. 1). Each inclusion was filled as follows: 21% of one type of aggregated fibrils at high concentration in PBS solution (initial monomer concentration, 200  $\mu\text{M}$ ), 5% thioflavin-T solution (0.01% in PBS) for fluorescence imaging, and 74% agarose. Agarose mass concentration was 1.35% in the 4 inclusions, to compensate the effect of dilution on mechanical properties. One inclusion was used as control, containing Bovine Serum Albumin (BSA, Carl Roth, ref. 3737), a non-aggregated protein, at a mass concentration of 4.3 mg/mL in PBS. Red Congo staining was used to visually locate this control inclusion and hence facilitate phantom positioning on MRI (cf. Figure 16).

---

<sup>3</sup> Le protocole d'agrégation des fibrilles est décrit en Annexe 1.



**Figure 16 :** Schematic view of 1) the sample holder and 2) the mold used to create inclusions. The different layers of the phantom are represented: 3a) 1% agarose. The mold put on the sample holder was used to create the 4 imprints in which 3b) inclusions were created, containing 1.35% agarose and BSA or fibril solutions. After cooling, 3c) a third layer of 1% agarose was added. Lastly, 4) a thin layer of paraffin adhering to the edges of the sample holder was poured. 5) A photograph of the phantom in its holder.

Altogether, 7 phantoms were produced, with 11  $\alpha$ -Syn inclusions, 10 A $\beta$  inclusions and 7 BSA inclusions. Phantoms were directly molded in their holder and covered by paraffin wax (DTM 133460) to prevent dehydration and bulk motion during actuation.

### 2.2.2. Macrofluorescence

To check that fibrils did not migrate out of the inclusions, fluorescence microscopy (Leica Macrofluor Z16 APA A) was performed on the whole phantom after MRE imaging. Thioflavin-T, which binds to fibrils and emits green fluorescence, was used as fluorochrome (cf. Figure 17).



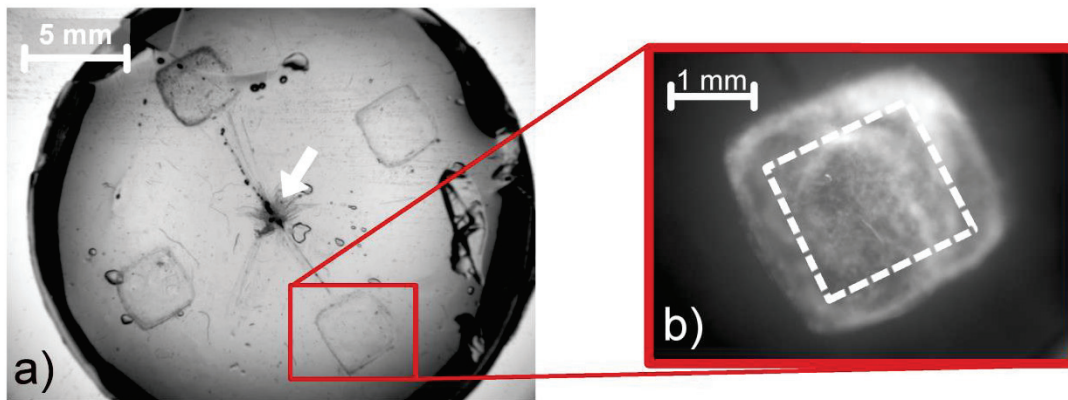


Figure 17 : a) Bright field image of a phantom with a 1x magnification. A needle (presented in Figure 3) mark is shown by a white arrow. b) Macrofluorescence image of an  $\alpha$ -Syn inclusion with a 5X magnification. Green fluorescence, appearing here in white, indicates binding of thioflavin-T to fibrils. In this inclusion, the edges of the inclusion are clearly visible, indicating that no leakage of fibrils has happened. An ROI is drawn, avoiding the edges of the inclusion (white dashed square).

### 2.2.3. MRE set-up

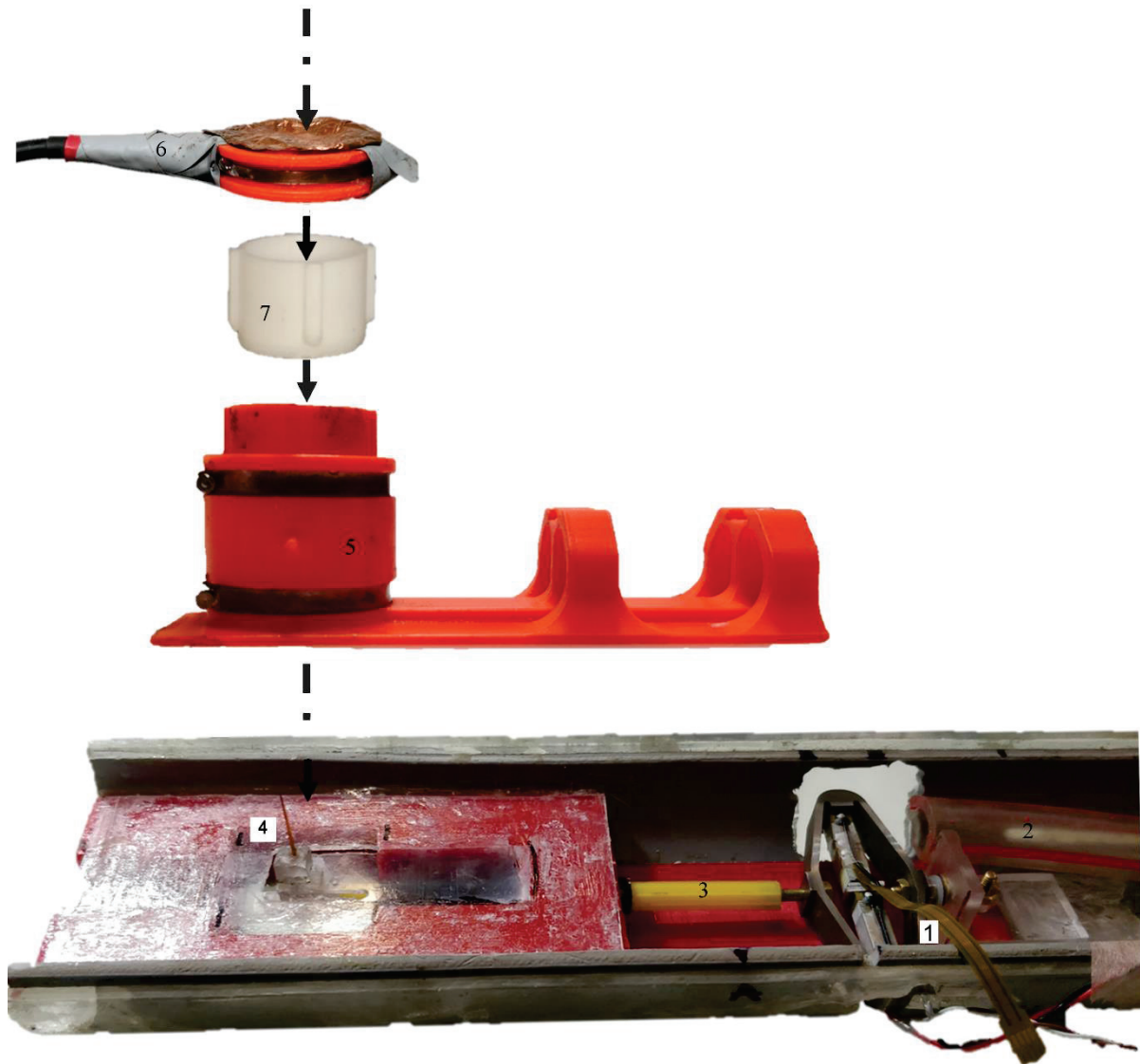
#### 2.2.3.1. *Experimental set-up*<sup>4</sup>

The sample holder was slid inside a homemade 3D-printed Helmholtz coil (cf. Figure 18) designed to maximize uniformity and filling factor (cf. Figure 19) and to facilitate vertical handling of small samples.

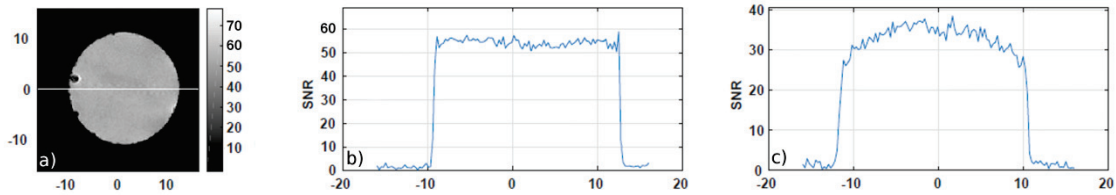
The volume coil was simply taped to a dedicated elastography bench, so that a needle pierced the sample. The needle was fixed on a Plexiglas flap, linked to an air-cooled piezoelectric driver (APA100M Cedrat Technologies) via a star-shaped plastic rod. Actuator frequency and amplitude were set by a function generator (33220A Agilent Technologies) through an amplifier (LA75 Cedrat Technologies).

<sup>4</sup> La mise en place du banc expérimental *ex vivo* est décrite en Annexe 2





**Figure 18 : Elastography bench dedicated to small samples: 1) a piezoelectric driver for wave generation (APA100M Cedrat Technologies), cooled by 2) an air intake; 3) a star-shaped rod transmitted movement to 4) a cactus needle, in direct contact with the sample; 5) a 36 mm diameter Helmholtz coil and 6) associated coupling loop used for signal acquisition and transmission. 7) The sample holder was slid inside the coil.**



**Figure 19 :** a) Image of a  $20 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$   $\text{NiSO}_4$  sample made with a 32 mm diameter volume coil in quadrature (Bruker, Ettlingen, Germany). A white line shows the direction in which the b) associated SNR profile has been made. c) Profile made in the same direction with the handmade Helmholtz coil used in this study. SNR was  $50 \pm 1$  in the 32 mm coil, i.e. about  $50/\sqrt{2} \approx 35 \pm 1$  without quadrature detection, and  $32 \pm 1$  in the Helmholtz coil. Results were obtained using the MRI characterization tool (Mahieu-Williams, 2019, [https://vip.creatis.insa-lyon.fr/documentation/mri\\_charact.html](https://vip.creatis.insa-lyon.fr/documentation/mri_charact.html)) which is available online through the Virtual Imaging Platform (Glatard, 2013, <https://vip.creatis.insa-lyon.fr/>).

### 2.2.3.2. Data acquisition

All acquisitions were performed on a pre-clinical 4.7 T MRI scanner (BioSpec Bruker system, Ettlingen, Germany). The MRE sequence was derived from a RARE sequence<sup>5</sup> (Van Reeth et al. 2018), and was performed sequentially at 600-800-900-1,000-400-1,200-600 Hz. Acquisition at 600 Hz was performed at the beginning and repeated at the end of elastography to check that the sample's mechanical properties did not alter over time (MRE exam duration, 1h45). Sinusoidal Motion Encoding Gradients (MEG) with  $180 \text{ mT} \cdot \text{m}^{-1}$  amplitude were synchronized with the piezoelectric driver through a trigger sent by the MRI console. To establish steady-state regime before phase encoding, 40 wave periods were performed ahead of MEG. For each frequency, MRE acquisition was repeated 3 times, with change in MEG orientation (slice, phase, read) to acquire the 3 directions of motion. Number of MEG periods and echo time were adjusted according to frequency so as to maximize SNR (SNR varying between 23 at 400 Hz and 17 at 1,000 Hz). To minimize acquisition time, a RARE factor of 2 was used.

An MSME (multi-slice multi-echo) sequence was acquired to locate inclusions on the computed T2-maps and facilitate ROI positioning, as explained below.

Further details on both MRE and MSME sequences are given in Table 1.

<sup>5</sup> Chronogramme disponible en Annexe 3

**Table 1: MR acquisition parameters. MRE acquisitions were repeated 3 times at each frequency, with MEGs in slice, phase and read directions (NA, not available).**

	MSME	MR elastography					
Field of view	25 x 25 mm <sup>2</sup>	25 x 25 mm <sup>2</sup>					
Matrix	128 x 128	64 x 64					
Spatial resolution	195 x 195 μm <sup>2</sup>	391 x 391 μm <sup>2</sup>					
Slice thickness	1 mm	1 mm					
Number of slices	7	7					
Number of phase offset images	NA	8					
Mechanical excitation frequency (Hz)	NA	400	600	800	900	1000	1200
Number of MEG periods	NA	1	2	8	9	10	8
Echo time (ms)	12 – 24 – 36 – 48 – 60 – 72	15	15	28	30	28	21
Repetition time (ms)	5033	1200	1000				
Acquisition time	8'3''	5'3''	4'16''				

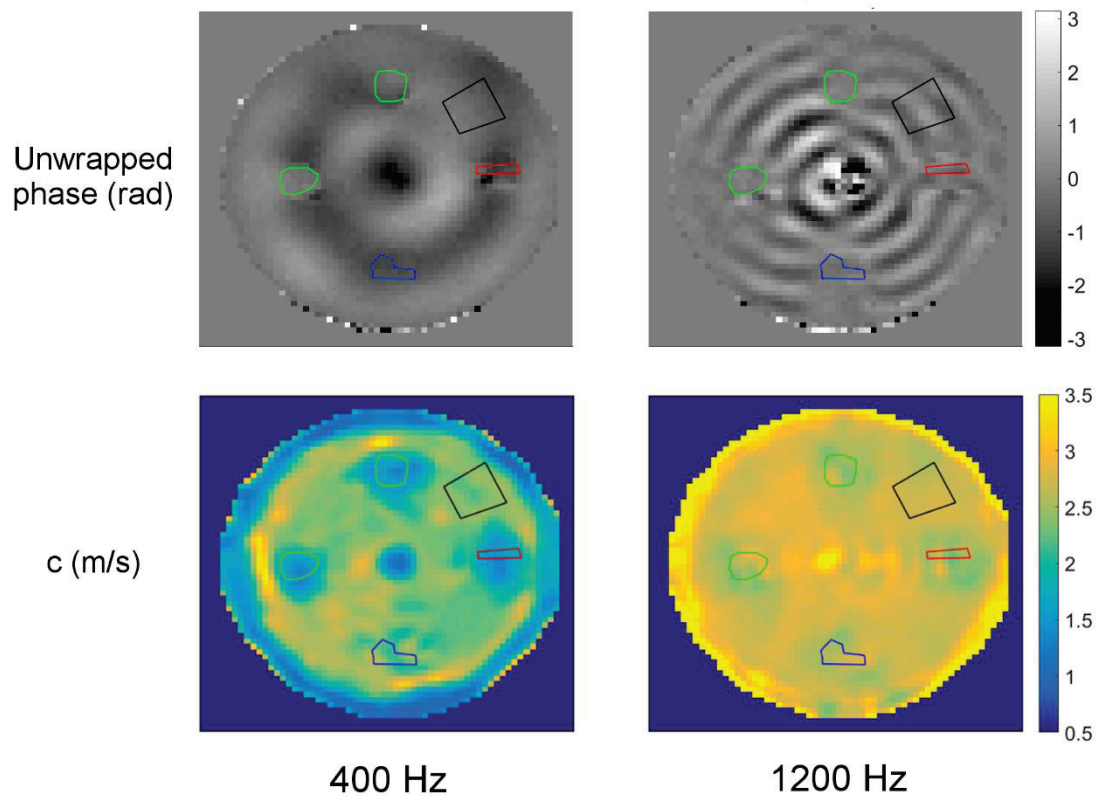
## 2.2.4. Post-processing

Data processing was performed as described by Sinkus et al. (Sinkus et al. 2005). Raw phase images were unwrapped, filtered with a 3D-Gaussian filter (kernel = 2 x 2 x 2,  $\sigma = 0.39 \times 0.39 \times 1 \text{ mm}^3$ ) and Fourier transformed into 3D displacement fields. 3D curl inversion was applied to the fields to calculate the complex shear modulus  $G^*$  and the complex wave number  $k$  at each acquired frequency.

## 2.2.5. Image analysis

ROIs were manually drawn only on the central slice, excluding inclusion borders, to avoid bias due to reconstruction artifacts or slice positioning error (cf. Figure 17.b). In-plane, inclusions were located on T2-maps and reported on MRE acquisitions. Only central inclusion areas were included, to avoid inhomogeneity at the corners of the inclusions and edge reconstruction effects, leading to ROI sizes ranging between 10 and 38 pixels. One ROI close in size was also drawn in simple agarose for each sample.

The mean and standard deviation of the real and imaginary parts of  $G^*$  (storage modulus  $G'$  standing for elasticity and loss modulus  $G''$  standing for viscosity) and real part of  $k$  ( $k_r$ ) inside the ROIs were computed. Mean phase angle  $\varphi = \tan^{-1} \left( \frac{G''}{G'} \right)$  and wave speed  $c = \frac{2\pi f}{k_r}$  were derived. The relation between wave speed  $c$  and excitation frequency  $f$  was fitted on a power law:  $c = af^y$ . Unwrapped phase and wave speed at 400 and 1,200 Hz are shown as an example Figure 20.  $\varphi$  and  $y$  are two variables shown to be related to underlying microstructure in previous studies. The relation  $\varphi = \pi y$  can be deduced from literature, but is only valid when  $\varphi$  is independent of frequency (Holm and Sinkus 2010; Hirsch, Braun, and Sack 2017; Hiscox et al. 2016).



**Figure 20 :** MRE unwrapped phase and wave speed obtained at 400 and 1,200 Hz (motion encoding direction orthogonal to the slice).  $A\beta$ ,  $\alpha$ -Syn and BSA inclusions and agarose ROIs are represented in green, red, blue and black, respectively.

## 2.2.6. Statistics

All results are reported as mean  $\pm$  standard deviations. Statistical tests used OriginPro 2016 and R statistical software version 3.3.3. Only the first of the two 600 Hz acquisitions was taken into account, so as to have the same number of data points as for the other frequencies. The significance threshold  $\alpha$  was set at  $0.05/3 = 0.017$  to correct for multiple comparisons between the three groups ( $A\beta$ ,  $\alpha$ -Syn, BSA).

First, differences in the microstructure-sensitive parameter  $y$  were assessed on non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test), followed by Kolmogorov-Smirnov tests.

Second,  $G'$ ,  $\varphi$ ,  $c$  were evaluated by using linear mixed-effects models that included groups ( $\alpha$ -Syn,  $A\beta$ , BSA) and frequency as fixed-effect and random effect grouped by phantom used. Results are reported as effect size  $\beta$ , confidence interval CI, and p-value. For relevant parameters identified by the linear mixed model, exploratory comparisons were also performed at each frequency to simulate the fastest and most commonly performed single-frequency acquisitions.

Finally, to confirm the validity of the mathematical relation between  $\varphi$  and  $y$ , an additional Kruskal-Wallis test was performed to evaluate the frequency dependence of  $\varphi$ .

## 2.3. Results

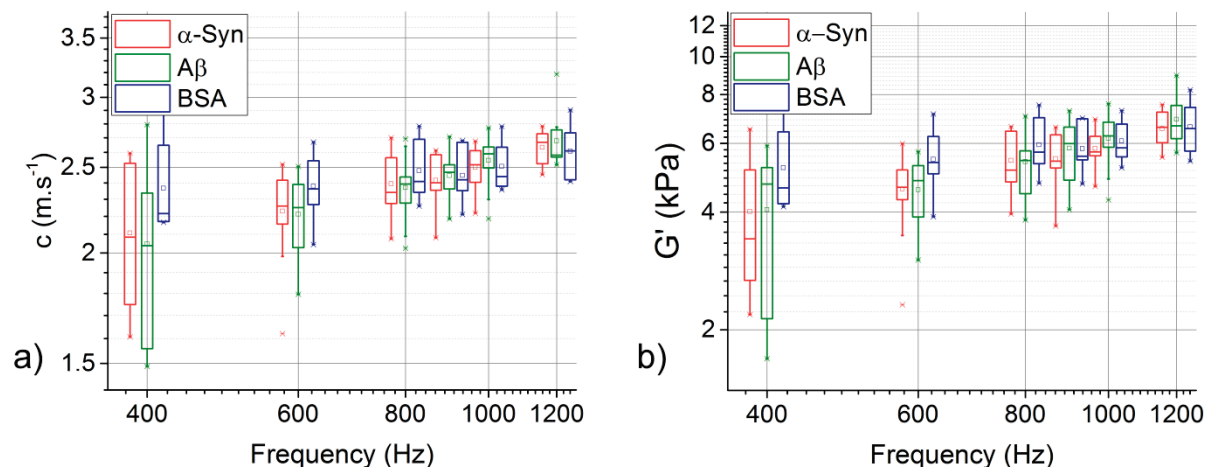
### 2.3.1. Macrofluorescence results

Macrofluorescence revealed no fibril leakage out of the inclusion areas (cf. Figure 17.b). However, the fluorescence distribution was non-homogeneous for some inclusions.

### 2.3.2. Differences in elastic properties between fibrils and BSA

Mean relative difference in  $k_r$  measured in inclusions between the first and last 600-Hz acquisitions was  $3\pm 2\%$ . A homogeneous 1% agarose phantom without inclusion was also characterized at 600 Hz over a 23-hour period (15 measures) to demonstrate the mechanical stability of agarose over time: the standard deviation of  $k_r$  was only 1% of the mean value.

Linear mixed-effects models showed no group effect on wave speed  $c$  (cf. Figure 21.a), or on storage modulus (cf. Figure 21.b), even though  $G'$  and  $c$  tend to be smaller in the fibril groups at low frequency. Datasets and results of linear mixed-effects models are provided as supplemental Excel file<sup>6</sup>.



**Figure 21 :** Boxplots of a) storage modulus  $G'$  and b) wave speed  $c$  computed from ROI included in inclusions containing  $\alpha$ -Syn,  $A\beta$  fibrils and BSA for frequencies varying between 400 and 1,200 Hz. For each frequency, 11, 10 and 7 values are represented for  $\alpha$ -synuclein,  $A\beta$ 40 and BSA, respectively. Each box of the plot contains values from the 25th to the 75th percentile. Maximum and minimum values are symbolized by crosses, mean value by a square and median by a line in the box.

### 2.3.3. Difference in structural parameters $\gamma$ and $\varphi$ between fibrils and BSA

Both  $\alpha$ -Syn and  $A\beta$  inclusions showed significantly higher values of exponent  $\gamma$  than BSA inclusions ( $\gamma_{\alpha\text{-Syn}} = 0.22 \pm 0.08$ ;  $\gamma_{A\beta} = 0.26 \pm 0.15$ ;  $\gamma_{\text{BSA}} = 0.11 \pm 0.05$  –  $p = 0.005$ , Figure 22.a), but did not differ between each other. Of note, no difference was observed between BSA inclusions and simple agarose outside the inclusions ( $p = 0.963$ ; complete results extracted from agarose ROIs outside the inclusions are reported in Table 2).

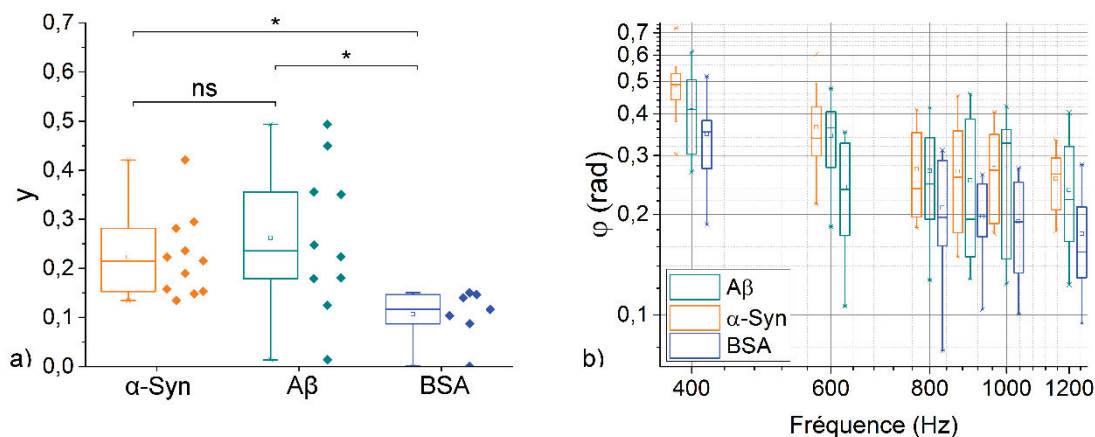
<sup>6</sup> Les données et résultats sont disponibles en Annexe 4



**Table 2 : Range of mean  $\pm$  standard deviation obtained for  $G'$ ,  $c$  and  $\phi$  for all investigated frequencies and for  $y$  in the agarose ROI, far from all inclusions and in the BSA inclusion, used as control for the evaluation of a fibril effect.**

Variable	Frequency range	Agarose	BSA
$G'$	400-1200 Hz	$5.7 \pm 0.8 - 6.7 \pm 0.6$ kPa	$5.2 \pm 1.4 - 6.6 \pm 1.0$ kPa
$c$	400-1200 Hz	$2.3 \pm 0.1 - 2.6 \pm 0.1$ m.s <sup>-1</sup>	$2.4 \pm 0.3 - 2.6 \pm 0.2$ m.s <sup>-1</sup>
$\phi$	400-1200 Hz	$0.09 \pm 0.02 - 0.20 \pm 0.05$ rad	$0.17 \pm 0.06 - 0.35 \pm 0.10$ rad
$y$	/	$0.12 \pm 0.02$	$0.11 \pm 0.05$

Parameter  $\phi$  was not significantly different between both fibril groups and BSA. A trend toward higher values in fibril groups was however noticeable (cf. Figure 22b). Frequency had an impact on  $\phi$  distribution (Kruskal-Wallis test on pooled values from all frequencies,  $p < 0.0003$ ).



**Figure 22 : a) Boxplots of exponent  $y$  for  $\alpha$ -Syn,  $A\beta$  and BSA. 11, 10 and 7 values are represented as dots for  $\alpha$ -Syn,  $A\beta$  and BSA, respectively. b) Boxplots of phase angle  $\phi$  for  $\alpha$ -Syn,  $A\beta$  and BSA inclusions. 11, 10 and 7 values are represented at each frequency for  $\alpha$ -Syn,  $A\beta$  and BSA, respectively. Each box of the plot contains values from the 25<sup>th</sup> to the 75<sup>th</sup> percentile. Maximum and minimum values are symbolized by crosses, mean value by a square and median by a line in the box.**

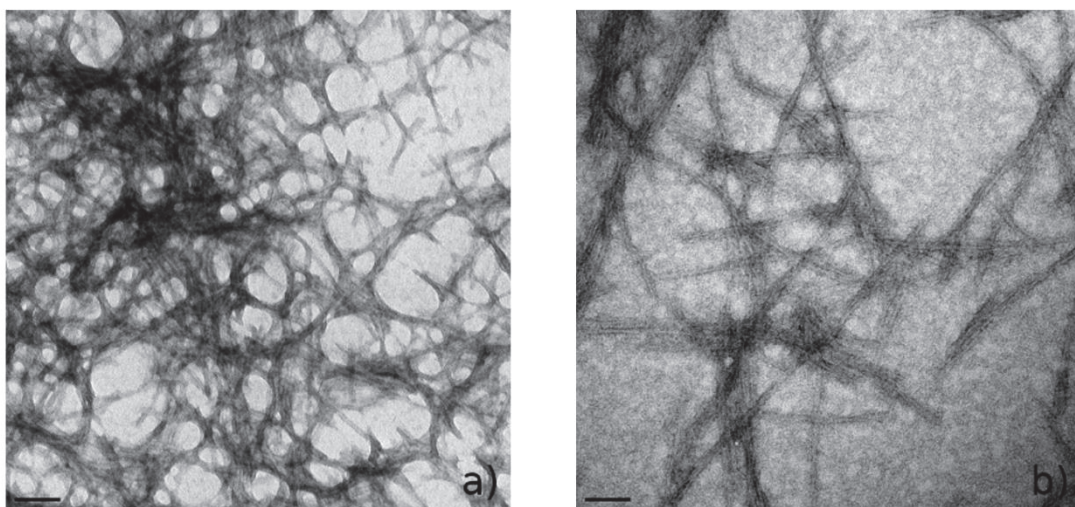


## 2.4. Discussion

### 2.4.1. Detection of a fibril-specific effect

Fibrils are macromolecular protein assemblies of  $\beta$ -sheet stacks and are considered to be an early hallmark of neurodegenerative diseases (Seelaar et al. 2010; Braak et al. 2003; Nelson et al. 2012). Their specific effect on MRE parameters could not easily be inferred from previous studies of transgenic mice and patients (Munder et al. 2017; Murphy et al. 2011). In the present, we simplified the fibril environment to isolate a potential effect on various MRE-derived parameters. More specifically, we used their fractal-like distribution (Lazzari et al. 2016) as a source of multiple scattering of shear waves that leaves its footprint in the exponent of the frequency power law. Surprisingly, MRI becomes sensitive to nanometric structures because of the spatial extent induced by apparent fractality. Based upon stiffness itself, fibrils are difficult to distinguish: no difference was found between the two fibril groups versus BSA using single-frequency MRE parameters. Therefore  $\gamma$  is really an added value to characterize the underlying microarchitecture: e.g., here for fibril detection.

BSA, a non-aggregated protein, did not modify the dispersion properties of agarose, while the two fibril types were able to significantly increase the power law exponent  $\gamma$ , confirming that fibrils are a dispersive obstacle for shear waves.  $A\beta$  and  $\alpha$ -Syn are made of different proteins, and their aggregation leads to fibrils harboring different widths and lengths, as visible on transmission electron microscopy images (cf. Figure 23). No significant difference in  $\gamma$  was found between the two types of fibril, suggesting that their common architectural base,  $\beta$ -sheet



**Figure 23: Transmission electronic microscopy of a)  $\alpha$ -Syn and b)  $A\beta$  fibrils. Scale at the right corner corresponds to 100 nm.**

stacks, behaves as a fractal-like object, leading to the same frequency-dependence of mechanical properties.

Based on our results, predicting a potential overruling of fibril effect by other modifications in the case of neurodegenerative diseases remains delicate, since the sensitivity of detection in this study was difficult to estimate: firstly because the exact concentration of fibrils was unknown (monomer concentration was 200  $\mu\text{M}$ , but the number of monomers per fibril unit could not be easily estimated), and secondly because of fluorescence inhomogeneities, probably deriving from the difficulty of mixing fibrils with agarose. Such a multi-frequency MRE experiment could be used on *ex vivo* and *in vivo* brain to screen for an effect of fibrils on mechanical properties. However, demonstrating a specific effect of fibrils among all the other microstructural changes involved in neurodegenerative disease and in *in vivo* conditions might require full brain characterization at the microscopic scale using quantitative and 3D histological methods (neuronal loss, glial activation, etc.) (Coelho et al. 2018).

#### 2.4.2. Relevance of multi-frequency study

Multi-frequency MRE allowed an effect of isolated fibrils on mechanical parameters to be shown for the first time. The power law exponent was significantly altered by fibril presence, unlike the storage modulus, wave speed and phase angle.

A tendency for  $G'$  to be smaller in the fibril groups at low frequency was noted. We think that this observation cannot be explained by a change in microstructure, and rather arise from an interference with the agarose polymerization process. In addition, the changes in wave speed and elasticity appear to be very similar on graphs, possibly because of similar absorption (i.e. imaginary part of  $k$ ) in both BSA and fibrils (Sinkus et al. 2018). The absence of a fibril effect at high frequencies on viscoelasticity parameters corroborates preclinical (Munder et al. 2017) and human (Murphy et al. 2011) findings.

Like the power law exponent,  $\varphi$  globally increased, however non significantly, in the presence of fibrils. Since both parameters were reported to provide information on microstructure (Schregel et al. 2012; Jugé et al. 2015), this similarity was expected. Some limitations in the use of  $\varphi$  have to be pointed out: the dependence of  $\varphi$  on  $G''$  value was problematic, since the phantoms were almost elastic: i.e.,  $G''$  was small compared to  $G'$ .  $\varphi$  values might thus have been affected by noise. As underlined by Dittman et al.,  $\varphi$  estimation is not robust to noise,

worsening this effect (Dittmann et al. 2016). This explains why the difference between fibrils and BSA was not significant when  $\varphi$  was considered only at a given frequency.

Another aspect ruling out  $\varphi$  as a reliable dispersion parameter is the frequency-dependence demonstrated here, which makes  $\varphi$  mathematically unrelated to  $y$  (Hiscox et al. 2016). As expected, the data exhibited a frequency power law, expressed by  $y$ , which stems from a fit of the wave speed to the six frequencies. If data additionally followed the rheological model of a spring pot, slope  $y$  could be calculated from phase angle at each individual frequency. Our data do not support this hypothesis, as shown by the fact that  $\varphi$  did not show the same separation for different material constructs as  $y$ . A theoretical model matching this observation is when both the temporal and the spatial operator in equation  $\varphi = \tan^{-1}\left(\frac{G''}{G'}\right)$  are of fractional order. This yields one parameter modifying the slope of the frequency behavior and an additional parameter impacting the ratio of  $G''$  to  $G'$  (Valtorta and Mazza 2006).

It seems difficult to dispense with multi-frequency MRE and to extract the power law parameter for fibril characterization. However, multi-frequency MRE is long to perform, *ex* or *in vivo*. It could benefit from sequences with reduced acquisition time (Klatt et al. 2013; Kearney et al. 2017; Guenther et al. 2019). We used six frequencies with a rather large range to enhance fitting quality, but the number of acquisitions could be reduced according to Clauset et al., since the power law model is well established (Clauset, Shalizi, and Newman 2009).

### 2.4.3. Perspectives for preclinical follow-up

In this study performed on phantoms, the presence of fibrils was the only factor affecting  $y$ . Under *in vivo* conditions, additional tissue complexity could mask the fibril effect that we measured in a simple phantom, and neurodegenerative diseases moreover involve several additional microscopic changes in brain. Microstructural changes such as demyelination (Schregel et al. 2012) or age-related decrease in neuron density (Sack et al. 2009) have also been shown to induce mechanical changes. Such variability makes the relationship between MRE measurements and biological processes even more difficult to elucidate. In the case of chronic multiple sclerosis, the specific structure triggering a modification of power law exponent is still unclear. Similarly, it is difficult to link phase angle variations to a specific physiological or pathological change in the brain:  $\varphi$  was found unchanged by an increase in cerebral blood flow (Chatelin et al. 2016), and decrease in neuron number (Freimann et al. 2013) and inflammation (Millward et al. 2015), while changes in  $\varphi$  were reported in rodents for

demyelination (Schregel et al. 2012) and in the hippocampal area of AD patients, regardless of amyloid status (Gerischer et al. 2018).  $\varphi$  also correlated with memory performance in healthy volunteers in the hippocampal area (Schwarb et al. 2016). Finally, the heterogeneity of the structural composition in the brain may make the fibril effect on  $y$  or  $\varphi$  brain-area dependent.

#### 2.4.4. Conclusion

In conclusion, the power law exponent derived from multi-frequency MRE data showed significant changes due to the presence of  $\alpha$ -Syn and A $\beta$  aggregates immersed in a homogeneous non-viscous medium. This phantom study isolated a specific effect of fibrils, independently of other changes associated with their accumulation in the brain.

### 2.5. Perspectives

Des expériences et résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article sont exposés dans la suite de ce chapitre. Ils constituent des pistes intéressantes pour poursuivre les travaux de cette thèse.

#### 2.5.1. Échantillons d'agarose

##### 2.5.1.1. Étude de la viscosité

Le module de perte  $G''$  a été analysé à l'aide du modèle linéaire mixte pour l'ensemble des fréquences acquises, pour les échantillons et ROIs décrits dans la section 2.2.1. L'évolution de  $G''$  n'avait pas été décrite dans l'article présenté dans les parties précédentes car cette variable est généralement plus sensible au bruit que  $G'$  (Manduca et al. 2001). Ainsi, une importante variabilité des valeurs de  $G''$  dans les inclusions de fibrilles est notable graphiquement (cf. Figure 24). Toutefois, une tendance à l'augmentation de  $G''$  dans le groupe des fibrilles à haute fréquence semble se dessiner, mais n'est pas significative.

Comme mentionné dans la partie 2.4.2, les fantômes utilisés sont très peu visqueux, mesurer des variations de  $G''$  n'est pas aisé. Cependant, une étude des comportements de  $G'$  et  $G''$  et  $\varphi$  à des fréquences plus extrêmes ( $f < 400$  Hz et  $f > 1200$  Hz) pourrait nous aider à trancher sur la possibilité de détecter les fibrilles en ERM mono-fréquentielle, et pourrait aussi donner des pistes d'explications concernant la dépendance en fréquence de  $\varphi$ . Des fréquences supérieures à 1200 Hz ne sont toutefois pas faciles à atteindre. La modification de la résolution ou des

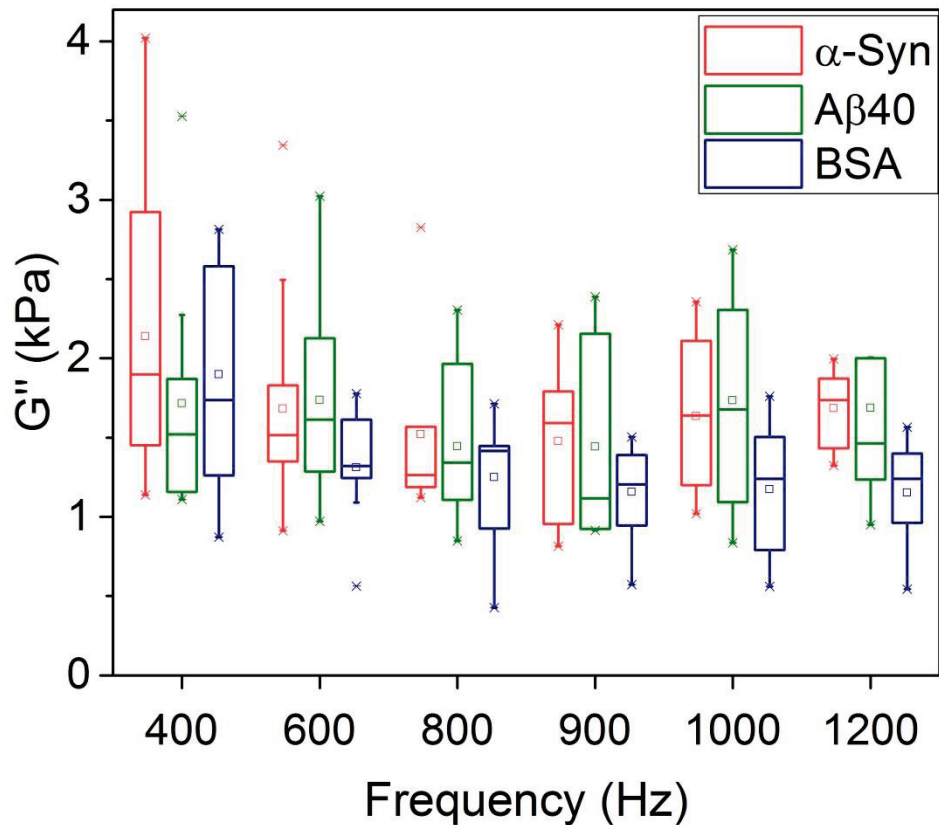


Figure 24 : Box-plots de  $G''$  pour les inclusions d' $\alpha$ -Syn, d'A $\beta$  et de BSA. Respectivement 11, 10 et 7 valeurs sont représentées à chaque fréquence. Les limites de chaque boîte représentent les valeurs du 25<sup>ème</sup> au 75<sup>ème</sup> percentile. Les valeurs maximales et minimales sont représentées par des croix, la valeur moyenne par un carré et la médiane par une ligne dans la boîte.

paramètres de filtre seraient toutefois nécessaires afin d'intégrer ces acquisitions à l'étude multifréquence, comme discuté dans l'Annexe 5, traitant de la reconstruction et du rapport entre la résolution spatiale utilisée et l'estimation des paramètres mécaniques. Dans la littérature, les deux paramètres liés  $G''$  et  $\varphi$  ont été identifiés comme des paramètres évoluant dans l'hippocampe au cours de la maladie d'Alzheimer, chez l'homme pour  $\varphi$  (L. M. Gerischer et al. 2016) et chez la souris pour  $G''$  (Munder et al. 2017). Il serait intéressant d'utiliser un fantôme visqueux pour vérifier si cette baisse de  $G''$  dans l'hippocampe peut être liée à une atténuation accrue des ondes par les fibrilles.

### 2.5.1.2. De la caractérisation à la détection des fibrilles

Pour tous les résultats présentés précédemment, des cartographies T2 et les résultats de macrofluorescence ont guidé le placement des régions d'intérêt (ROIs) pour l'estimation des paramètres mécaniques examinés. Les différences constatées entre la BSA et les fibrilles l'ont été parce que leur localisation spatiale était connue. Nous voulions aussi vérifier si ces



différences pouvaient ressortir visuellement sur des cartographies représentant la dispersion. Sur la Figure 25 on peut voir les cartographies de  $y$ . Elles ont été obtenues par l'ajustement linéaire du logarithme de la partie réelle du nombre d'onde  $k_r$  en fonction du logarithme de la fréquence, pixel à pixel. En effet, on a la relation suivante :

$$f = ak^z \leftrightarrow \log(f) = a + z\log(k)$$

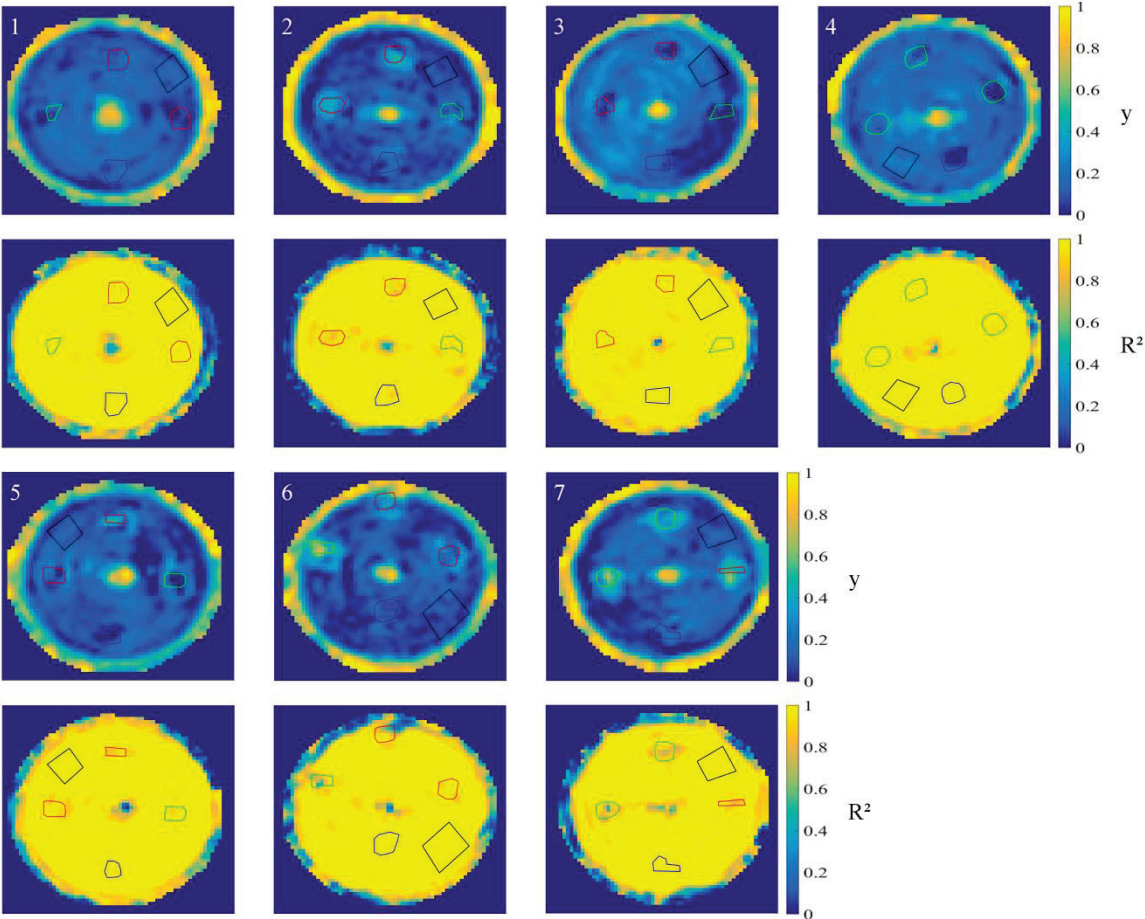


Figure 25 : Cartographies du paramètre  $y$  obtenues par ajustement linéaire des logarithmes du nombre d'onde réel  $k_r$  pour chaque pixel, et cartographies associées du coefficient de détermination  $R^2$ . Les ROIs représentées en rouge, vert, bleu et noir contiennent respectivement des fibrilles  $\alpha$ -Syn,  $A\beta$ , de la BSA ou de l'agarose simple.

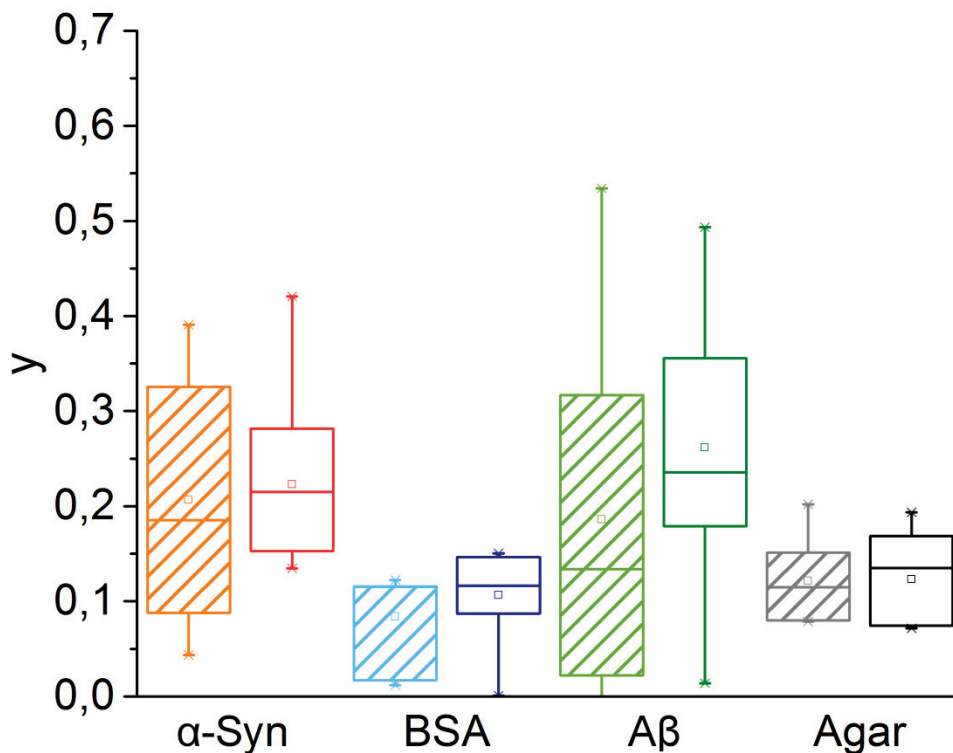
Une cartographie des coefficients de détermination  $R^2$  obtenue lors de l'ajustement linéaire permet de s'assurer de la qualité de l'ajustement en chaque point.

On a aussi :  $y = 1 - z$  (Holm and Sinkus 2010), les cartographies de  $z$  obtenues sont donc soustraites à 1 pour obtenir  $y$ .

La plupart des cartographies de  $y$  révèlent bien la présence des inclusions. Elles sont particulièrement visibles dans l'échantillon 7, où les trois inclusions de fibrilles apparaissent plus claires que l'inclusion de BSA et d'agarose. Les cartographies peuvent aussi se révéler utiles pour contrôler la qualité de la fabrication des échantillons. En effet on peut voir que  $y$  pour l'échantillon 3 est plus faible dans la région inférieure droite comparée au reste du fantôme. Or, dans cette zone se trouve une inclusion de fibrilles  $A\beta$  dont la valeur est aussi très faible. On voit aussi qu'au bord des échantillons, c'est-à-dire au bord de la ROI utilisée pour la reconstruction, le coefficient  $R^2$  est plus faible ( $< 0.7$ ), et que les valeurs de  $y$  sont surestimées. Cette surestimation est probablement liée à l'hypothèse d'homogénéité locale faite lors de l'inversion de l'équation d'onde, qui conduit généralement à des sous-estimations des paramètres mécaniques ( $G'$ ,  $G''$ ) aux interfaces telles que les bord des fantômes (Fovargue, Nordsletten, and Sinkus 2018; Mohammad Honarvar et al. 2013). En tenant compte de l'aspect qualitatif de ces cartographies de  $y$  et de  $R^2$  pendant l'exploitation des données, il serait possible de repérer et d'exclure des valeurs incohérentes liées à des biais expérimentaux et donc d'améliorer la qualité de l'analyse.

Les données  $y$  cartographiées pixel à pixel apparaissent cependant moins robustes au bruit que les données ajustées à partir des valeurs moyennes et des écarts-types des ROIs. En effet, des tendances similaires apparaissent dans les différentes régions pour ces deux méthodes mais une plus grande variabilité est visible dans les inclusions pour les valeurs de  $y$  calculées pixel à pixel puis moyennées (cf. Figure 26).





**Figure 26 : Représentation des exposants de la loi puissance  $y$  pour des inclusions de fibrilles  $\alpha$ -Syn et  $A\beta$ , de BSA et une région d'agarose, obtenus avec un ajustement linéaire pixel à pixel (boîtes hachurées) et avec un ajustement selon une loi puissance sur des moyennes de ROIs.**

Une analyse statistique des populations de fibrilles et de BSA des moyennes de  $y$  relevées directement dans les ROIs ne révèle pas de différence significative entre les trois groupes (Kruskal-Wallis :  $p = 0.19$ ). Cette importante variabilité pourrait être liée en partie à une différence de robustesse des algorithmes de calcul utilisés. Plus probablement, cet excès de variabilité est lié au type d'ajustement pixel à pixel, moins robuste au bruit. En effet pour les ajustements selon la loi puissance, des valeurs moyennes qui homogénéisent les données contenues dans la ROI, et un écart type qui permet de les pondérer sont utilisés. Dans le cas pixel à pixel, l'ajustement, sans pondération par les écarts-types, n'est pas « guidé » vers une convergence, les points aberrants ont donc un effet négatif sur les cartographies de  $y$ . Un meilleur conditionnement de l'ajustement, tenant compte de la valeur des pixels voisins ou une pondération artificielle pourrait contribuer à la diminution de la variabilité des données de  $y$  et améliorer la précision des cartographies de  $y$ .

De façon générale, la procédure de traitement des données pourrait bénéficier d'optimisation et d'une analyse à part entière. L'étude de l'influence du filtrage des données et de la résolution

spatiale sur les valeurs reconstruites en fonction de la fréquence, dont les enjeux sont abordés en Annexe 5, mériterait notamment d'être approfondie.

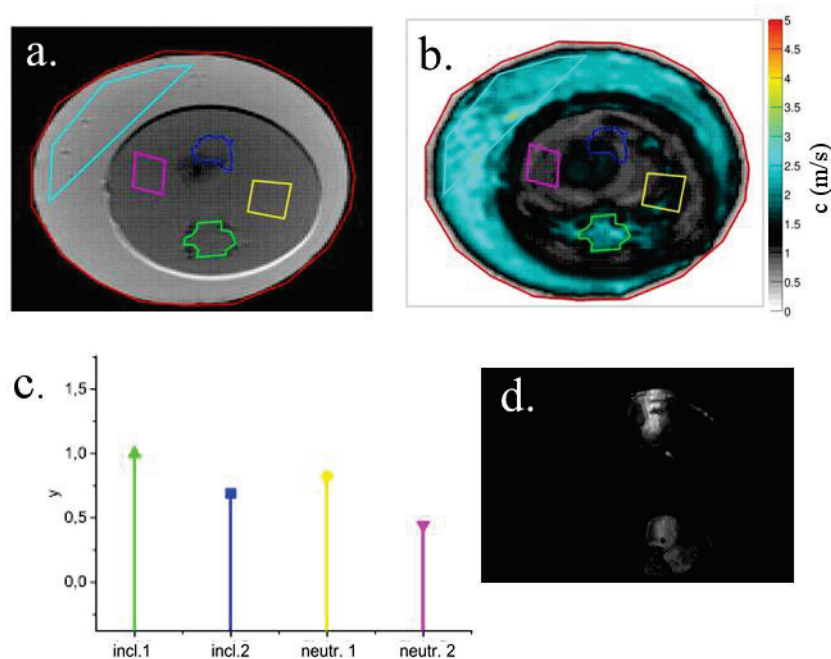
### 2.5.2. Vers une complexification des fantômes

Dans ce travail, nous avons pris le parti d'étudier les fibrilles dans un milieu extrêmement simple afin de pouvoir isoler leur effet. L'agarose est un milieu peu dispersif favorisant la détection de ces agrégats, dont l'effet pourrait être masqué *in vivo* par différents constituants du cerveau tels que les cellules, en particulier les neurones, mais aussi la matrice extracellulaire, qui contiennent de nombreux éléments fibreux faits d'assemblage de molécules. Ils possèdent donc probablement des propriétés quasi-fractales et pourraient affecter la dispersion et les valeurs de  $y$ . Se pose également la question de la mise en évidence des effets spécifiquement induits par des feuillets  $\beta$  agrégés en présence de processus physiopathologiques comme l'inflammation, la démyélinisation (Schregel et al. 2012), l'âge (Arani et al. 2015; Sack et al. 2009) ou la présence de vaisseaux sanguins (Jugé et al. 2015). Une variabilité observée entre les sujets interroge par ailleurs sur la relation entre les mesures ERM et l'hydratation ou la pression sanguine (Hirsch, Braun, and Sack 2017), rendant les liens entre les paramètres mécaniques et la biologie d'autant plus difficiles à démêler.

Une étape intermédiaire entre nos fantômes d'agarose et la détection de fibrilles *in vivo* est l'utilisation de fantômes dont les propriétés mécaniques, en particulier dispersives, se rapprocheraient de celles du cerveau. Dans cette optique nous avons conduit une étude préliminaire sur des fantômes contenant de la fibrine, un élément constitutif de la matrice extracellulaire, avec des propriétés plus dispersives que l'agarose.

Cinq échantillons de fibrine obtenus par la polymérisation de fibrinogène (SIGMA F8630) et de thrombine (SIGMA T4648) dans un solvant, et contenant deux inclusions de  $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$  de fibrilles  $A\beta$  mélangées à de la thioflavine ont été préparés puis incorporés dans un gel de paraffine (DTM 133460) afin d'empêcher leur mouvement. Les échantillons ont été acquis à des fréquences comprises entre 300 et 600 Hz. Au-delà, la longueur d'onde mesurée dans l'échantillon était trop petite en regard de la résolution spatiale de l'image (cf. Annexe 5) et les paramètres ERM auraient pu être sous-estimés lors de la reconstruction (Yue et al. 2017; Papazoglou et al. 2008). Les paramètres mécaniques ont été reconstruits selon la même méthodologie que celles décrite dans les parties 2.2.3 et 2.2.4.

Pour le premier échantillon, des résultats encourageants ont été obtenus (cf. Figure 27), l'effet des fibrilles A $\beta$  sur  $y$  semble être conservé dans ce milieu. En effet, le niveau de dispersion de la fibrine hors inclusions est bien supérieur à celui de l'agarose :  $y = 0.44$  et  $y = 0.82$  dans les deux zones où l'on a relevé  $y$  (référées comme neutr. sur la figure), contre  $y = 0.10$  relevé dans l'agarose (cf. partie 2.3.3) Pour l'inclusion 1,  $y$  a augmenté ( $y = 1.00$ ), l'ajustement saturant à sa valeur théorique maximale de 1. Pour la seconde inclusion, la valeur de  $y$  est proche de celle dans la fibrine ( $y = 0.69$ ), l'effet des fibrilles n'est pas mis en évidence dans cette inclusion. Sur l'image de macrofluorescence, une fuite des fibrilles hors de l'inclusion est apparente, ce qui pourrait expliquer le niveau bas de dispersion de cette seconde inclusion.



**Figure 27 :** a) Image par RM en magnitude d'un échantillon de fibrine entouré par un gel de paraffine. Deux inclusions contenant des fibrilles A $\beta$  sont contourées en vert et bleu, des ROIs dessinées dans la fibrine sont représentées en jaune et rose, et une ROI a été tracée en cyan dans la paraffine ; b) Cartographie de la vitesse d'onde obtenue à 600 Hz ; c)  $y$  moyens calculés dans les inclusions de fibrilles et dans la fibrine ; d) Image de macrofluorescence de l'échantillon, sans la paraffine (grossissement 1x).

Cependant, les 4 échantillons suivants n'ont révélé aucun effet mesurable des fibrilles. La macrofluorescence n'a pas non plus permis de localiser les fibrilles, et la polymérisation de la fibrine avait été très difficile à obtenir. Il en ressort que ces fantômes complexes sont difficiles à créer de façon reproductible, empêchant d'aboutir rapidement à des résultats exploitables. Il nous semble cependant que cette piste devrait être poursuivie. Si ces fantômes pouvaient être stabilisés, il serait intéressant de confirmer les résultats du premier échantillon, puis de le complexifier encore tout en contrôlant son environnement. Le solvant utilisé dans la fabrication de nos échantillons était un milieu de culture cellulaire, il devrait permettre d'ajouter des

cellules et de les maintenir en vie pendant le temps de l'imagerie de façon à se rapprocher encore d'un tissu. Une vascularisation peut aussi être envisagée, comme montré par Jugé et al. (Jugé et al. 2015).

## Conclusion

Dans ce chapitre nous avons rapporté des expériences d'ERM multifréquence menées sur des fantômes d'agarose contenant des fibrilles de type  $\alpha$ -Syn et A $\beta$ . Nous avons montré que les fibrilles étaient détectables dans un environnement simple et non dispersif. L'exposant de la loi puissance  $y$  apparaît comme une grandeur discriminante pour la détection de la microstructure en feuillets  $\beta$  des fibrilles. L'angle de phase  $\varphi$ , le module de conservation  $G'$  et le module de perte  $G''$  sont aussi modifiés par la présence de fibrilles, mais cette modification n'est pas assez significative pour pouvoir être détectée lors d'analyses réalisées à chaque fréquence de façon séparée.

Nous avons aussi abordé l'intérêt d'établir des cartographies du paramètre  $y$  afin de détecter visuellement la présence de fibrilles et d'améliorer l'interprétation des résultats d'analyse.

Afin de continuer l'étude des propriétés mécaniques des fibrilles à une échelle macroscopique, dans des milieux plus complexes, une expérience d'élastographie menée sur des fantômes de fibrine a été présentée. Une autre étape intermédiaire entre l'imagerie *in vitro* et l'imagerie *in vivo* est l'injection de fibrilles directement dans le cerveau des animaux. De cette façon, il est possible d'avoir une alternative aux modèles de souris transgéniques qui ne présenterait ni mort neuronale massive ni inflammation. Des acquisitions *ex vivo* ont aussi l'avantage de supprimer l'effet de la circulation sanguine, et donc du bruit lié au pouls ainsi que de pouvoir garder le même dispositif expérimental (bobine et excitateur). L'étude ERM *ex vivo* menée sur le cerveau de rats injectés de fibrine  $\alpha$ -Syn est l'objet du chapitre suivant.



# Chapitre 3

## ERM pour la détection des fibrilles *ex vivo*

### Sommaire

---

3.1. Introduction.....	70
3.2. Méthodes.....	71
3.2.1. Préparation des cerveaux.....	71
3.2.2. Macrofluorescence.....	73
3.2.3. ERM.....	74
3.2.4. Statistiques.....	78
3.3. Résultats et discussion.....	79
3.3.1. Effets de l'injection de fibrilles.....	79
3.3.2. Évaluation de la qualité des données.....	84
3.4. Perspectives.....	98
3.4.1. Améliorations des conditions d'acquisition.....	98
3.4.2. Améliorations de la méthode de reconstruction.....	101
3.4.3. Amélioration du modèle & acquisitions <i>in vivo</i> .....	103
Conclusion.....	104

---

## 3.1. Introduction

Dans le chapitre 2, nous avons montré que les fibrilles de type A $\beta$  et  $\alpha$ -Syn pouvaient être détectées en utilisant l'ERM multifréquence dans des fantômes d'agarose, dont les dimensions et la composition, à base de LCS artificiel, se rapprochaient de celles du cerveau de rat. Nous proposons de complexifier le modèle utilisé de façon limitée. Pour ce faire, nous avons injecté des fibrilles de manière localisée dans une région cérébrale de rats sains puis prélevé le cerveau. Le cerveau de rat, comme le cerveau de souris, contient des régions anatomiques se rapprochant de celles de l'homme, c'est donc un milieu dans lequel il est intéressant d'isoler le signal des fibrilles. Il présente l'avantage d'avoir des dimensions deux à trois fois plus importantes que celles des cerveaux de souris généralement utilisées dans les modèles transgéniques, ce qui diminue les contraintes sur la résolution des acquisitions IRM. L'étude *ex vivo* permet quant à elle de simplifier le dispositif expérimental, en s'affranchissant des contraintes d'anesthésie, de maintien de température et de contention de l'animal. La pulsation sanguine, utilisée comme source d'excitation mécanique en élastographie passive (Zorgani et al. 2015), pourrait aussi ajouter du bruit aux images ERM acquises, une étude *ex vivo* permet d'éliminer cette source de bruit.

L'injection de fibrilles dans un cerveau sain permet d'exercer un contrôle sur le lieu d'implantation des fibrilles. Dans le modèle utilisé, le striatum, qui a une localisation plutôt centrale dans le cerveau, a été utilisé. Cette localisation permet d'éviter de potentiels effets de bords qui dégradent la qualité de la reconstruction ERM. Une injection dans un hémisphère permet par ailleurs d'utiliser le second comme contrôle pour chaque rat. En outre, les agrégats injectés sont préparés selon un protocole maîtrisé, garantissant que les souches utilisées sont les mêmes que celles qui ont eu un effet sur la dispersion dans l'étude sur les fantômes d'agarose, et qui ont été caractérisées en microscopie électronique par transmission. L'injection permet par ailleurs de moduler la quantité d'agrégats injectés pour évaluer la sensibilité de la détection et de changer le type de fibrilles injectées, pour évaluer le rapport entre le type des fibrilles et la toxicité neuronale. Ce modèle, qui utilise des fibrilles peu neurotoxiques, crée une perte neuronale très limitée au site d'injection, ainsi qu'une réaction inflammatoire transitoire. Ce « découplage » est un avantage comparé aux modèles de souris transgéniques, pour lesquelles la mort neuronale et l'inflammation vont de pair avec le développement des fibrilles. Ces modèles transgéniques, plus physiologiques, produisent en continu des fibrilles, il serait donc difficile de savoir si un effet détecté par ERM serait en lien avec la présence de fibrilles matures



ou d'oligomères. Les études déjà menées en ERM chez la souris transgénique n'ont pas pu déterminer si les fibrilles seules pouvaient avoir un impact sur la rigidité des tissus, d'autres phénomènes pouvant potentiellement masquer, annuler ou renforcer leur effet (Majumdar et al. 2017; Murphy et al. 2012; Munder et al. 2018).

Ce modèle de rat injecté semble donc une bonne alternative aux études sur souris transgéniques ou sur l'humain présentées dans la partie 1.2.3.1. En effet, il est plus simple et évite des incertitudes sur l'interprétation des résultats quant à la sensibilité de l'ERM aux fibrilles. Dans ce chapitre, ce modèle a été utilisé pour évaluer l'impact des fibrilles sur différents paramètres ERM. Les cerveaux ont été prélevés puis imagés avant que leurs propriétés mécaniques ne se dégradent. Les lieux d'injection et de stabulation des rats étaient différents du lieu d'imagerie. Nous avons essayé de les sacrifier sur le lieu de l'injection pour des raisons pratiques et de congeler les cerveaux pour les conserver. Des tests d'ERM infructueux sur cerveaux congelés, présentés en Annexe 8, expliquent que cette option n'ait pas été retenue. Des rats sains et des rats injectés avec une toxine (lipopolysaccharides ou LPS) provoquant neurodégénérescence et inflammation massives ont aussi été étudiés. La partie Méthodes présente l'ensemble des animaux et des tests réalisés sur ces animaux, mais les résultats concernant les trois groupes (fibrilles, LPS, témoins) seront traités séparément dans la partie Résultats et discussion.

## 3.2. Méthodes

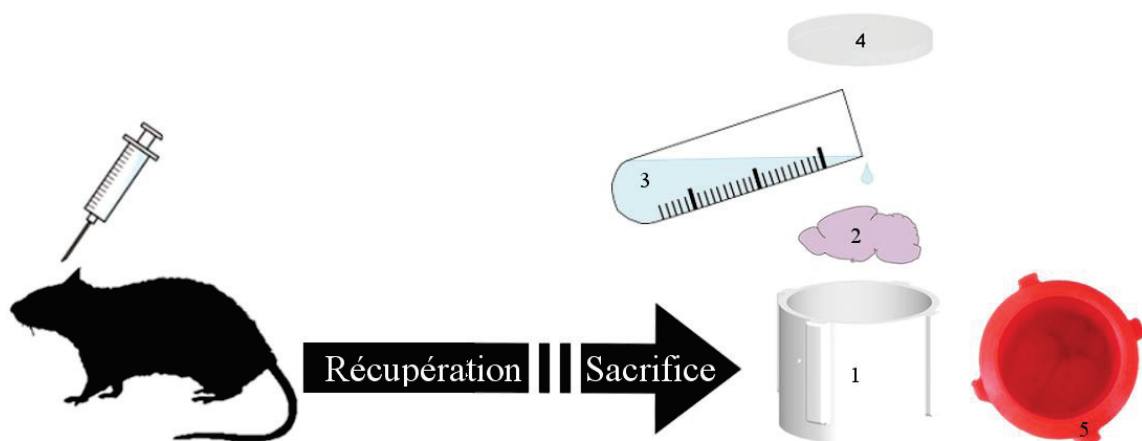
### 3.2.1. Préparation des cerveaux

Toutes les expériences réalisées sur les animaux l'ont été dans le cadre d'un projet d'expérimentation animale (PEA) approuvé par le comité d'éthique local (APAFIS#5892-2016063014207327v2).

7 rats adultes Sprague Dawley, mâles pesant entre 200 et 320 g ont reçu une injection intracérébrale de 10  $\mu$ L de fibrilles  $\alpha$ -Syn (préparation décrite dans la partie 2.2.1), dans le striatum droit. Au cours du chapitre 2, nous avons vu que les fibrilles de type  $A\beta$  utilisées avaient modifié les paramètres ERM des inclusions de façon plus variable, que les inclusions contenant des fibrilles de type  $\alpha$ -Syn. De plus, lors de précédentes expériences réalisées par l'équipe BioRan (CRNL), les protéines de type  $A\beta$  avaient révélé posséder un plus grand pouvoir neurotoxique que l' $\alpha$ -Syn. Afin d'obtenir des cerveaux dans lesquels les fibrilles étaient présentes mais relativement peu de dommages cellulaires n'avaient été provoqués, seules les

fibrilles de type  $\alpha$ -Syn ont été utilisées. Le striatum controlatéral a été injecté avec 2  $\mu$ L de solution tampon (PBS) pour servir de contrôle. Cette différence de volume entre les injections d' $\alpha$ -Syn et de PBS s'explique par une volonté d'injecter un volume important de fibrilles afin de faciliter leur caractérisation tout en limitant le volume total injecté dans le cerveau. Par la suite, des expériences avec 5  $\mu$ L injectés dans chaque hémisphère étaient prévues.

Après 3 à 4 semaines de récupération nécessaire à la résorption de l'inflammation, les rats ont été sacrifiés et leurs cerveaux prélevés. Ils ont été immédiatement placés dans de le porte échantillon dédié au banc d'imagerie ERM et recouverts d'agarose à 1 % constitué avec du LCS artificiel (cf. section 2.2.1 pour la préparation de l'agarose), afin de maintenir l'homéostasie et l'hydratation du cerveau le plus longtemps possible. De la paraffine (DTM 133460) a été utilisée pour recouvrir l'agarose et empêcher le mouvement d'ensemble du cerveau et de l'agarose pendant les acquisitions ERM. La préparation des échantillons est schématisée sur la Figure 28.



**Figure 28 : Schéma de la préparation des échantillons, de gauche à droite : injection du cerveau de rat *in vivo*, après récupération post-opératoire et sacrifice, le cerveau (2) est prélevé, placé dans le porte-échantillon (1). Il est recouvert par de l'agarose à 1 % fabriqué à base de LCS à 40°C (3) et de la paraffine (4). L'image 5 montre une photographie du porte-échantillon contenant un cerveau recouvert de la solution d'agarose.**

Les cerveaux de deux rats sains ont été prélevés et préparés selon le même protocole, ils ont été caractérisés par ERM pour vérifier que les valeurs des données mécaniques mesurées dans le striatum droit et le striatum gauche étaient bien comparables.

Deux rats ont aussi reçu une injection unilatérale de LPS, des toxines conduisant à une inflammation et à une mort neuronale massive. Leurs cerveaux ont été prélevés 24 et 48h après l'injection. Ces rats ont été utilisés pour confirmer que nous mesurons bien une diminution de  $G^*$  en cas de mort neuronale importante, conformément à ce qui a été observé dans des études

précédentes (Klein et al. 2014; Hain et al. 2016; Freimann et al. 2013; Murphy et al. 2011, 2012).

### 3.2.2. Macrofluorescence

Après l'imagerie ERM, les cerveaux ont été fixés dans du formaldéhyde dilué dans du PBS à 4 %, congelés puis sectionnés en coupes de 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur au cryostat selon l'incidence des coupes IRM et déposés sur des lames. Les lames ont ensuite été baignées dans une coloration contenant un ligand des structures amyloïdes, l'oligothiophène luminescent LCO p-FTAA (1  $\mu\text{M}$ ) (Åslund et al. 2009) pendant 10 minutes. Un rinçage des lames avec un mélange 50/50 % de PBS et d'éthanol suivi de deux rinçages au PBS seul a ensuite été effectué. Le LCO p-FTAA, comme la thioflavine, se lie aux structures amyloïdes et est fluorescent dans le vert. Les lames ont été imagées par macrofluorescence comme décrit dans la section 2.2.2 pour les échantillons d'agarose (cf. Figure 29).

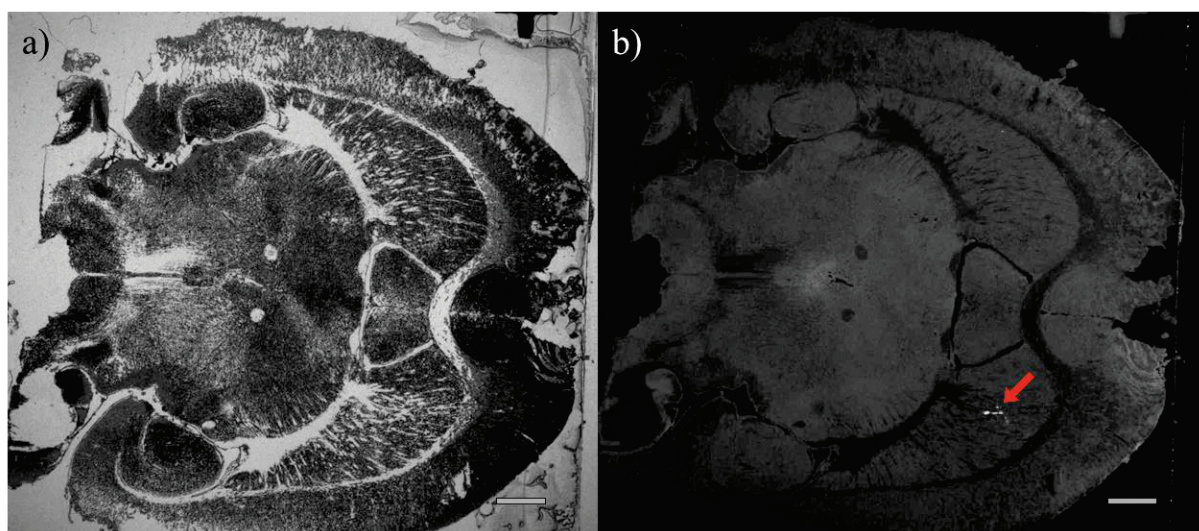


Figure 29 : a) Image en lumière blanche d'une lame de cerveau de rat (grossissement 1x), b) Image de macrofluorescence faite avec le même champ de vue et le même grossissement. La fluorescence verte apparaît ici en blanc (pointée par une flèche rouge) et indique la présence de fibrilles liées avec la thioflavine-T. Échelle : 2 mm.

### 3.2.3. ERM

#### 3.2.3.1. *Dispositif expérimental*

Le porte échantillon, la bobine Helmholtz et l'ensemble du banc expérimental sont les mêmes que pour les expériences sur les échantillons d'agarose (cf. 2.2.3.1). Pour assurer une meilleure propagation des ondes dans les cerveaux, de la glue a été déposée sur l'aiguille, avant que le porte-échantillon soit placé dans la bobine, afin d'assurer un meilleur contact entre le cerveau et l'aiguille. Les cerveaux ont globalement été orientés dans la même direction dans l'IRM, afin d'éviter des biais expérimentaux liés à une propagation différente des ondes dans les différents cerveaux.

#### 3.2.3.2. *Acquisition*

Toutes les acquisitions ont été réalisées sur un IRM préclinique 4.7 T (BioSpec Bruker, Ettlingen, Allemagne). La séquence décrite dans la partie 2.2.3.2 a été utilisée séquentiellement à 1000, 800, 900, 1200 et 1000 Hz. Cette réduction du nombre de fréquences d'excitation par rapport au protocole avec les échantillons d'agarose a été faite de façon à réduire le temps total d'examen et éviter une dégradation trop importante des tissus pendant le temps d'acquisition. Le temps d'examen était environ d'1h30, et le temps entre le sacrifice de l'animal et la fin de l'imagerie était compris entre 2h10 et 4h20, ce qui reste inférieur à 6h, temps après lequel la dégradation tissulaire va s'opérer (Bilston 2011).

Une séquence RARE pondérée en T2 (TE/TR = 30/3525 ms) avec une résolution spatiale plus élevée a été acquise pour permettre le repérage des régions anatomiques du cerveau, et d'éventuelles traces de dommages liés aux injections (œdème, micro-hémorragie...).

Les paramètres de séquence ERM et anatomique sont donnés dans la Table 3.

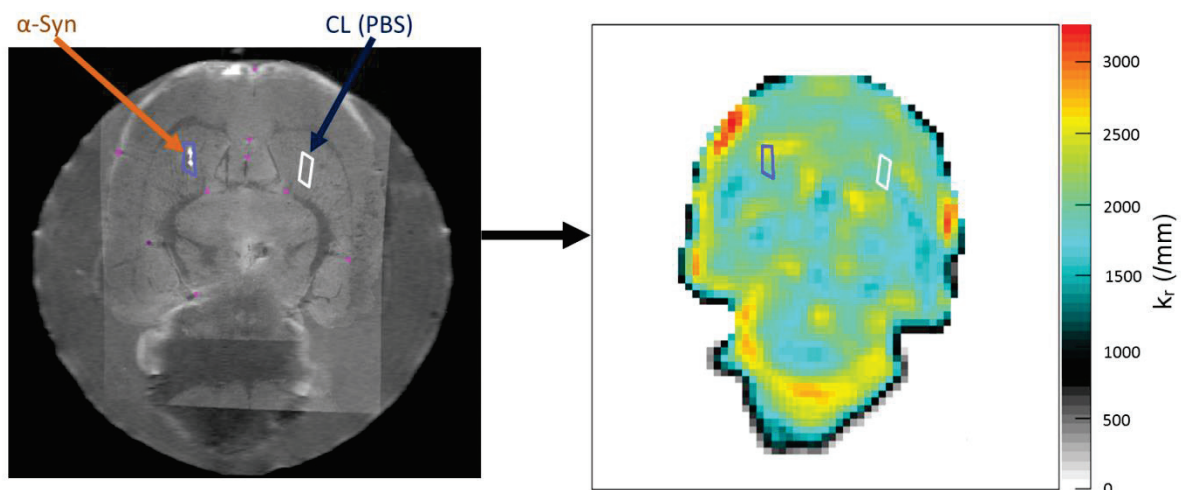
**Table 3 : Paramètres d’acquisitions pour les séquences anatomique et ERM. Les acquisitions ERM ont été répétées 3 fois à chaque fréquence avec les gradients d’encodage du mouvement (GEM) dans la direction de coupe, de phase et de lecture (NA, non applicable).**

	RARE anatomique	RARE ERM			
Champ de vue	25 x 25 mm <sup>2</sup>	25 x 25 mm <sup>2</sup>			
Matrice	256 x 128	64 x 64			
Résolution spatiale	98 x 195 µm <sup>2</sup>	391 x 391 µm <sup>2</sup>			
Épaisseur de coupe	1 mm	1 mm			
Nombre de coupes	7	7			
Nombre de décalages de l’image de phase	NA	8			
Fréquence d’excitation mécanique	NA	800	900	1000	1200
Nombre de périodes de GEM	NA	8	9	10	8

### 3.2.3.3. *Sélection des régions d’intérêt*

Les images de macrofluorescence ont été recalées sur les images anatomiques en magnitude de la séquence RARE par une méthode utilisant des points de repères placés sur les deux images (BigWarp, ImageJ 1.52n, NIH, USA) et les régions d’intérêt (ROI) fondées sur le signal de fluorescence ont été dessinées manuellement sur les images anatomiques (cf. Figure 30). Les images anatomiques ayant été réalisées avec le même champ de vue, et la même position que les images ERM, les ROIs ont pu être reportées sur la coupe centrale des images acquises par ERM. En plus de ces ROIs contenant les agrégats d’ $\alpha$ -Syn, des ROIs de dimensions similaires ont été dessinées dans le striatum controlatéral pour servir de contrôle (notées CL sur les figures), ainsi que des ROIs entourant grossièrement tout le cerveau (notées WB), utilisées comme masque pour le post-traitement. Les ROIs dans le striatum sont de petites dimensions (comprises entre 4 et 18 voxels, alors que les ROIs du cerveau comptent entre 1555 et 1957 voxels).

Pour les cerveaux injectés avec du LPS, la zone affectée, visible en hyper-signal sur l'image



**Figure 30** : à gauche, superposition de l'image RARE anatomique et de l'image de macrofluorescence, les marques roses indiquent les points de repères utilisés pour le recalage des images de macrofluorescence. Les ROIs violette et blanche sont les ROIs utilisées pour extraire les paramètres correspondant à l'injection d'α-Syn et à l'injection controlatérale (CL). Ces ROIs sont reportées sur l'image de la partie réelle du nombre d'onde  $k_r$  issue de la reconstruction des images ERM.

anatomique IRM a été reportée sur les images ERM et une ROI équivalente en taille a été dessinée dans l'hémisphère controlatéral (31–69 voxels). Sur les cerveaux sains, de petites ROIs (entre 13 et 17 voxels) ont été dessinées dans les striatums de chaque hémisphère.

Afin de confronter nos résultats aux données de la littérature comparant les propriétés mécaniques de plusieurs régions cérébrales, des ROIs ont été dessinées dans le cortex, le corps calleux, le striatum, le tronc cérébral et l'hippocampe, en excluant les bords du masque et les régions proches de l'aiguille servant à transmettre l'excitation mécanique.

#### 3.2.3.4. *Post-traitement*

Comme dans la partie 2.2.4, les données ont été traitées comme décrit par Sinkus et al. (Sinkus et al. 2005), avec utilisation d'un algorithme de déroulement de phase et d'un filtre Gaussien (kernel =  $2 \times 2 \times 2$ ,  $\sigma = 0.39 \times 0.39 \times 1 \text{ mm}^3$ ). L'amplitude du mouvement  $A$  dans les trois directions, les non-linéarités NL, le module de cisaillement  $G^*$  et le nombre d'onde complexe  $k$  ont été calculés pour chaque fréquence acquise.

La moyenne et l'écart-type de l'amplitude totale  $\left( A_{tot} = \sqrt{A_x^2 + A_y^2 + A_z^2} \right)$  des ondes,  $G'$ ,  $G''$  et  $k_r$  dans l'ensemble de ces ROIs ont été calculés et  $\varphi$  a été dérivé. Afin d'estimer la qualité



des élastogrammes obtenus, les non-linéarités ont été calculées. Elles correspondent à l'énergie stockée dans les harmoniques supérieures, et sont définies comme :

$$NL = \frac{\sqrt{A_x^2 + A_y^2 + A_z^2}}{\sqrt{A_{x_{max}}^2 + A_{y_{max}}^2 + A_{z_{max}}^2}}, \text{ avec } A_{x,y,z} \text{ l'amplitude dans les trois directions de l'espace et}$$

$A_{x_{max},y_{max},z_{max}}$  l'amplitude maximale dans la coupe étudiée.

La relation entre la fréquence et la partie réelle du nombre d'onde  $k_r$  a été ajustée selon une loi puissance, et l'exposant  $z$  de cette loi extrait. Certaines valeurs de  $k_r$ , jugées aberrantes (6 acquisitions sur 35 pour les rats injectés avec de l' $\alpha$ -Syn, 2 acquisitions sur 10 pour les rats sains et 1 acquisition sur 10 pour les rats injectés avec du LPS), ont été exclues de l'ajustement. Ces valeurs étaient généralement trop faibles par rapport à celles acquises pour le même cerveau à des fréquences différentes, considérant que  $k_r$  augmente avec la fréquence. Le coefficient  $y$  correspondant à l'exposant de la loi puissance de la vitesse est obtenu d'après les équations introduites par Holms et al. :  $y = 1 - z$  (Holm and Sinkus 2010). Dans la suite du manuscrit, l'exposant de la loi puissance fera référence au paramètre  $y$ . Les cartographies  $y$  ont été calculées grâce à un ajustement pixel à pixel comme décrit dans la partie 2.4.5.2. La Figure 31 illustre des cartographies de la phase déroulée ainsi que de la magnitude du module de cisaillement  $|G^*|$  à 800 et 1200 Hz, avec la carte des  $y$  dérivée et la carte des coefficients de détermination  $R^2$  associée.



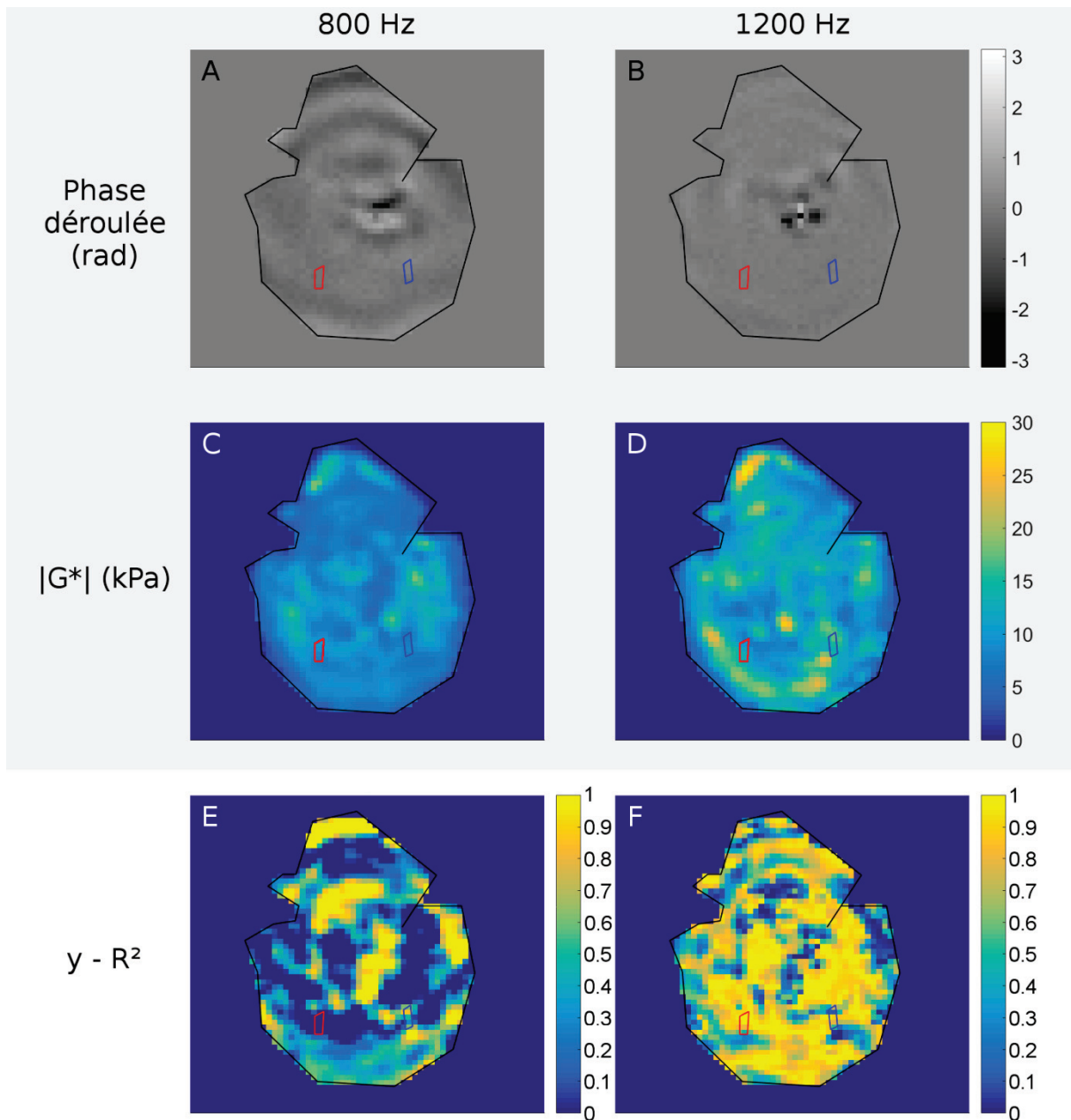


Figure 31 : Cartographies de la phase déroulée à 800 Hz (A) et 1200 Hz (B) et de la magnitude du module de cisaillement  $|G^*|$  pour ces mêmes fréquences (C et D), ainsi que le coefficient  $\gamma$  cartographié à partir d'un ajustement linéaire pixel à pixel des cartographies à toutes les fréquences des cartographies  $k_r$  (E), et cartographie des coefficients de corrélation linéaire  $R^2$  associée (F) pour un rat. Les ROIs dessinées sur les cartographies correspondent à l'injection d' $\alpha$ -Syn (rouge), la ROI controlatérale (bleu) et au cerveau entier (noir).

### 3.2.4. Statistiques

Tous les résultats sont notés comme la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel OriginPro 2016.

Les différences entre les trois groupes ( $\alpha$ -Syn, CL, WB) pour le paramètre  $\gamma$  ont été évaluées grâce à une analyse de variance non-paramétrique (test de Kruskal-Wallis), suivie par des tests

de Kolmogorov-Smirnov deux à deux. Étant donné le faible nombre de rats dans l'étude, la limite de significativité n'a pas été corrigée pour la comparaison multiple des groupes.

Ensuite, une analyse de variance a été faite pour confirmer la dépendance en fréquence de l'angle de phase  $\varphi$  chez les rats, ainsi que la correspondance entre les mesures de  $y$  et  $\varphi$ , établie dans le chapitre 2 pour des échantillons d'agarose.

Enfin, l'analyse des données dérivées de l'imagerie des rats sains et des rats injectés avec du LPS, de même que la comparaison des paramètres viscoélastiques mono-fréquence des différentes régions anatomiques cérébrales a été qualitative, le nombre de rats étudiés étant trop faible pour que les analyses aient un sens statistique.

### 3.3. Résultats et discussion

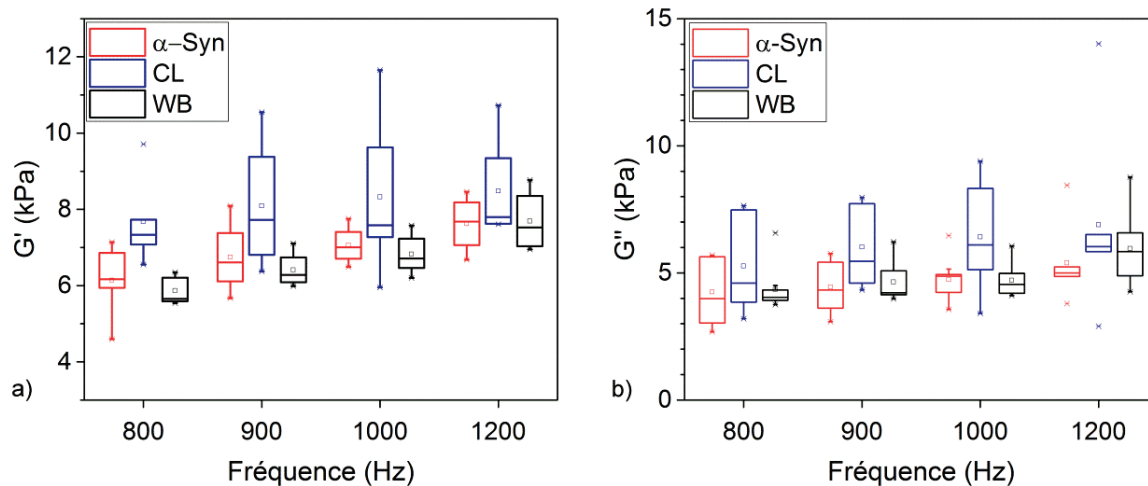
Dans cette partie, les résultats concernant les différents types de rats sont présentés séparément. Afin de clarifier cette partie, des encadrés résument chaque section en une phrase.

#### 3.3.1. Effets de l'injection de fibrilles

Deux rats sur sept ont été exclus de cette étude. Pour le premier, des lésions neuronales apparaissaient en noir sur les images de fluorescence. Pour le deuxième rat, la fluorescence a révélé que les fibrilles avaient migré dans le ventricule. Ce sont donc des complications liées à l'injection d'un volume relativement important de fibrilles.

##### 3.3.1.1. *Effet de l'injection sur les paramètres élastiques*

Des différences en  $G'$  et  $G''$  apparaissent sur les graphes entre la zone injectée avec de l' $\alpha$ -Syn et la zone injectée avec la solution tampon, particulièrement à basse fréquence (800 Hz) pour  $G'$  (cf. Figure 32.a) et à hautes fréquences (1000 – 1200 Hz) pour  $G''$  (cf. Figure 32.b). Individuellement,  $G'$  est bien inférieur dans la région  $\alpha$ -Syn comparé à la région de l'injection controlatérale pour 15 acquisitions sur 21.  $G''$  est inférieur dans la région  $\alpha$ -Syn comparé à la région controlatérale pour 17 acquisitions sur 21. Pour la plupart des rats et des fréquences imagées, la région ayant reçu une injection de solution tampon apparaît à la fois plus rigide et plus visqueuse que la région ayant reçu une injection de fibrilles et que le cerveau dans son ensemble. On observe par ailleurs un étalement important des résultats dans la région controlatérale.



**Figure 32 : Graphes du module de conservation  $G'$  et du module de perte  $G''$  en fonction de la fréquence d'excitation mécanique chez les 5 rats étudiés, dans la ROI contenant l' $\alpha$ -Syn, la ROI controlatérale (CL) et le cerveau entier (WB).**

La grande variabilité des mesures en général peut, au moins en partie, être attribuée au faible nombre de voxels dans les ROIs. L'écart dans l'estimation des propriétés mécaniques entre la première et la dernière acquisition à 1000 Hz étant faible (cf. partie 3.3.2.1), la part de variabilité attribuée à une différence de préparation des cerveaux ne peut pas être très importante. Une discussion plus générale sur la qualité des données ERM utilisées sera menée dans la partie 3.3.2.

L'excès de variabilité observé pour les mesures de la ROI controlatérale est, quant à lui, difficile à expliquer, l'imagerie T2 et la microscopie n'ayant révélé aucune lésion dans les striatums controlatéraux.

Dans le chapitre 2, nous avons constaté que la valeur de  $G''$  était augmentée, de manière non-significative à haute fréquence, en présence de fibrilles, contrairement à ce qui est observé chez le rat, et la valeur de  $G'$  diminuée. Les différences observées pour un nombre plus important de valeurs apparaissaient moins nettement que dans le cas des cerveaux de rat, et l'hypothèse d'une perturbation du phénomène de réticulation de l'agarose par les fibrilles avait été faite. Dans le cas des cerveaux de rats, les fibrilles ont été simplement injectées et les modifications de  $G'$  et de  $G''$ , en contradiction avec nos premières données, doivent être expliquées autrement. D'autant plus que les différentes études conduites chez la souris et chez l'homme n'ont pas permis d'attribuer aux fibrilles des modifications des paramètres viscoélastiques en ERM mono-fréquence (Munder et al. 2018; Murphy et al. 2011; Majumdar et al. 2017). Tout d'abord, les inclusions dans les fantômes étaient homogènes et de dimensions très importantes, contrairement aux régions dans lesquelles des fibrilles ont été observées chez les rats. Les objets

étudiés sont donc assez différents et il est possible que les fibrilles, très concentrées, influencent  $G'$  et  $G''$  différemment dans ces deux milieux. Des dommages de la matrice extracellulaire non résorbés, liés au volume relativement élevé de solution injectée (10  $\mu\text{L}$ ), pourraient avoir causé cette baisse de  $G'$  et de  $G''$ . Cette hypothèse pourrait être contrôlée par l'injection de 10  $\mu\text{L}$  de PBS seul dans un cerveau et une analyse histologique de la matrice extracellulaire lors de prochains essais.

Enfin, la différence de rigidité entre le cerveau entier et la zone contrôle est confirmée par les observations faites chez les rats sains et LPS (cf. Partie 3.3.2.2). Nos résultats indiquent donc que le striatum a une valeur de  $G'$  plus élevée que le cerveau dans son ensemble.

En conclusion, le modèle utilisé permet donc bien de s'affranchir de phénomènes comme la mort neuronale ou l'inflammation, mais influe sur les paramètres ERM mono-fréquence.

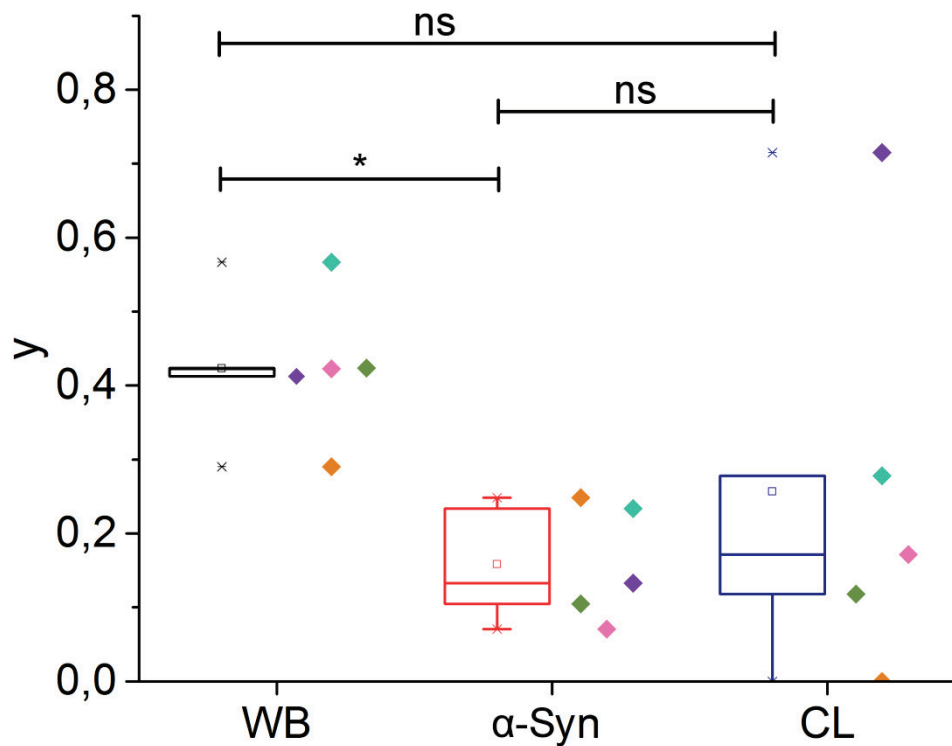
L'injection de 10  $\mu\text{L}$  d' $\alpha$ -Syn provoque une diminution de  $G'$  et de  $G''$  par rapport à l'injection controlatérale de tampon (1-2  $\mu\text{L}$ )

### 3.3.1.2. Absence d'effet de l'injection sur $\gamma$

Dans le chapitre 2, un ajustement pixel à pixel avait été introduit. Même si cet ajustement montrait des faiblesses sur le plan quantitatif (sensibilité au bruit), il apparaissait intéressant pour repérer qualitativement des zones pour lesquelles le paramètre  $\gamma$  variait de façon locale. Sur les cartographies établies pour les cerveaux de rat, aucune modification marquée dans la région contenant l' $\alpha$ -Syn, ou dans celle de l'injection controlatérale n'est décelable. En outre, l'ajustement de  $\gamma$  sature pour de nombreux pixels aux bornes au-delà desquelles les valeurs de  $\gamma$  n'ont plus de sens physique (0 et 1), et le coefficient de détermination est souvent inférieur à 70 % (cf. Figure 31). Les limitations de cet ajustement, plus sensible à la variabilité de la qualité des mesures, sont ici exacerbées par le faible nombre de fréquences imagées et une qualité des données moindre. Ces cartographies n'ont donc pas été analysées dans la suite. Comme dans le chapitre 2, les résultats du paramètre  $\gamma$  discutés ci-dessous sont issus des ajustements des moyennes et écarts-types calculés dans chaque ROI.

Pour ces données, des différences significatives apparaissent entre le cerveau entier et les deux régions d'injection ( $p = 0.008$  vs injection de fibrilles et  $p = 0.08$  vs injection controlatérale, cf. Figure 33). En revanche, aucune différence n'apparaît entre la région injectée avec les fibrilles et la région injectée avec la solution tampon ( $p = 0.87$ ).

Ces résultats indiquent que le striatum est une zone moins dispersive que le cerveau entier,



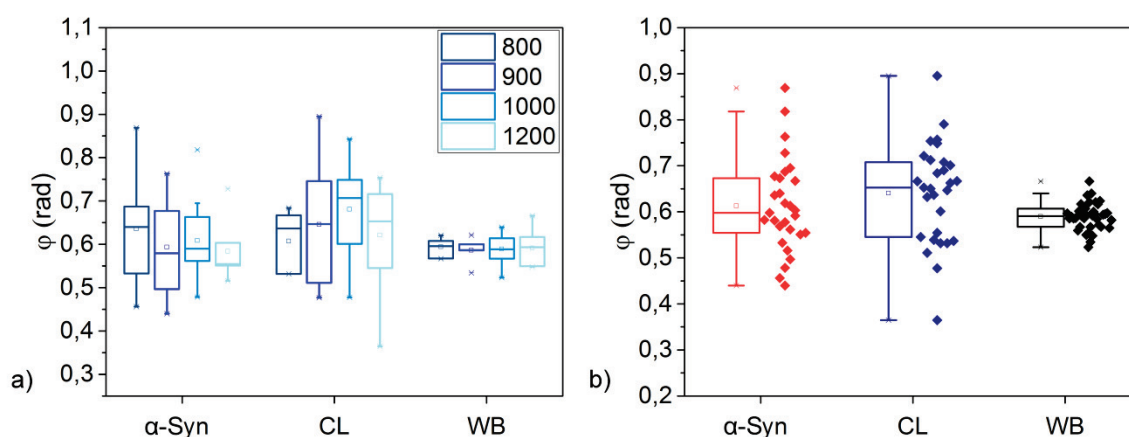
**Figure 33 : Diagramme en boîte de l'exposant de la loi puissance  $y$  obtenu à partir d'ajustements des cartographies  $k_r$ , dans le cerveau entier (WB), la ROI contenant l' $\alpha$ -Syn et sa controlatérale (CL). Les valeurs pour chacun des 5 rats sont représentées à droite des boîtes, chaque couleur correspond à un rat particulier.**

comme le confirme l'analyse des rats sains (cf. partie 3.3.2.3). De plus, la présence d' $\alpha$ -Syn n'a pas suffisamment modifié la microstructure du cerveau pour affecter  $y$  dans le striatum. De nombreuses structures cérébrales fibreuses comme les axones ou l'acide hyaluronique présent dans la matrice extracellulaire pourraient avoir des propriétés quasi-fractales masquant l'effet des fibrilles. Il a par ailleurs déjà été démontré que la présence de myéline pouvait affecter les propriétés dispersives du cerveau (Schregel et al. 2012). La vascularisation, même sans circulation sanguine, peut aussi affecter  $y$  (Jugé et al. 2015). Parmi toutes ces structures, l'effet de la présence de fibrilles, est probablement trop faible pour pouvoir être détecté dans nos conditions expérimentales. Il serait intéressant de reproduire cette expérience avec une meilleure qualité des images ERM pour vérifier si, avec un étalement moins important des mesures, cet effet reste invisible.

Par ailleurs, malgré les effets sur  $G'$  et  $G''$  relevés dans la partie précédente, il n'y a pas eu d'altération de  $y$  du fait de l'injection d'un volume conséquent de fibrilles dans le striatum. Les

changements de structure liés à l'injection ne concernent donc probablement pas la structure microscopique des tissus mais plutôt leur densité.

Le paramètre  $\varphi$ , pour sa part, a été étudié avec l'ensemble des fréquences regroupées, car aucune dépendance en fréquence n'a été montrée, en accord avec la théorie ( $p = 0.23$ , cf. Figure 34.a). Cette absence de dépendance en fréquence dans le cas des cerveaux de rats peut être liée aux propriétés intrinsèques du cerveau, ou au fait que la gamme de fréquence soit moins large que celle utilisée dans le chapitre 2 (400 – 1200 Hz). Aucune différence significative pour  $\varphi$  n'a été révélée entre les groupes du cerveau entier, de l'injection d' $\alpha$ -Syn et de l'injection controlatérale ( $p = 0.31$ ). Sur le graphe représentant les valeurs de  $\varphi$  pour les trois groupes, aucune tendance permettant de distinguer les trois groupes n'apparaît ( $\varphi_{WB} = 0.58 \pm 0.02$  ;  $\varphi_{\alpha-Syn} = 0.60 \pm 0.10$  ;  $\varphi_{CL} = 0.62 \pm 0.10$ , cf. Figure 34.b). L'étalement des données calculées est très important dans les deux ROIs contenant les injections, ce qui explique en partie que la différence entre le cerveau et ces deux régions, constatée pour l'exposant de la loi puissance, ne se retrouve pas pour le paramètre  $\varphi$ . Dans le chapitre 2, une sensibilité au bruit de  $\varphi$  avait été soulignée. La variabilité des résultats dans le calcul de  $\varphi$  semble exacerbée dans le cas des rats. Une diminution de l'étalement des valeurs de  $G'$  et de  $G''$ , nécessaires au calcul de  $\varphi$ , contribuerait à clarifier les résultats.



**Figure 34 : Angle de phase  $\varphi$  calculé pour 5 rats dans la région de l'injection d' $\alpha$ -Syn, la région controlatérale ayant reçu une injection de PBS (CL) et le cerveau entier (WB), les boîtes à moustache sont représentées a) séparément pour chaque fréquence d'acquisition (5 valeurs par boîte) et b) avec un regroupement de toutes les fréquences d'acquisition, avec 21 valeurs représentées pour chaque boîte.**

Pour conclure, il semble que l'injection d' $\alpha$ -Syn dans le striatum du cerveau ne modifie pas les propriétés dispersives du cerveau de rat. La modification de ces propriétés, que nous avons

établies dans des fantômes d'agarose au chapitre 2, pourrait être négligeable comparée à l'effet de diverses structures cérébrales, cellulaires et extracellulaires, ou comparé à la variabilité importante des données que nous avons pu constater. Une amélioration de la qualité des données pourrait largement bénéficier à l'analyse, en diminuant cette variabilité pour l'ensemble des paramètres étudiés.

Cette variabilité importante des paramètres ERM calculés a conduit à une analyse plus fine de la qualité des données dans la section suivante (3.3.2) et pose les bases des améliorations de protocole nécessaires afin de solidifier nos résultats lors de prochaines expériences sur des cerveaux *ex vivo*.

L'injection d' $\alpha$ -Syn ne modifie pas les propriétés dispersives du striatum. L'effet des fibrilles pourrait être masqué par d'autres structures cérébrales.

### 3.3.2. Évaluation de la qualité des données

Plusieurs aspects des résultats, présentés dans la partie précédente, nous ont interpellés sur la qualité des données et interrogés sur la pertinence de leur exploitation dans le cadre de l'étude des fibrilles. Dans cette partie, nous présentons les résultats de plusieurs tests visant à évaluer la fiabilité des données que nous avons exploitées. Nous nous sommes tout d'abord attachés à étudier l'origine des défauts relevés dans les cartographies des paramètres ERM, puis à vérifier la cohérence des paramètres ERM avec des éléments biologiques. Nous avons finalement comparé les données régionales que nous avons obtenues avec des résultats de la littérature.

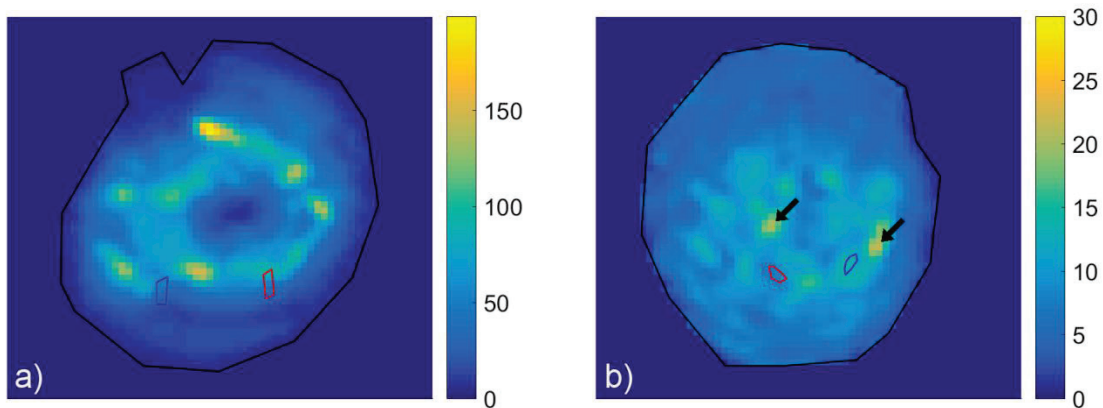
#### 3.3.2.1. Critères de qualité des données brutes

Contrairement aux données acquises pour les échantillons dans le Chapitre 2, un étalement important des paramètres ERM et plusieurs anomalies dans les élastogrammes reconstruits nous ont conduits à remettre en question la qualité des données pour les cerveaux de rats. Des valeurs de  $G^*$  anormalement élevées (et les valeurs de  $k_r$  anormalement faibles) à 900, 1000 et 1200 Hz ont été exclues des ajustements réalisés (avec respectivement 2, 3 et 1 acquisitions). Ces erreurs sont difficiles à expliquer du point de vue de l'expérience car elles ne se sont pas toujours produites à la même fréquence, et les acquisitions supprimées à 1000 Hz ne l'ont été que pour une seule des deux acquisitions, soit la première, soit la dernière des acquisitions ERM. Nous avons par ailleurs constaté :



- un anneau de très fortes valeurs de  $|G^*|$  entourant l'aiguille dans certains cas (cf. Figure 35.a) ;
- l'existence de points chauds sans explication anatomique évidente (cf. Figure 35.b).

Ces défauts apparents dans les cartographies des paramètres ERM nous interrogent sur la pertinence de nos choix en matière de reconstruction et de dispositif expérimental. Nous avons essayé de comprendre leur origine dans cette partie.

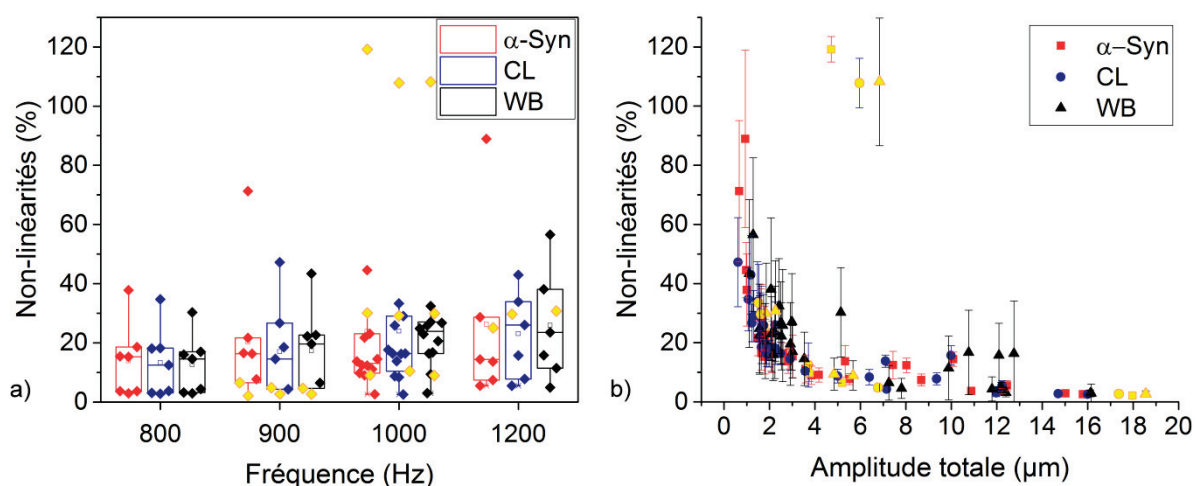


**Figure 35 : Module de cisaillement  $|G^*|$  (en kPa) a) pour un rat imagé avec une fréquence d'excitation de 1000 Hz, sur laquelle un anneau avec des très fortes valeurs de  $|G^*|$  ( $> 20$  kPa) et b) pour un rat imagé à 900 Hz et sur laquelle deux flèches noires indiquent des points chauds ( $\approx 25$  kPa).**

### Les non-linéarités, un outil adapté pour quantifier la qualité des données ?

La cartographie des non-linéarités est un indicateur de la qualité des données : plus les non-linéarités augmentent, moins la reconstruction a de chances de produire des cartographies correspondant aux caractéristiques mécaniques réelles de l'échantillon étudié. Les non-linéarités augmentent avec la fréquence, et diminuent quand l'amplitude totale augmente<sup>7</sup> (cf. Figure 36).

<sup>7</sup> Ces deux comportements sont liés car les ondes sont amorties plus rapidement à haute fréquence, et une amplitude plus faible ne permet pas de distinguer les ondes du bruit ambiant, augmentant ainsi les non-linéarités.



**Figure 36 : Graphes des non-linéarités en fonction a) de la fréquence d’excitation et b) de l’amplitude totale, pour les ROIs contenant l’injection d’ $\alpha$ -Syn, l’injection controlatérale (CL) et le cerveau entier (WB). Les points colorés en jaune indiquent les acquisitions supprimées de l’ajustement selon la loi puissance.**

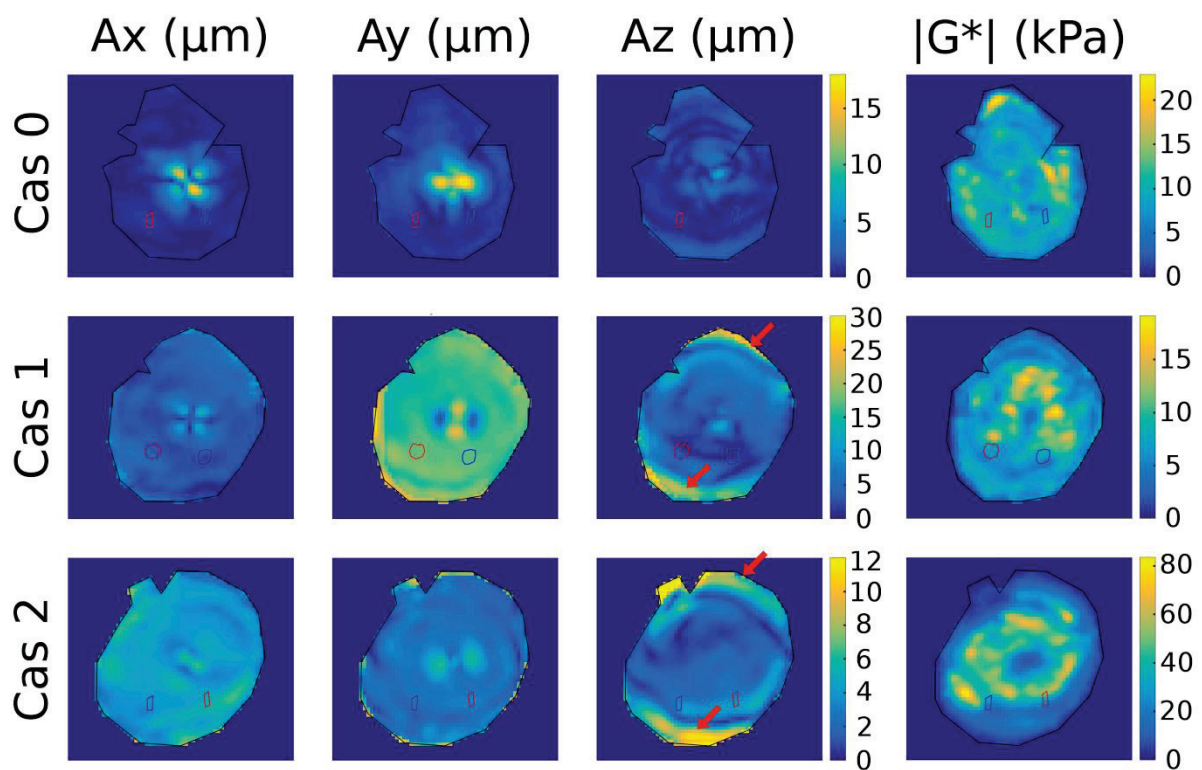
Une valeur seuil de non-linéarités empiriquement fixée à 30 % sépare généralement les images de bonne et de mauvaise qualité. À 1000 et 1200 Hz, certaines des données supprimées (en jaune sur le graphe) montrent bien des non-linéarités aux alentours de 30 %, mais on voit que les acquisitions aux non-linéarités élevées (> 60 %) n’ont pas été systématiquement écartées. De même, des acquisitions avec des non-linéarités faibles ont été exclues. Il se révèle donc difficile de fixer une limite empirique pour les non-linéarités, au-delà de laquelle les données devraient être exclues de l’analyse. Sur la Figure 36.b, il apparaît en revanche que lorsque la valeur des non-linéarités est élevée en regard de l’amplitude du mouvement relevée, il est possible d’identifier une acquisition problématique. C’est le cas pour une acquisition à 1000 Hz. Aucune des autres valeurs supprimées ne peut être expliquée par les non-linéarités, qui se révèlent donc un outil insuffisant dans le cadre de cette étude.

Les non-linéarités ne suffisent pas à détecter les acquisitions produisant des élastogrammes aberrants

### Distribution de l’amplitude des ondes

Nous nous sommes intéressés au cas de deux rats en particulier (cas 1 et 2), dont les non-linéarités étaient faibles (< 10 %) et l’amplitude moyenne dans le cerveau entier relativement élevée (> 5  $\mu$ m). Pour ces deux rats,  $|G^*|$  est élevé dans la région centrale et chute fortement aux bords du cerveau (cf. Figure 37).

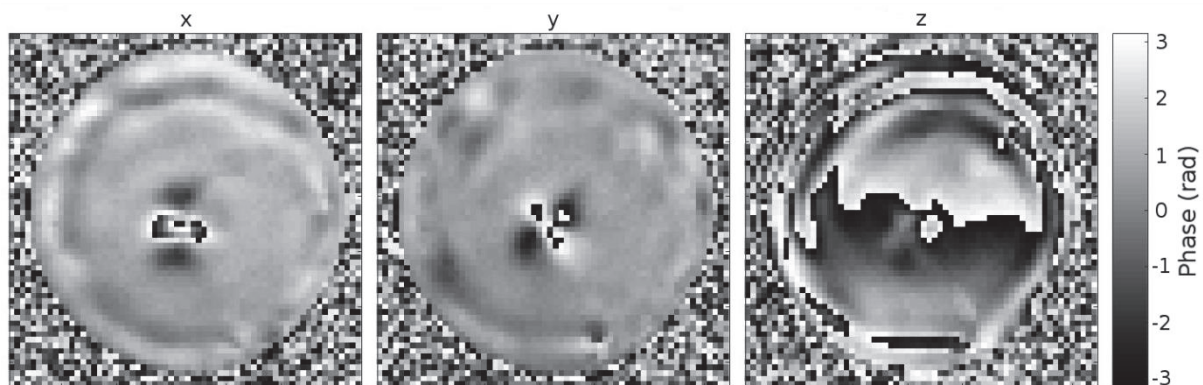
Cette chute est liée à une amplitude très importante des ondes aux bords de l'échantillon, visible lorsque le mouvement est encodé dans la direction de coupe (z). En comparant ces images à celles d'un échantillon dont la reconstruction s'est à priori déroulée normalement (cas 0) et pour lequel l'amplitude maximale se trouve au centre de l'échantillon, c'est-à-dire à l'emplacement de l'aiguille, il est clair que pour les cas 1 et 2 l'amplitude maximale a été déportée sur les bords de l'échantillon, dans le cas 2, le pic d'amplitude central est même imperceptible. Pour ces deux rats, l'estimation de  $|G^*|$  dans la zone centrale est très importante comparée aux bords de l'échantillon. Dans le deuxième cas, les valeurs de  $|G^*|$  montent localement jusqu'à 80 kPa. Dans le premier cas, c'est la répartition des valeurs fortes en anneau central qui peut alerter sur un problème dans l'estimation des valeurs de  $|G^*|$ .



**Figure 37 : Amplitude des ondes A dans les trois directions x, y et z (correspondant aux directions de lecture, de phase et de coupe, respectivement) et module de cisaillement  $|G^*|$  à 900 Hz. A et  $|G^*|$  ont été calculés dans le cas d'une reconstruction réussie (cas 0) et dans le cas de deux rats (cas 1 et 2) pour lesquels les non-linéarités et l'amplitude étaient importantes. Des flèches rouges pointent des zones où l'amplitude est particulièrement élevée. Les ROIs indiquées représentent le lieu de l'injection (en rouge), le contrôle controlatéral (en bleu) et le contour du cerveau (en noir).**

Sur les images de phase non déroulée du cas 1 (Figure 38) sont visibles des ondes très enroulées aux bords de l'échantillon, uniquement dans la direction de coupe (z), qui se propagent visiblement depuis les parois du porte-échantillon. Cet enroulement n'existe pas aux autres fréquences. Il est aussi présent à 1000 Hz pour le rat dont les non-linéarités et l'amplitude

étaient élevées et pour un autre rat aux non-linéarités plus faibles ( $\approx 10\%$ ). Un phénomène commun est donc à la base de ces quatre acquisitions supprimées, et une analyse qualitative des amplitudes dans les trois directions s'avère bénéfique pour détecter les acquisitions ayant défaut de reconstruction, probablement lié à cet enroulement important, aux réflexions des ondes au bord de l'échantillon, et aux interférences entre les ondes provenant du centre et du bord de l'échantillon.



**Figure 38 : Images de phase non déroulées encodées dans les trois directions de l'espace x, y et z pour un rat (cas 1)**

Les ondes provenant du bord de l'échantillon sont probablement la conséquence d'une application trop importante de glue sur l'aiguille avant le placement du porte-échantillon dans la bobine. La glue ayant coulé a pu créer un contact entre le support de l'aiguille (à seulement 1 ou 2 mm du porte échantillon) et le porte-échantillon. Lors d'analyses mécaniques hors de l'IRM, une résonance propre du banc à 1000 Hz a été mise en évidence (cf. Annexe 6), ce qui expliquerait pourquoi un repliement aussi important a été constaté pour les deux acquisitions autour de 1000 Hz. Le banc comportant de nombreuses parties mobiles ajustées à la main pour chaque expérience, il est possible que cette résonance sélective ait été légèrement décalée vers 900 Hz pour les deux autres acquisitions problématiques.

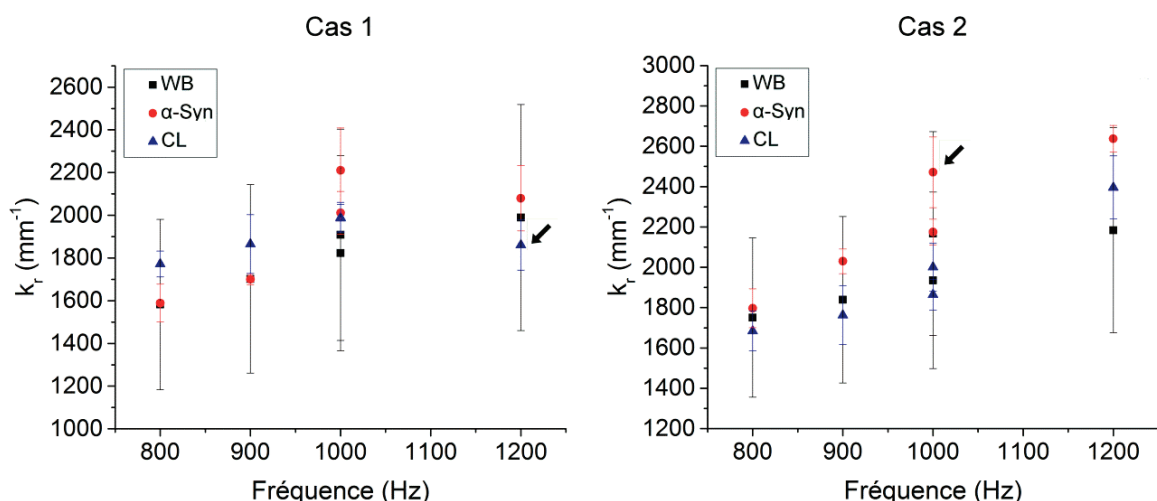
Dans le cas des fantômes qui n'étaient pas ou très peu visqueux, les ondes étaient bien moins atténuées et leur propagation dans le cerveau était très homogène. Le compromis entre une amplitude d'onde loin de l'aiguille suffisante et un enroulement limité proche de l'excitateur n'avait donc pas besoin d'être résolu. De plus, le contact entre l'aiguille et les échantillons permettait la propagation d'ondes de cisaillement sans avoir recours à la glue. Le problème n'était donc pas apparu.

L'amplitude des ondes envoyées par le générateur basse fréquence est la même pour les acquisitions faites dans les trois directions. Pour pouvoir conserver de l'amplitude dans les directions de lecture et de phase, nous avons utilisé une amplitude qui provoquait de l'enroulement dans la direction de coupe, de façon à conserver une amplitude d'onde supérieure au bruit dans les trois directions d'encodage du mouvement. Il aurait peut-être été préférable d'avoir une amplitude très faible dans les directions de phase et de lecture tout en faisant disparaître cet enroulement trop important dans la direction de coupe.

Une mise en place non reproductible du banc et le collage du porte-échantillon à l'actuateur expliquent la plupart des défauts de reconstruction

### Fiabilité de l'ajustement

En ce qui concerne la dernière acquisition exclue à 1000 Hz et l'acquisition supprimée à 1200 Hz, les différents paramètres mécaniques ( $k_r$ ,  $G'$ ,  $G''$ ) ont des valeurs proches de celles relevées pour les autres rats à ces fréquences, les non-linéarités sont relativement faibles (autour de 30 %) et l'amplitude des ondes a une valeur dans la moyenne de nos acquisitions pour des acquisitions à haute fréquence (1.5  $\mu\text{m}$  au minimum) et une distribution habituelle. Néanmoins,  $k_r$  est censé augmenter avec la fréquence. Sur la Figure 39, les valeurs de  $k_r$  obtenues à 1000 Hz dans un premier cas (Cas 1) et à 1200 Hz dans un second cas (Cas 2) ne suivent pas cette loi pour au moins l'une des trois ROIs. Cette différence par rapport aux valeurs voisines se retrouve pour quelques acquisitions sur échantillons mais n'a pas perturbé les ajustements selon



**Figure 39 : partie réelle du nombre d'onde  $k_r$  en fonction de la fréquence d'excitation pour deux rats (Cas 1 et Cas 2) dont des acquisitions ont été supprimées lors de l'ajustement selon la loi puissance. Les points posant problème lors d'un ajustement réalisé avec toutes les données sont pointés par une flèche noire**



la loi puissance. Dans le cas des rats, où peu de fréquences différentes ont été acquises, sur une gamme de fréquences restreinte, le poids relatif de chaque acquisition dans l'ajustement est plus important et une erreur d'estimation sur un point est critique pour l'estimation de l'exposant de la loi puissance (Clauset, Shalizi, and Newman 2009). Dans les deux cas que nous avons soulignés, les régions concernées par une mésestimation des paramètres mécaniques étaient des zones contenant peu de voxels ( $\alpha$ -Syn ou controlatérale). Le moyennage sur peu de points augmente l'impact du bruit et est une source de variabilité dans l'estimation des paramètres mécaniques, variabilité qui à son tour peut fausser l'ajustement.

L'ajustement de la loi puissance, sensible au bruit, pâtit du petit nombre de fréquences acquises et du faible nombre de pixels dans les régions d'intérêt

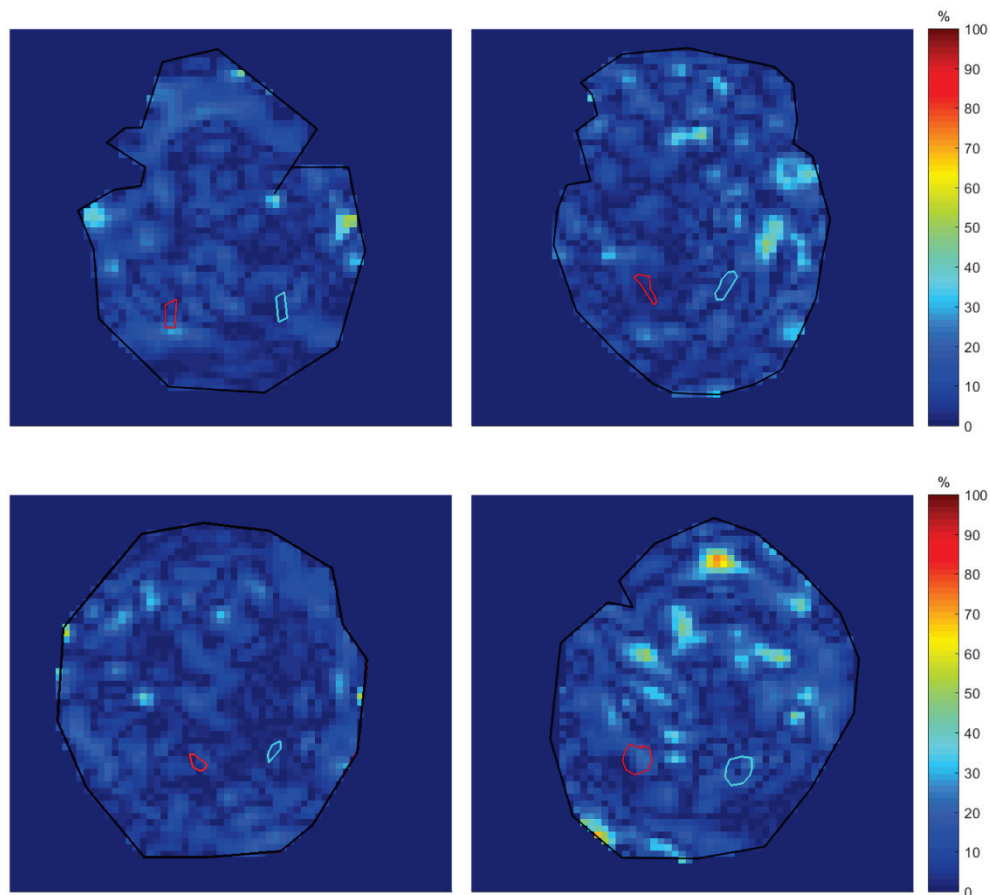
### **Reproductibilité de l'acquisition et robustesse au bruit de la reconstruction**

Afin de garantir un ajustement qui ait du sens, l'acquisition doit être reproductible et la reconstruction des données robuste au bruit. Dans ces conditions, si l'on considère que le cerveau *ex vivo* évolue peu pendant le temps d'imagerie, les cartographies de  $k_r$  reconstruites pour les deux acquisitions à 1000 Hz, faites au début et à la fin de l'imagerie ERM, devraient se ressembler.

Chez les quatre rats injectés pour lesquels toutes les acquisitions à 1000 Hz ont été conservées, l'écart relatif entre la première et la dernière acquisition  $\left(\frac{|Acq_2 - Acq_1|}{Acq_1} * 100\right)$  est globalement faible (dans les ROIs, les moyennes des écarts relatifs sont comprises entre 3 et 13 %) malgré leur petite taille, ce qui paraît indiquer une méthode d'acquisition et de reconstruction assez stables vers l'avant du cerveau pour pouvoir les exploiter dans un ajustement. Cependant, certains voxels ont un écart relatif plus important, allant jusqu'à 60 % (cf. Figure 40). De plus, des acquisitions à 1000 Hz ont été exclues des ajustements. En cause, probablement la mise en place du banc d'élastographie et sa fréquence de résonance qui aurait pu être décalée entre la première et la dernière acquisition.

Par ailleurs, les points chauds au centre des images sont reproduits sur les deux acquisitions à 1000 Hz, ce qui signifie qu'ils ont probablement une réalité physique. Nous avons indiqué qu'ils n'avaient pas d'origine anatomique claire, mais ils pourraient provenir de la coagulation du sang dans les cerveaux non perfusés, formant des zones rigides ponctuelles.

Les comparaisons effectuées nous permettent finalement d'utiliser les cartographies du paramètre  $k_r$  pour réaliser les ajustements selon la loi puissance avec une confiance relative.



**Figure 40 : Cartographies des écarts relatifs entre les valeurs de  $k_r$  pour la première et la deuxième acquisition à 1000 Hz réalisées pour quatre rats dont les deux valeurs ont été utilisées dans des ajustements selon la loi puissance. Les ROIs utilisées pour l'analyse sont représentées sur ces cartographies : cerveau entier en noir, injection d' $\alpha$ -Syn en rouge et injection controlatérale en bleu.**

L'écart relatif entre les deux acquisitions à 1000 Hz pour  $k_r$  reste  $< 13\%$  en moyenne dans les régions de l' $\alpha$ -Syn et de l'injection tampon.

### **Conclusion**

Dans cette partie, nous avons identifié plusieurs défauts du banc d'élastographie : une mise en place plus reproductible du banc en augmentant le nombre d'éléments fixes, assurant une amplitude des ondes similaire à chaque fréquence, ainsi qu'un contact entre l'aiguille et le cerveau qui ne risquerait pas de provoquer le mouvement de l'ensemble du porte-échantillon seraient des améliorations à apporter au banc. Malgré ces défauts, nous avons jugé la qualité des ondes et des élastogrammes suffisante pour valider l'analyse qui a été faite dans les parties



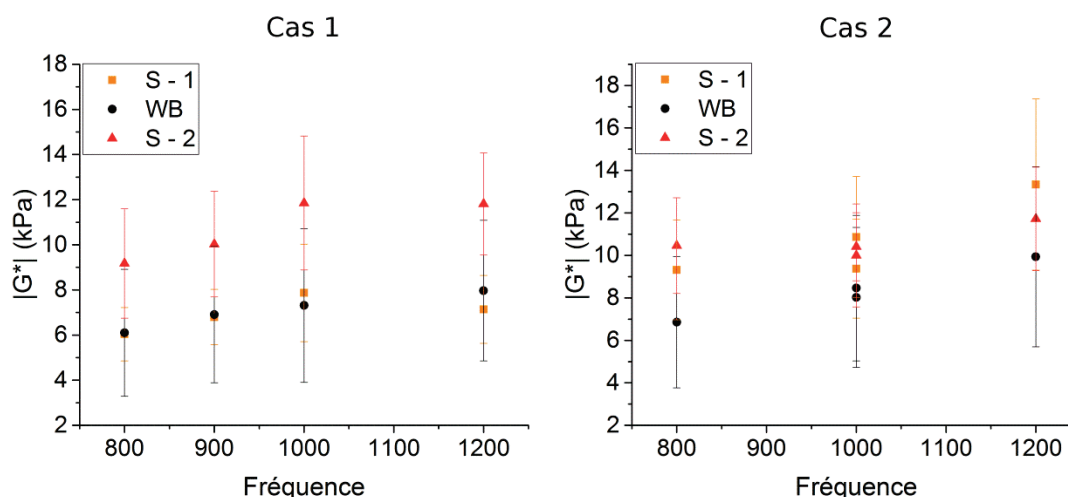
3.1 et 3.2. Dans la section suivante, les résultats obtenus pour les rats sains et les rats LPS sont présentés.

### 3.3.2.2. *Vraisemblance des résultats du point de vue biologique*

Des rats sains et des rats injectés avec du LPS, une toxine induisant inflammation et mort neuronale (Brown and Neher 2010) ont été utilisés comme contrôles pour vérifier : 1) la symétrie des mesures faites dans les deux hémisphères, en particulier pour les deux striatum ; 2) l'évolution des paramètres ERM lors d'une mort neuronale massive.

#### Rats sains

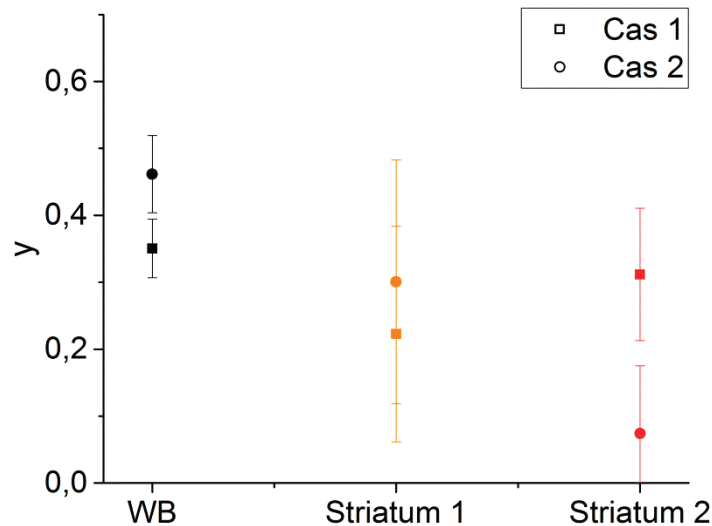
En ce qui concerne la symétrie des données reconstruites dans le striatum, les valeurs de  $|G^*|$  (cf. Figure 41) et de  $\gamma$  (cf. Figure 42) ont été comparées dans les striatums gauche et droit de deux rats sains. Le module de cisaillement  $|G^*|$  a été étudié dans cette partie car les précédentes études présentant l'effet de la mort neuronale dans les tissus ont trouvé à la fois des valeurs basses de  $G'$  (Freimann et al. 2013; Klein et al. 2014), de  $G''$  (Hain et al. 2016), il n'est donc pas nécessaire de les étudier séparément. Pour le premier rat (cas 1), le striatum (S-2) paraît plus rigide que l'autre (S-1), dont les valeurs de  $|G^*|$  sont comparables à celles du cerveau entier, alors que pour le second rat (cas 2), les valeurs de  $|G^*|$  dans les deux striatums sont plus élevées que celles du cerveau entier et l'écart relatif entre les deux mesures est de seulement 10 à 20 %, selon la fréquence considérée.



**Figure 41 : Graphes du module de cisaillement en fonction de la fréquence d'excitation évalués dans le cerveau entier (WB) et les deux striatums (S-1 et S-2) dans le cas de deux rats sains.**

Dans le cas 1, l'aiguille est très excentrée vers le côté S-1 et  $|G^*|$  est plus élevé dans l'hémisphère où l'aiguille est placée. Il est possible que les ondes, à l'interface entre les deux hémisphères, subissent des réflexions ou de la diffusion et que la propagation dans le second

hémisphère soit plus bruitée, entraînant ainsi une sous-estimation de la longueur d'onde et donc une sous-estimation de  $|G^*|^8$ . Cet excès de bruit est difficile à repérer sur les images de phase, en s'intéressant au profil des ondes (non montré ici), une variabilité plus importante dans la répartition de la phase est détectable, même si elle n'est pas très prononcée.



**Figure 42 : Exposé de la loi puissance  $y$  dans le cerveau entier (WB) et les striatums de chaque hémisphère, dans le cas de deux rats sains.**

Cette hypothèse est difficile à vérifier, d'autant plus qu'un décentrage de l'aiguille ne semble pas poser de problème majeur pour les autres rats et que l'asymétrie des cartographies de  $|G^*|$  n'existe pas à toutes les fréquences imagées, mais reste cependant crédible, combinée à d'autres facteurs tels qu'une amplitude d'ondes ou un RSB relativement faibles. Un mauvais centrage de l'aiguille pourrait donc poser problème dans notre analyse, le striatum gauche servant de contrôle pour l'injection faite dans le striatum droit. Le striatum des rats sains, comme celui des rats injectés, apparaît donc ici plus rigide que le cerveau entier.

En ce qui concerne l'exposé de la loi puissance  $y$ , on constate qu'il est plus élevé dans le cerveau entier que dans le striatum, dans le cas 1 comme dans le cas 2, confirmant les résultats de la partie 3.3.1.2. Comme expliqué précédemment (cf. partie 2.4.5.2), le faible nombre de pixels dans les striatums comparé au cerveau entier (et donc le bruit plus important) augmente l'erreur sur les ajustements de  $y$ .

<sup>8</sup> Lorsqu'il y a du bruit, des variations à haute fréquence sont constatées dans la phase, la longueur d'onde est donc sous-estimée, les paramètres mécaniques tels que  $c$  ou  $|G^*|$  sont en conséquence sous-estimés lors de la reconstruction locale.

Ces deux rats sains confirment les observations faites dans les parties 3.1 et 3.2, où nous avons constaté que les parties réelle et imaginaire du module de cisaillement  $G^*$  avaient des valeurs plus élevées dans le striatum que dans le cerveau entier, et que l'exposant de la loi puissance était plus élevé dans le cerveau entier que dans le striatum. Dans les deux cas, les valeurs obtenues pour le cerveau entier et le striatum sont proches des valeurs du cerveau entier et de la ROI controlatérale des parties précédentes.

Les données mesurées à droite et à gauche du cerveau sont symétriques lorsque l'aiguille est bien centrée ; les comparaisons de  $G'$  et de  $y$  faites entre le striatum et le cerveau entier pour les rats injectés ( $\alpha$ -Syn) sont confirmées chez les rats sains

### **Rats LPS**

La toxine LPS provoquant inflammation et mort neuronale, une baisse de  $|G^*|$  dans le striatum injecté est attendue (Freimann et al. 2013; Li et al. 2015; Klein et al. 2014; Hain et al. 2016; Munder et al. 2018; Murphy et al. 2012; Majumdar et al. 2017; Wuerfel et al. 2010; Streitberger et al. 2012). Pour le premier rat, dont l'injection de LPS avait été faite 24h avant le sacrifice de l'animal, l'image T2 anatomique n'a pas révélé la présence de nécrose. Nous nous sommes donc intéressés seulement au deuxième rat, sacrifié 48h après l'injection de LPS, En effet, l'inflammation, en hyper-signal (blanc) par rapport au striatum controlatéral sur l'image, et une nécrose en hyposignal (noir) apparaissent toutes deux dans le striatum situé à la gauche de l'image (cf. Figure 43.a). La nécrose, ressort sur la cartographies de  $|G^*|$  (cf. Figure 43.b). Une zone avec un  $|G^*|$  particulièrement bas dans la zone LPS a été indiquée par une flèche rouge.

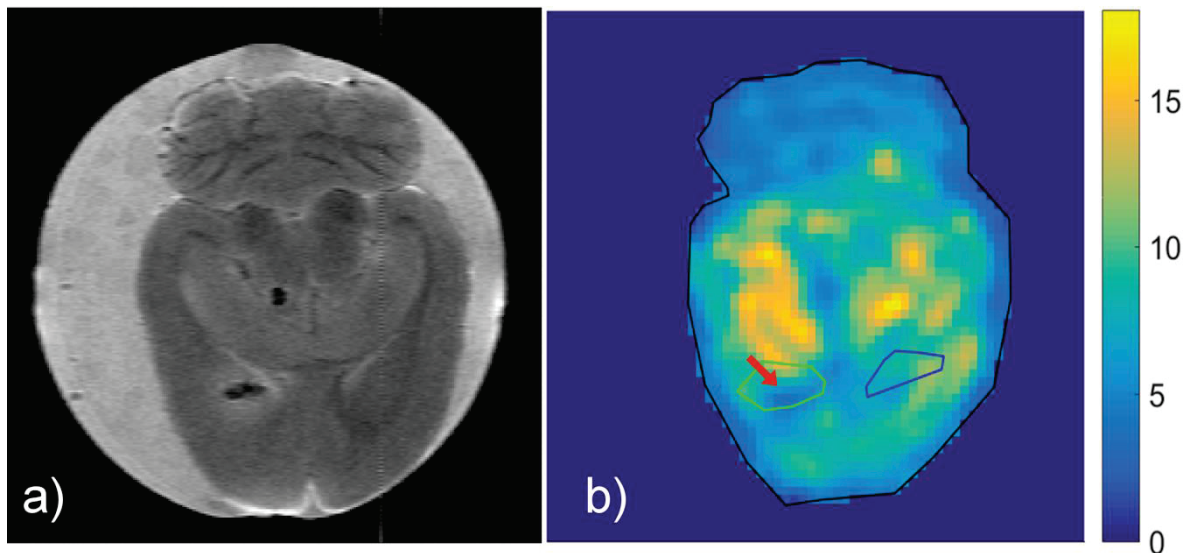


Figure 43 : Image anatomique d'un cerveau *ex vivo* ayant reçu une injection de LPS (striatum du côté gauche de l'image) ; b) cartographie associée des valeurs du module de cisaillement  $|G^*|$  (en kPa) pour des acquisitions à 800. Sont représentées les ROIs du cerveau entier (en noir), de l'injection de LPS (en vert) et controlatérale (en bleu). Une flèche rouge indique l'emplacement d'une zone de faible  $|G^*|$  sur l'image b.

La baisse de  $|G^*|$  attendue est bien constatée à toutes les fréquences (cf. Figure 44).

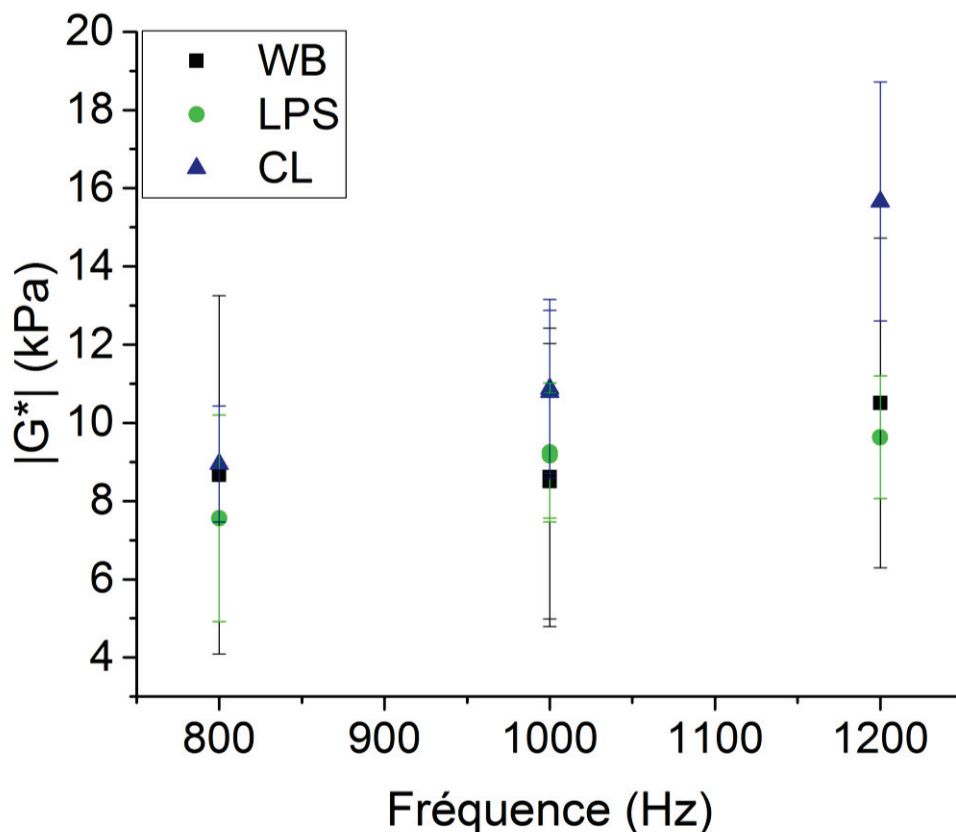


Figure 44 : Graphe représentant le module de cisaillement  $|G^*|$  en fonction de la fréquence d'excitation pour un rat injecté avec du LPS, dans le cerveau entier (WB), la zone injectée au LPS et visiblement affectée sur les images IRM anatomiques (LPS) et la ROI dessinée dans le striatum controlatéral, non injecté (CL).

L'ERM détecte la présence de nécrose (baisse de  $|G^*|$  dans le striatum injecté LPS).

### **Conclusion**

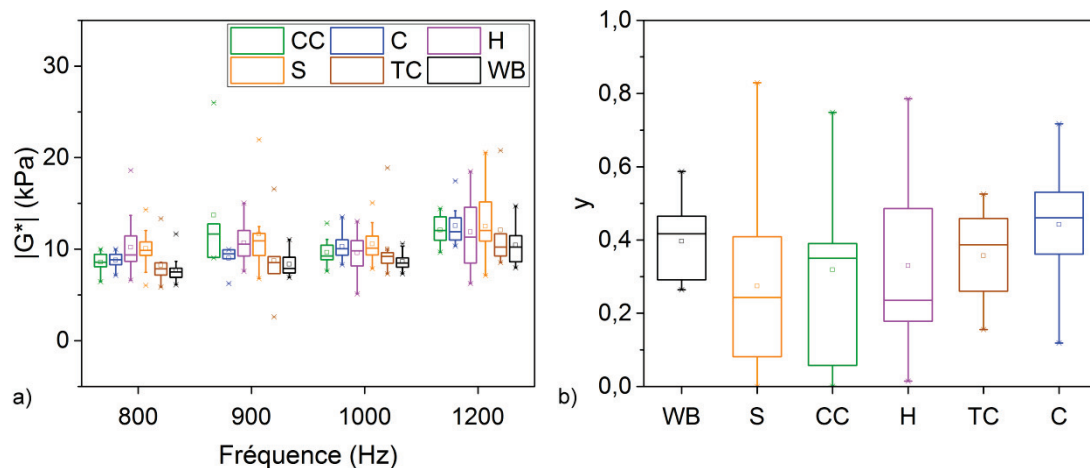
En conclusion, dans l'étude des cerveaux sains comme des cerveaux injectés au LPS, les résultats obtenus semblent conforter la possibilité de tirer des conclusions sur les propriétés mécaniques du cerveau, mais des difficultés d'interprétation sont apparues pour un rat sain, liées en partie à un mauvais centrage de l'aiguille dans l'échantillon. Cette observation explique partiellement la variabilité importante dans les résultats présentés dans les parties 3.1 et 3.2, qui avait rendu l'interprétation des données plus difficile.

#### **3.3.2.3. Adéquation des données régionales avec la littérature**

Une dernière vérification de la qualité de l'ensemble de la méthodologie, de la préparation des échantillons biologiques à la reconstruction a été effectuée. Nous avons évalué l'adéquation des données obtenues avec la littérature. Pour cette partie, l'ensemble des rats imagés (sains, LPS et  $\alpha$ -Syn) ont été utilisés.

Les valeurs de  $|G^*|$  et de  $y$  calculées dans différentes zones du cerveau (corps calleux, cortex, région de l'hippocampe, striatum, tronc cérébral et cerveau entier) ont été comparées (cf. Figure 45).

En ce qui concerne  $|G^*|$ , les comportements entre les différentes zones anatomiques analysées semblent maintenues, quelle que soit la fréquence. De manière générale, le tronc cérébral apparaît aussi rigide que le cerveau entier et est la zone où  $|G^*|$  est le plus faible. L'hippocampe et le striatum sont les zones les plus rigides du cerveau et le corps calleux et le cortex auraient des rigidités intermédiaires. Ces résultats sont en accord avec les travaux *ex vivo* de Boulet et al. menés à des fréquences d'excitation comprises entre 370 et 435 Hz, où l'hippocampe avait été trouvé plus rigide que le cortex (Boulet, Kelso, and Othman 2011), et une étude *in vivo* chez la souris transgénique où l'hippocampe apparaissait plus rigide que le cortex (Munder et al. 2018). De façon générale, les régions contenant peu de fibres sont généralement considérées comme les moins rigides (Diguët et al. 2009), ce qui est en accord avec le fait que le tronc cérébral soit la région la moins rigide de notre étude. En revanche, des études indiquaient le corps calleux, une région riche en fibres neuronales, comme la région la plus rigide du cerveau



**Figure 45 : a) Module de cisaillement  $|G^*|$  en fonction de la fréquence d'excitation et b) exposant de la loi puissance  $y$  pour différentes zones du cerveau : CC : corps calleux ; C : cortex ; H : région de l'hippocampe ; S : striatum ; TC : tronc cérébral ; WB : cerveau entier. 11 rats au total ont été utilisés, les ROIs n'ont été dessinées pour certains rats que sur certaines zones, on a donc 11, 21, 8, 21, 10 et 8 ROIs exploitées respectivement pour WB, S, CC, H, TC et C (pour H et S, deux ROIs par rat peuvent être dessinées).**

chez le rongeur (Schregel et al. 2012) et chez l'humain (Arani et al. 2015), contrairement à ce que nous observons ici. Toutefois, deux études chez la souris ont trouvé que le corps calleux était moins rigide que le cerveau entier et l'hippocampe (Majumdar et al. 2017; Gergely Bertalan et al. 2019). La reconstruction dans cette zone où les fibres neuronales sont très orientées pourrait être assujettie à l'orientation des ondes propagées et des gradients d'encodage du mouvement. De plus, le corps calleux, dans sa partie la plus frontale, est relativement proche du bord de l'échantillon (et donc exposé à des erreurs de reconstruction dues à des réflexions d'onde). C'est une structure de faible épaisseur, la reconstruction de ses propriétés mécaniques est donc plus affectée que les autres par le bruit. Il est difficile de conclure quant à la vraisemblance de nos données dans cette région.

Le paramètre  $y$  est caractérisé par une dispersion importante de ses valeurs, il est donc difficile de comparer les tendances des différentes régions anatomiques du cerveau. Dans l'ensemble, le striatum, avec une moyenne de 0.26 semble être la zone la moins dispersive du cerveau, les autres régions ayant des moyennes de  $y$  supérieures à 0.30. Dans la littérature, peu d'études ont trouvé des différences entre ces différentes régions pour les paramètres caractérisant la dispersion, exposants de la loi puissance ou angle de phase. Une étude de l'angle de phase n'indiquait pas de différence significative entre des régions à la structuration très différentes : le cerveau et le cervelet (Millward et al. 2015), ce qui conforte la proximité des valeurs mesurées pour  $y$  quelles que soient les régions.

De façon générale, les rigidités relatives entre les différentes régions sont cohérentes avec la littérature. Les valeurs de  $\gamma$  n'ont pas été beaucoup étudiées dans la littérature mais le rapport entre le striatum et le cerveau entier est cohérent pour les rats sains et les rats ayant reçu des injections (LPS et  $\alpha$ -Syn), les résultats similaires pour tous ces groupes montrant une certaine cohérence, nous estimons que le striatum est en effet moins dispersif que le cerveau dans son ensemble.

Les rigidités relatives des différentes régions du cerveau sont globalement en accord avec la littérature, le paramètre  $\gamma$  varie peu en fonction des régions explorées

## 3.4. Perspectives

### 3.4.1. Améliorations des conditions d'acquisition

Au cours de ce chapitre, nous avons pu mettre en lumière des difficultés lors de la mise en place de l'imagerie ERM du cerveau *ex vivo*. Nous proposons ici des pistes d'améliorations qui devraient permettre d'accroître la qualité des données acquises et permettre d'évaluer de façon plus robuste les paramètres viscoélastiques dans le cerveau de rongeur.

Tout d'abord, nos acquisitions ont souffert d'un manque de reproductibilité lors de la mise en place du banc, qui décalait probablement la résonance du banc et devait rendre le réglage des amplitudes d'entrée du piézoélectrique nécessaire à chaque installation du banc. Lors d'acquisitions *ex vivo*, il est préférable de garder un temps d'acquisition constant et relativement court (inférieur à 2 heures), les propriétés mécaniques du cerveau évoluant avec le temps (Vappou et al. 2008; Bilston 2011), il serait donc préférable de construire un nouveau banc d'élastographie en augmentant le nombre d'éléments fixes (c'est-à-dire diminuer le nombre d'éléments dont la position est ajustée grâce à des systèmes de vis) et qui favoriserait un placement et une contrainte reproductible pour l'excitateur mécanique.

Nous avons aussi tracé des ROIs contenant peu de pixels, les zones de fluorescence étant très petites (4 voxels au minimum). Pour la comparaison des différentes zones anatomiques du cerveau, le manque de résolution des images ERM s'est aussi révélé problématique pour délimiter des zones comme le corps calleux, dont la largeur couvrait seulement 1 ou 2 voxels. Cela a conduit à une imprécision sur le placement des ROIs et une variabilité des mesures



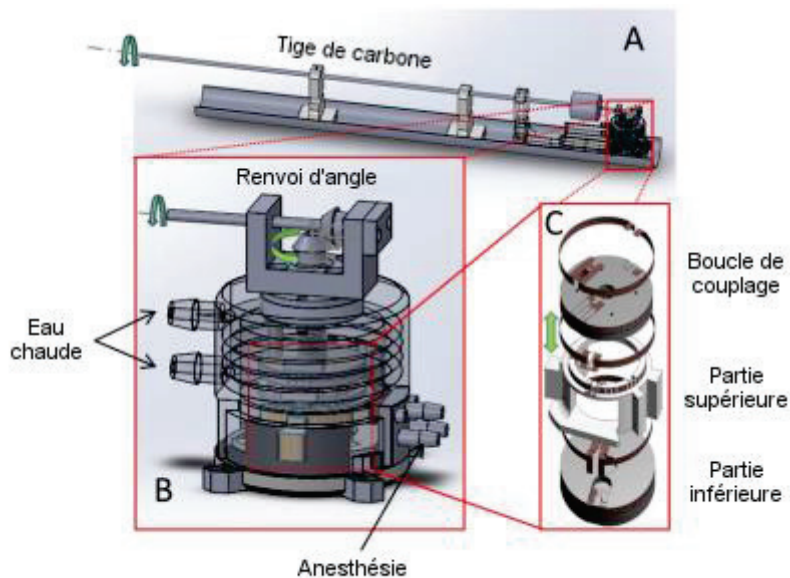
augmentée par rapport aux mesures faites dans le cerveau entier. Un nouveau banc devrait permettre d'améliorer la résolution spatiale des images ERM tout en conservant un RSB élevé.

Le développement d'un banc en plastronique<sup>9</sup>, basé sur le principe d'une antenne Helmholtz et intégrant les contraintes liées à l'élastographie devrait permettre de résoudre ces problèmes de sensibilité et de résolution spatiale. Un banc d'imagerie IRM, développé au sein du laboratoire CREATIS, et permettant facilement l'ajout d'une excitation mécanique est présenté sur la Figure 46. L'ajout d'une fonction mécanique à ce dispositif permettrait l'acquisition de données ERM (Lambert et al. 2019). À la manière du dispositif utilisé au cours de cette thèse, ce dispositif est composé d'une antenne Helmholtz verticale, dans laquelle un échantillon circulaire peut être placé. Sous l'antenne, l'espace nécessaire à la transmission de l'excitation mécanique est disponible, et une ouverture destinée à laisser le passage à une aiguille est déjà installée. Il suffirait d'ajouter un système de transmission et un emplacement permettant le positionnement reproductible du piézoélectrique pour pouvoir réaliser des expériences d'ERM. Une optimisation des différents éléments mécaniques (longueur et largeur de la languette supportant l'aiguille, longueur et matériau de la tige de transmission, contrainte appliquée au piézoélectrique...) pourrait aussi être imaginée, fondée sur des simulations mécaniques.

Une meilleure fixation de l'échantillon et de son support au banc pourrait aussi éviter le mouvement du porte-échantillon et une propagation indésirable des ondes depuis le bord de l'échantillon, que nous avons observé dans plusieurs cas. Ce dispositif est aussi équipé d'une arrivée d'eau et d'une arrivée de gaz, qui permettent l'accueil d'échantillons contenant des cellules vivantes. En effet, les cellules ont besoin d'un environnement à 37°C et d'un apport de CO<sub>2</sub> pour pouvoir survivre tout le temps de l'imagerie. Une ouverture peut aussi être aménagée dans l'antenne et le porte-échantillon. Cette ouverture offre donc la possibilité de réaliser des acquisitions *in vivo* sur cerveau de souris, l'arrivée de gaz servirait dans ce cas à transporter le gaz d'anesthésie.

---

<sup>9</sup> La plastronique est une discipline à la frontière entre la plasturgie et l'électronique. Elle vise à « à intégrer des fonctions électroniques sur des formes plastiques moulées tridimensionnelles » selon une définition couramment admise



**Figure 46 :** A) Schéma d'un banc d'élastographie permettant l'imagerie de petits échantillons et l'imagerie de la tête de souris in vivo. B) Zoom sur la partie antenne/porte-échantillon, sur laquelle on peut visualiser le dispositif de réglage de la hauteur du coupleur, fonctionnant grâce à un renvoi d'angle, ainsi que les arrivées de gaz et le dispositif de chauffage. C) Détail des boucles constituant l'antenne et le porte échantillon. (Lambert et al. 2019)

Une image RARE pondérée T2 de tomate cerise est présentée Figure 47. Elle a été acquise avec ce banc et les paramètres d'acquisition suivants :

- Matrice d'acquisition : 128 x 128
- Épaisseur de coupe : 0.4 mm
- Champ de vue : 25.6 x 25.6 mm<sup>2</sup>
- TE/TR : 30/8000 ms
- Nombre de moyennes : 4
- Temps d'acquisition : 8 min.



**Figure 47 :** Image RARE T2 d'une tomate cerise obtenue avec le banc présenté Figure 46.

C'est-à-dire avec une taille de voxel plus de deux fois inférieure à celle que nous avons utilisée lors de nos acquisitions (faites sans moyennage) pour un champ de vue équivalent. Le RSB de l'image apparaît important sur cette image (> 50). Bien qu'il soit difficile de comparer cette acquisition à celles que nous avons faites sur d'autres échantillons, ce dispositif apparaît comme prometteur pour améliorer la résolution des images.

Une augmentation de la résolution spatiale entraîne toutefois souvent un allongement du temps d'acquisition. Des stratégies d'acquisitions différentes sont donc à envisager pour pouvoir maintenir un temps d'acquisition relativement court (acquisition totale pour l'ERM multifréquence de moins de 2h). Une première solution pour gagner du temps serait la mise en

place de séquences d'ERM plus courtes ou permettant d'acquérir les trois directions de l'espace de façon simultanée (Kearney et al. 2017). Une autre méthode consisterait à mettre en place une excitation mécanique continue, permettant de diminuer le TR des acquisitions. Cela pose des problèmes de refroidissement du piézoélectrique, abordés dans l'Annexe 2.

### 3.4.2. Améliorations de la méthode de reconstruction

Le calcul du paramètre  $y$  implique une acquisition multifréquence des données, et un ajustement de la vitesse  $c$  en fonction de la fréquence d'excitation mécanique selon une loi puissance. Dans ce chapitre, nous avons choisi de faire un ajustement de la partie réelle du nombre d'onde  $k_r$  pour calculer  $z$  puis d'utiliser la relation entre les exposants des lois puissances de  $k_r$  ( $z$ ) et de  $c$  pour déduire  $y$  (méthode 1). Lors d'analyses sur échantillons, nous nous sommes aperçu que les deux méthodes pour obtenir  $y$  étaient équivalentes, et avons choisi de fonder l'ajustement sur les valeurs de la vitesse (méthode 2), qui est plus facile à appréhender<sup>10</sup>. En ce qui concerne les rats, un ajustement basé sur  $k_r$  ou un ajustement basé sur  $c$  ne conduisent malheureusement pas aux mêmes résultats (cf. Figure 48). Pour l'ajustement linéaire à partir des valeurs logarithmiques des vitesses ou nombres d'onde réels en fonction de la fréquence, la carte des coefficients de détermination  $R^2$  était plus proche de 1 pour les exposants selon la méthode 1 sur l'ensemble des voxels, ce qui nous a conduits à utiliser  $k_r$  dans l'ajustement selon la loi puissance.

---

<sup>10</sup>  $y$  augmente avec le niveau de complexité du milieu, alors que  $z$  diminue.

Le fait que les deux ajustements ne conduisent pas au même résultat pour les rats, ainsi que le

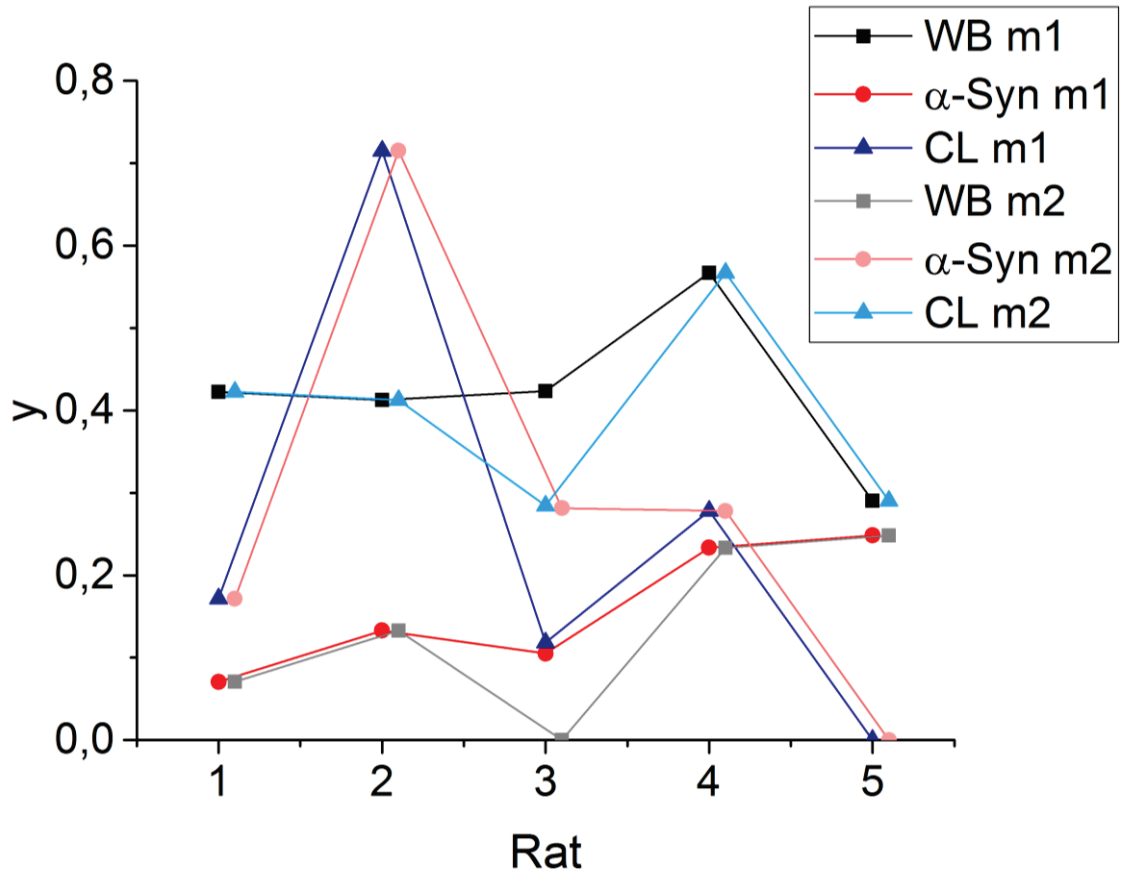


Figure 48 : Exposant de la loi puissance  $y$  calculé à partir d'un ajustement sur la variable  $k_r$  (noté m1) et à partir d'un ajustement sur la variable  $c$  dans trois régions d'intérêt (noté m2) : le cerveau entier (WB), la zone de l'injection de fibrilles ( $\alpha$ -Syn) et la zone d'injection controlatérale (CL) pour 5 rats numérotés sur le graphe de façon arbitraire.

fait que nous ayons dû supprimer certaines données des ajustements pour qu'ils convergent, montre que ces ajustements ne sont pas assez robustes au bruit. Ce manque de robustesse est lié au faible nombre de fréquences investiguées (Clauset, Shalizi, and Newman 2009). Des séquences permettant une acquisition multifréquence simultanée dans les trois directions de l'espace, en écho de gradient rapide, ont été développées (Garteiser et al. 2013) et pourraient être adaptées à un système préclinique. Une autre façon d'améliorer la robustesse des ajustements serait de réduire la variabilité des données en acquérant des images moins bruitées. Cela faciliterait aussi l'analyse des paramètres mono-fréquentiels comme  $G'$ ,  $G''$  ou  $\phi$ . Comme nous l'avons discuté dans le paragraphe précédent, l'amélioration de la qualité des données passe tout d'abord par l'amélioration du dispositif expérimental, mais aussi par une inversion plus robuste au bruit. De nombreux algorithmes, comme les inversions ayant recours aux éléments finis (M. Honarvar et al. 2015; Barnhill et al. 2017) ou prenant en compte la porosité du milieu (McGarry et al. 2015; Perriñez et al. 2010), modélisant donc mieux les échanges de

liquide entre les vaisseaux sanguins, la matrice extracellulaire et les cellules ont été développés et semblent prometteurs. Ces algorithmes pourraient se révéler plus efficaces que l'inversion directe dans le cas du cerveau de rat, car l'inversion directe ne détecte pas de façon optimale les interfaces, surtout en présence de bruit (Manduca et al. 2001), et le cerveau est un organe compartimenté dont les différentes régions anatomiques présentent des propriétés mécaniques différentes (Guo et al. 2013). Plus simplement, un filtrage différentiel en fonction de la fréquence d'excitation ou des pondérations des différentes directions acquises en fonction de l'amplitude de l'onde ou du SNR pourraient être envisagés. Ces derniers points sont abordés en Annexe 5, dans laquelle une étude complémentaire sur le lien entre la taille des voxels et la longueur d'onde est présentée.

### 3.4.3. Amélioration du modèle & acquisitions *in vivo*

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les injections, de par leur volume important, avaient pu modifier les paramètres viscoélastiques ( $G'$  et  $G''$ ) du striatum de rat. Diminuer le volume des injections à 5  $\mu\text{L}$  pourrait permettre de vérifier cette hypothèse, et de s'affranchir de tout effet de l'injection sur  $G'$  et  $G''$ . Afin de supprimer certains points chauds des acquisitions, il pourrait également être intéressant de perfuser les cerveaux de rat avec une solution tampon. Cette technique expulserait le sang du cerveau et empêcherait sa coagulation dans les tissus, et donc, si l'hypothèse formulée sur la présence de sang coagulé dans les tissus dans la section 3.3.2.1 est vraie, éviterait la formation de points chauds sur les élastogrammes. Une perfusion plus sophistiquée pourrait par ailleurs maintenir les propriétés du cerveau tout au long de l'acquisition ERM (Vrselja et al. 2019). Les paramètres de structure  $\gamma$  et  $\varphi$  n'ayant cependant pas été affectés par l'injection d'une quantité importante de fibrilles dans nos travaux, il serait possible qu'une diminution significative du bruit et l'apport de la perfusion ne suffisent pas à détecter les fibrilles dans le cerveau de rongeur. Si l'effet des fibrilles concentrées en une zone n'a pas pu être retrouvé dans notre modèle de rat, il pourrait éventuellement être décelé chez des souris transgéniques, dont les fibrilles se développent de façon diffuse sur une plus grande étendue. L'aspect quasi-fractal des fibrilles serait toujours susceptible d'affecter la propagation de l'onde. De plus, la taille des régions d'intérêt serait augmentée, ce qui diminuerait l'influence du bruit.

Même en étudiant des modèles de souris ne développant pas de plaques amyloïdes extracellulaires, TgAPP (Sw, V717F par exemple), il serait toutefois impossible de s'affranchir des nombreux phénomènes physiopathologiques accompagnant le développement de la maladie

d'Alzheimer chez ces souris. Une étude combinant plusieurs types de souris transgéniques, dont les caractéristiques varieraient pourrait être envisagée, permettant d'identifier, au moins partiellement, les effets des fibrilles seules. Une telle étude néanmoins serait longue, coûteuse et difficile à mettre en place. De plus, les cerveaux de souris étant petits, une résolution supérieure à celle nécessaire pour les cerveaux de rats, et la mise en place d'une méthode d'imagerie *in vivo* s'avéreraient nécessaires.

L'étude d'animaux transgéniques développant des pathologies Tau ou  $\alpha$ -Syn intracellulaires (Mougenot et al. 2012) seraient aussi un apport intéressant, si l'on considère que les fibrilles pourraient modifier les propriétés viscoélastiques des cellules (Majumdar et al. 2017). La rigidification d'un faible nombre de cellules réparties dans le cerveau pourrait affecter  $\gamma$  avant qu'elles soient assez nombreuses pour que  $G'$  soit modifié.

En complétant cette étude sur rongeurs par une étude de fantômes issus de la bio-ingénierie, qui constituent des matériaux se rapprochant de tissus simplifiés, et de bons intermédiaires entre le fantôme non dispersif d'agarose et le cerveau plus complexe des rongeurs, il serait probablement plus facile de séparer le rôle des fibrilles des autres constituants du cerveau et phénomènes physiopathologiques.

L'orientation du projet vers des expériences *in vivo* imposerait cependant de nouvelles contraintes sur le banc d'ERM (présentées en Annexe 7, de pair avec les développements de banc *in vivo* effectués pendant la thèse). De plus, une étude bibliographique approfondie des mécanismes biologiques propres aux lignées de souris étudiées sera nécessaire pour comprendre les observations effectuées.

## Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté des expériences menées sur les cerveaux de rats *ex vivo*. Dans un premier temps, nous avons vu que l'injection d'un volume important de liquide dans le striatum, reçue *in vivo* par ces rats, même après plusieurs semaines de récupération et des images anatomiques ne présentant pas de lésion, provoquait une baisse des modules de perte  $G''$  et de conservation  $G'$ . En revanche, la présence de fibrilles dans un hémisphère ne semble pas provoquer d'effet sur l'exposant  $\gamma$  de la loi de puissance. Dans un second temps, nous avons évalué la qualité des données acquises et reconstruites en ajoutant à notre analyse des données ERM de rats sains et de rats injectés avec une toxine neurotoxique, qui ont été comparées entre elles et confrontées à la littérature. Une cohérence des données est apparue, validant le principe

des expériences ERM menées sur les cerveaux de rats, mais nous avons aussi pu identifier des limitations dans notre étude, qui ont mené à une variabilité importante des résultats et à des difficultés dans l'analyse. Dans une dernière partie, nous avons proposé des pistes d'amélioration méthodologiques qui devraient permettre de compléter ces premiers résultats par des données de meilleure qualité. En particulier, le design d'un nouveau banc d'ERM, déjà entamé au sein du laboratoire CREATIS, des travaux sur l'acquisition et la reconstruction des données et des modifications du modèle murin sont à envisager.





# Conclusion générale

Le diagnostic précoce des démences repose sur la possibilité de détecter, plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes cliniques, des changements pathologiques dans le tissu cérébral. Les agrégats fibrillaires, des protéines mépliées, agrégées et possédant une architecture microscopique caractéristique, sont des structures se développant durant ce stade précoce des démences. Au cours de cette thèse, nous avons exploré le potentiel de l'ERM multi-fréquentielle pour la détection des fibrilles. Cette méthode d'imagerie repose sur la mesure du mouvement des tissus par IRM, pendant la propagation d'une onde dans ces mêmes tissus. Les ondes de cisaillement, moins rapides que les ondes transversales, sont celles qui sont exploitées pour la mesure. L'étude des propriétés de l'onde donne accès aux caractéristiques mécaniques du milieu. Le suivi en fréquence des paramètres ERM permet quant à lui d'appréhender ses propriétés dispersives, et donc potentiellement des informations sur la microarchitecture des tissus. Les travaux de thèse présentés visaient à évaluer l'ERM pour déterminer la présence des fibrilles grâce à leurs propriétés dispersives. Plusieurs études menées chez l'humain et la souris n'avaient pu conclure sur l'influence des fibrilles sur les propriétés viscoélastiques du cerveau. Afin de s'affranchir des nombreux phénomènes physiopathologiques accompagnant la présence des fibrilles au cours des démences, et de se concentrer sur l'identification d'un signal propre aux fibrilles, les études ERM ont été menées sur deux modèles simples : des fantômes dans lesquels les fibrilles étaient le seul élément susceptible d'affecter la dispersion et des cerveaux de rat *ex vivo*, dans lesquels des fibrilles étaient présentes, mais où la mort neuronale, l'inflammation, la démyélination et la circulation sanguine étaient absentes.

Dans le chapitre 2, deux types de fibrilles différents,  $A\beta$  et  $\alpha$ -Syn, ont été intégrés à des inclusions dans des échantillons peu dispersifs d'agarose. Une protéine non agrégée, la BSA, a servi d'inclusion contrôle dans chaque échantillon. Ces échantillons ont été imagés en ERM sur une large gamme de fréquences (400-1200 Hz). Des régions d'intérêt ont été définies à partir de cartographies T2 et de la fluorescence émise dans la région contenant les fibrilles. Dans ces régions et celles du contrôle, les paramètres viscoélastiques (module de conservation  $G'$ , module de perte  $G''$ , nombre d'onde  $k_f$  et vitesse  $c$ ) ont été calculés. Les paramètres de structure (angle de perte  $\varphi$  et exposant de la loi puissance  $y$ ) ont été évalués à partir de ces mesures. Une différence non significative entre les inclusions contenant les fibrilles et la BSA a été observée pour  $G'$  et pour  $G''$ . Notre hypothèse pour expliquer ce résultat est une perturbation de la

réticulation de l'agarose par la présence des fibrilles, et non une modification de la rigidité et de la viscosité propre aux fibrilles. Le paramètre multifréquence  $y$  a lui révélé une différence significative de dispersion entre les deux groupes de fibrilles et la protéine non agrégée, l'ajout de fibrilles dans le milieu augmentant la valeur de  $y$ . L'augmentation non significative de  $\varphi$ , calculé à partir d'acquisitions mono-fréquence, en présence de fibrilles tend à confirmer l'existence d'un lien entre  $\varphi$  et  $y$ . Cependant, des limitations à l'étude de  $\varphi$  (dépendance en fréquence, influence du bruit) ne permettent pas de détecter des différences significatives entre les agrégats fibrillaires et la BSA. Des cartographies du paramètre  $y$  ont été mises en place. Moins précises car plus sensibles au bruit que les données moyennées dans les ROIs, elles ne sont pas adaptées à une analyse statistique mais permettent de visualiser la présence des fibrilles dans les échantillons. L'effet des fibrilles sur le paramètre multifréquence  $y$  ayant été établi par ERM dans ces fantômes, nous nous sommes intéressés dans le chapitre suivant à vérifier que cet effet persistait dans un modèle plus complexe.

Dans le chapitre 3, des cerveaux de rats injectés dans le striatum avec une solution d' $\alpha$ -Syn, et dans le striatum controlatéral avec une solution tampon ont été imagés *ex vivo*. Dans ce modèle, les fibrilles n'induisent pas de mort neuronale et l'inflammation de l'injection est résorbée avant le sacrifice. Nous pensions donc observer seulement l'effet de la présence de l' $\alpha$ -Syn dans le cerveau qui est aussi un milieu dispersif plus complexe que les fantômes d'agarose préalablement mentionnés. L'analyse de  $G'$  et de  $G''$  a cependant montré que l'injection de fibrilles conduisait à une diminution de ces deux paramètres dans le striatum. Cette différence est plus marquée que celle observée dans le cas des fantômes. De plus, la variation de  $G''$  à la baisse en présence de fibrilles est contraire à celle observée précédemment, il n'est donc pas certain que ces variations soient liées à la présence des fibrilles seulement. Le paramètre de structure  $y$  n'a quant à lui révélé aucune différence de dispersion dans le striatum contenant ou non des fibrilles. L'absence de mise en évidence du signal des fibrilles bien identifié dans les fantômes pourrait être liée aux structures quasi-fractales du cerveau (axones, fibres de soutien de la matrice extracellulaire, vaisseaux sanguins...). Par ailleurs,  $y$  dans le cerveau entier apparaît plus élevé que dans le striatum, ce qui a été confirmé par l'étude de rats sains et constitue une nouvelle information sur les propriétés dispersives du cerveau sain de rat par rapport à la littérature. Le paramètre  $\varphi$  n'a pour sa part révélé aucune différence entre les régions comparées, pâtissant d'un étalement important des données. Les cartographies  $y$  n'ont pas semblé pertinentes dans cette étude, souffrant du nombre limité des fréquences imagées, de leur faible gamme, et de sa sensibilité au bruit.

Nous avons aussi retrouvé certains résultats de la littérature concernant la rigidité relative des différentes aires anatomiques du cerveau (hippocampe plus rigide que le cortex, et tronc cérébral, pauvre en fibres neuronales, moins rigide que le cortex, l'hippocampe, le corps calleux et le striatum).

De façon générale, plusieurs limitations ont été identifiées, concernant la propagation des ondes dans les échantillons ou le traitement des images obtenues. Des améliorations de la méthodologie, une modification du modèle étudié, l'étude d'échantillons de complexité intermédiaire entre l'agarose et les cerveaux *ex vivo*, contenant des cellules ou des fibres extracellulaires par exemple sont suggérées pour pousser plus loin l'analyse.

Les résultats obtenus, démontrant l'incidence de la présence de fibrilles sur le paramètre de structure de l'ERM multifréquence  $\gamma$  dans un fantôme non visqueux, mériteraient en effet d'être poursuivi pour comprendre dans quelles conditions les fibrilles seraient détectables en préclinique ou en clinique. Il serait en particulier intéressant de voir si les fibrilles qui se développent à l'intérieur des cellules auraient un impact accru sur  $\gamma$  car elles modifieraient aussi les propriétés des cellules les abritant.

Au-delà de l'analyse de l'effet des fibrilles sur les propriétés mécaniques des tissus présentée dans cette thèse, ce travail aura permis la mise en place de bancs d'imagerie ERM pour des petits échantillons et le cerveau de rongeurs, *ex* et *in vivo*. Ces bancs se voulaient faciles à utiliser et à modifier (utilisation d'imprimantes 3D). De nombreuses « fausses pistes » ont été suivies au cours de ce développement, permettant d'acquérir une expérience et d'avoir plus de recul quant aux exigences expérimentales de la propagation d'onde dans plusieurs types d'échantillons et dans des tissus *ex vivo*. Une fois perfectionnés, ces bancs pourraient faciliter la mise en place de l'ERM pour des études *in vitro* et précliniques dans d'autres plateformes d'IRM. D'un point de vue personnel, ce travail m'aura permis d'acquérir des connaissances variées, allant des bases du dessin industriel, pour le développement des bancs d'imagerie, à la reconstruction des données ERM.

L'ERM est une méthode d'imagerie relativement récente, dont le potentiel à détecter de nombreuses pathologies continue aujourd'hui à être évalué. Dans le cas des démences, il a déjà été démontré que l'ERM pouvait apporter des informations sur les modifications de la structure du cerveau. Ces modifications de rigidité et de viscosité ont été associées à d'autres méthodes diagnostiques, comme l'IRM de diffusion, l'IRM fonctionnelle ou la TEP chez l'humain, et à des analyses histopathologiques chez le petit animal. L'ensemble de ces études pourrait amener

à une meilleure compréhension du lien entre les propriétés mécaniques et biologiques des tissus, et à terme, mieux évaluer l'impact des modifications des paramètres ERM sur la santé des patients. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte, nous avons en effet essayé de mesurer l'effet sur les propriétés mécaniques d'un phénomène biologique précis : la présence de fibrilles dans le cerveau. Au-delà de la recherche clinique et préclinique, l'ERM est une technique qui n'est pas standardisée. En clinique, le dispositif d'excitation mécanique et les fréquences d'imagerie commencent à s'harmoniser. Cependant, de nombreuses publications concernant les séquences d'imagerie et les algorithmes de reconstruction laissent à penser que des améliorations dans ce domaine sont encore à réaliser avant que cette méthode d'imagerie puisse être utilisée en routine clinique. De plus, l'ERM cérébrale n'est pas invasive, mais elle provoque tout de même la vibration de la tête du patient, ce qui ajoute à son inconfort pendant la session d'imagerie. Il faudrait donc que l'ERM présente une réelle plus-value diagnostique pour pouvoir se démocratiser dans le cadre des démences, par exemple, si l'ERM s'avérait capable de détecter la présence de fibrilles dans le cerveau humain.

# Annexes

## Annexe 1 : Procédure d'agrégation des fibrilles

Ce protocole de fabrication est valable pour les fibrilles utilisées dans la préparation des fantômes (Chapitre 2) et des injections intra-cérébrales (Chapitre 3).

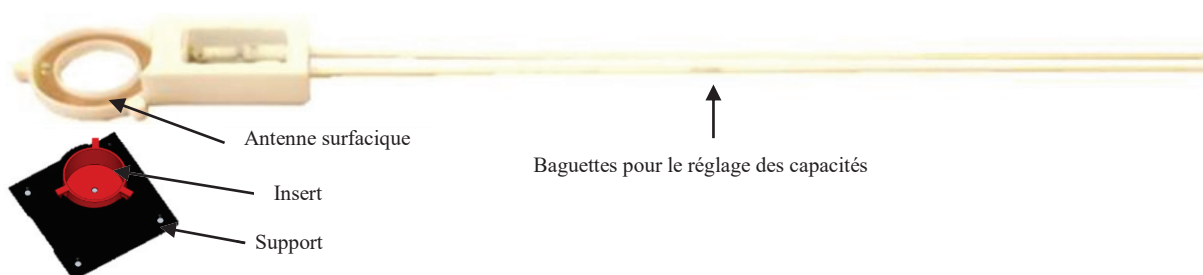
Les protéines recombinantes humaines A $\beta$  et  $\alpha$ -Syn (lots de 0.5 mg ou 1 mg, rPeptide) ont été reconstituées selon les indications du fournisseur, à une concentration de 200 $\mu$ M. L'agrégation de chaque lot a été réalisée en eppendorf (Low Binding Polymer Technology, Sorenson BioScience), à 37°C, avec légère agitation (Thermo-Shaker, Grant-Bio) pendant 2 à 7 jours. Chaque jour, une sonication de 1 minute a été réalisée en bain à ultrasons (Branson 1800), pour fragmenter les fibrilles déjà formées et accélérer le recrutement des monomères. La formation de fibrilles a été constatée visuellement (turbidité de la solution), par spectrométrie de fluorescence (en présence de thioflavine T), et par microscopie électronique (après marquage à l'acétate d'uranyle). Les aliquotes de fibrilles ont été conservés à -80°C.

## Annexe 2 : Mise en place du banc d'élastographie *ex vivo*

### Mise en place du banc ERM petit échantillon

Au cours de ce travail, deux dispositifs ERM pour de petits échantillons ont été mis en place. Dans les deux cas, nous voulions maximiser le signal, donc avoir une bobine adaptée à la taille des échantillons. Une amplitude des ondes suffisante pour la reconstruction sur une large gamme de fréquences, homogène dans tout l'échantillon était aussi nécessaire.

Un premier dispositif dédié aux échantillons a été développé (cf. Figure A 1). Il était constitué d'une bobine de surface circulaire, disposée autour du support de l'échantillon, contenant un insert. La membrane constituant la partie inférieure de cet insert était percée par un cure-dent, fixé à une languette horizontale en plexiglas qui était reliée à un pot vibrant (Mini SmartShaker™ K2007E01) par une barre de transmission de 110 cm de long, permettant le placement du pot en dehors du champ magnétique de l'aimant de l'IRM.

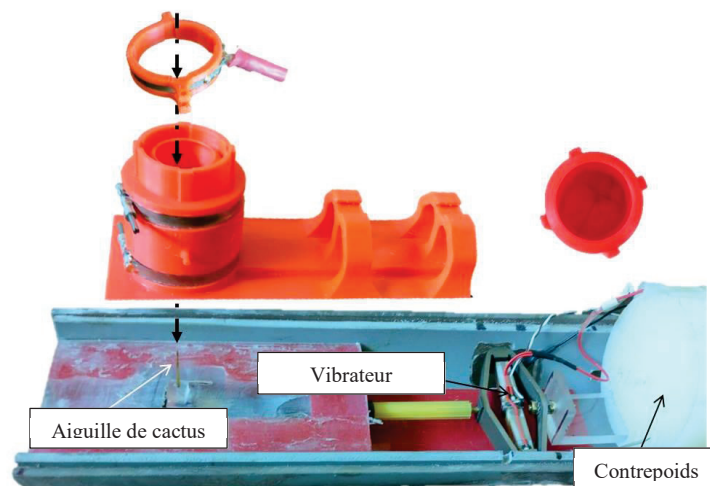


**Figure A 1 : Photographie de l'antenne surfacique avec son boîtier – Image de l'insert emboîté dans son support – Coupe axiale issue d'une acquisition FLASH 3D réalisée sur un échantillon de fibrine homogène maintenu dans un gel de paraffine**

La quantité de signal obtenue grâce à l'antenne de surface était satisfaisante (rapport signal à bruit (RSB) de 12 pour un voxel de  $90 \times 90 \times 600 \mu\text{m}^3$  pour une acquisition FLASH de 2 minutes, TR/TE = 15/6 ms). Cependant, l'antenne était difficile à mettre en place, le cure-dent abîmait les échantillons en les transperçant, les inserts étaient relativement coûteux et l'amplitude des ondes imagées en ERM insuffisante.

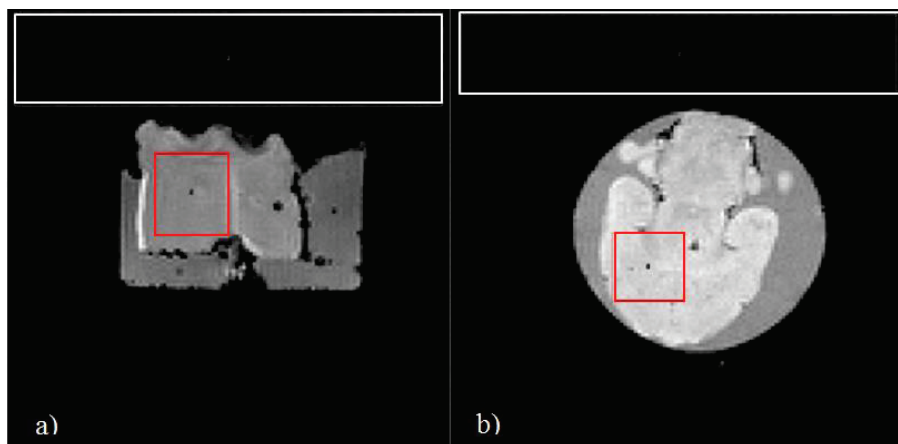


Un second dispositif, présenté dans le manuscrit (section 2.2.3.1, Figure A 2) a donc été mis en place. Une bobine volumique, verticale pour faciliter le positionnement, a été imaginée pour que le porte-échantillon s’y glisse et y soit maintenu. Le cure-dent a été remplacé par une aiguille de cactus, plus fine mais conservant un coefficient de frottement suffisant pour propager les ondes dans les échantillons d’agarose. Enfin, le pot vibrant a été remplacé par un vibreur piézoélectrique peu magnétique, placé à proximité de l’échantillon pour limiter les pertes d’amplitude de l’onde dans la tige excitatrice. Un contrepois vissé a été ajouté de façon à diriger toute l’amplitude des vibrations vers l’aiguille.



**Figure A 2 : Photographie des différents éléments du banc d'élastographie dédié aux petits échantillons.**

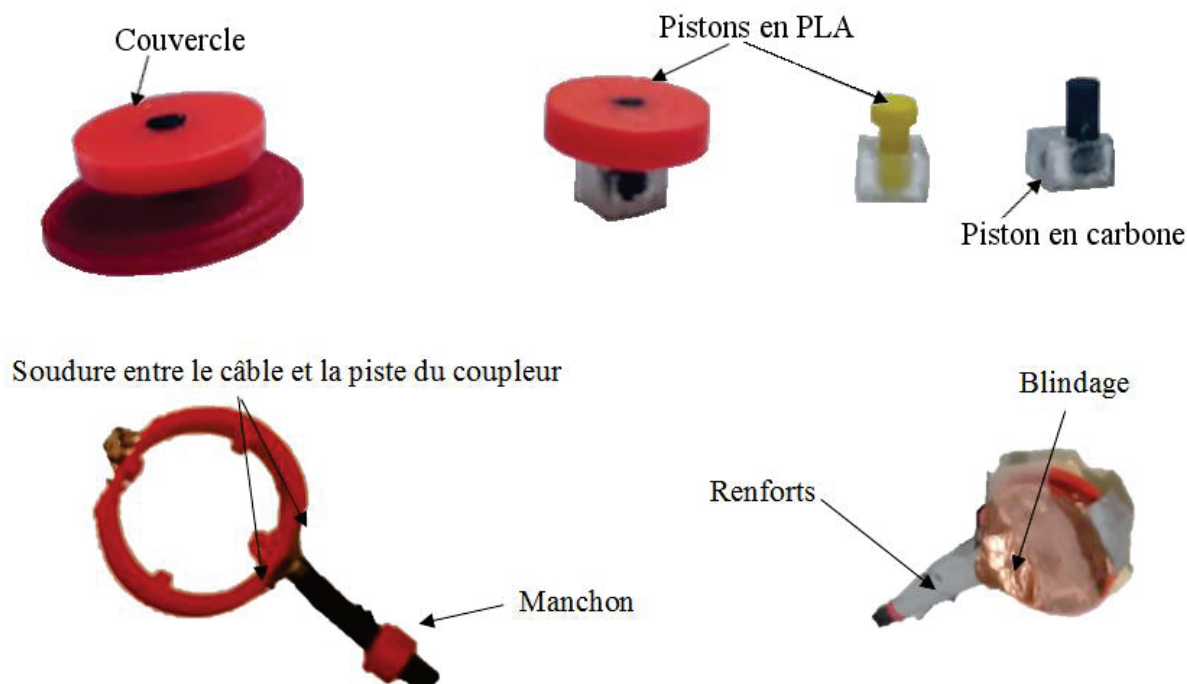
Avec ce banc, le RSB mesuré sur la coupe centrale d’une séquence 3D FLASH (TR/TE = 15/6 ms) avec un temps d’acquisition de 2 minutes pour un fantôme de fibrine est de 83 et de 64 pour un cerveau *ex vivo* avec une taille de voxel de  $312 \times 312 \times 625 \mu\text{m}^3$  (cf. Figure A 3).



**Figure A 3 : Coupe centrale d’une acquisition FLASH 3D, a) axiale pour un échantillon de fibrine entouré de gel de bougie ; b) coronale pour un cerveau de rat maintenu dans de l’agarose. Les rectangles blancs et rouges sont les ROIs utilisées pour le calcul du SNR**

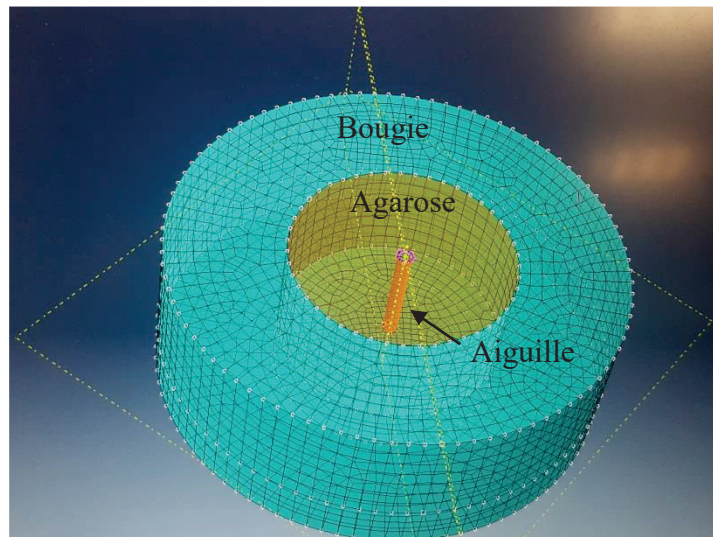
Par la suite, diverses améliorations ont été testées (cf. Figure A 4) :

- Le coupleur a été blindé et renforcé par un manchon pour faciliter la vibration.
- Afin d'empêcher le glissement de l'agarose le long de l'aiguille, différents moyens de blocage ont été testés, comme un « couvercle » posé au sommet de l'échantillon ou l'utilisation d'une fine couche de paraffine, qui a été l'option retenue
- De façon à augmenter l'amplitude des ondes, plusieurs types de pistons ont été essayés. Ces pistons propagent cependant les ondes avec un gradient d'amplitude suivant la hauteur du porte échantillon, nous avons donc conservé l'aiguille.
- Un flux d'air a été amené jusqu'au piézoélectrique, permettant de le refroidir pendant les acquisitions. Ce refroidissement a permis de diminuer les temps d'inaction du piézoélectrique pendant la séquence, divisant ainsi le temps d'imagerie par deux.



**Figure A 4 : Améliorations proposées pour l'amélioration du banc d'ERM.**

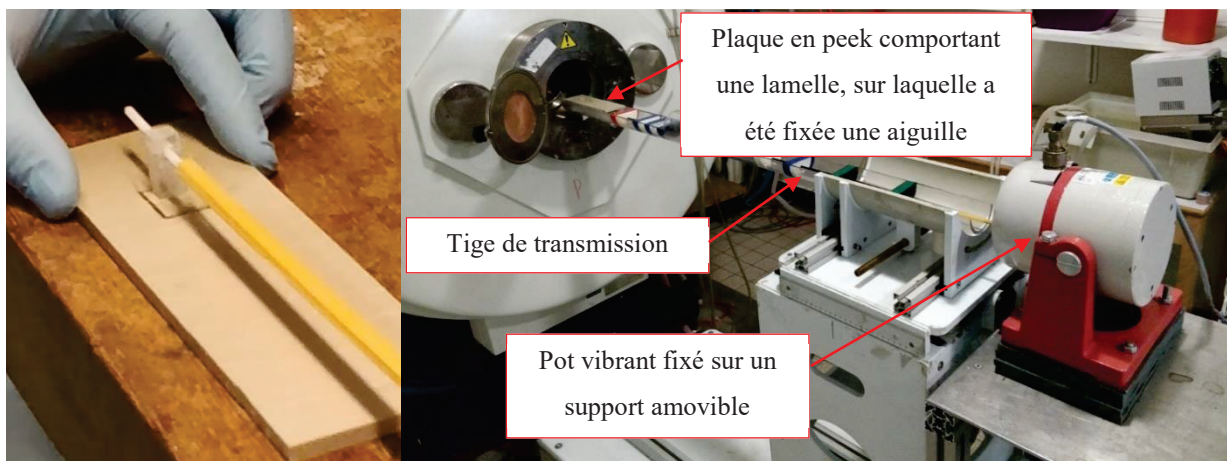
Dans le but d'optimiser l'amplitude des ondes, nous avons pensé faire des simulations mécaniques en variant la taille de certains éléments (longueur de la tige de transmission, taille de la languette sur laquelle est posée l'aiguille...). Nous avons donc commencé des simulations sur Abaqus 6.13 (Dassault Systèmes, 2013) grâce à une invitation à travailler au LAMCOS et sur COMSOL (cf. Figure A 5). Ces simulations, chronophages, ont cependant été abandonnées. Elles seront reprises dans une thèse en collaboration avec le LAMCOS.



**Figure A 5 : Visualisation d'un échantillon d'agarose entouré par de la bougie sur Abaqus. Au centre, l'aiguille. Un premier maillage a été proposé pour cette simulation, ainsi que des contraintes fixes aux bords de l'échantillon et de mouvement pour l'aiguille.**

### Mise en place d'un banc permettant une acquisition en mode continu

L'excitateur piézoélectrique que nous avons utilisé ne peut fonctionner continuellement sans surchauffer. Nous l'avons donc utilisé de façon discontinue, synchronisé avec les gradients d'encodage du mouvement. Afin d'accélérer l'acquisition, nous avons développé un banc qui pourrait supporter une acquisition continue, avec un excitateur dont la température ne s'élèverait pas aussi vite que le piézoélectrique (cf. Figure A 6).



**Figure A 6 : Fixation de la lamelle vibrante (en peek) à la tige de transmission par l'intermédiaire d'un plot et d'une tige souple à gauche. Banc d'élastographie complet à droite.**

Nous avons repris le banc utilisé avec un pot vibrant décrit dans la partie 1, mais l'avons adapté à un pot vibrant plus puissant (LDS V4BB30-4), relié à un amplificateur. La liaison entre la tige de transmission et la languette a été assouplie par 1 cm de plastique souple du côté de la languette, qui a été taillée dans un matériau plus rigide (peek) pour minimiser l'atténuation des

ondes. Malgré ces améliorations, l'amplitude délivrée dans des cerveaux de rats à 1000 Hz a été jugée insuffisante. Par ailleurs, l'installation de ce banc est compliquée : du matériel lourd doit être porté et déplacé à plusieurs reprises, et l'alignement du pot avec la tige de transmission, primordial pour minimiser la perte en amplitude des ondes le long de la tige, n'est pas reproductible. Ce banc aurait besoin d'améliorations afin de pouvoir être utilisé lors d'expériences futures.

## Annexe 3 : Séquence ERM

La séquence utilisée pour l'ensemble des acquisitions réalisées a été développée au cours de la thèse de Pauline Lefebvre (Lefebvre et al. 2017). Son chronogramme est présenté sur la Figure A 7. Il s'agit d'une séquence d'écho de spin (RARE Bruker) à laquelle ont été ajoutés des gradients d'encodage du mouvement se déclenchant après la mise en route du piézoélectrique, de façon à ce que la propagation de l'onde soit stationnaire au moment de l'encodage du mouvement. Au cours de l'acquisition, les gradients d'encodage du mouvement, sont décalés par rapport à l'excitation mécanique, de façon à obtenir des images à différents moments de la propagation de l'onde. Sur cette figure, l'encodage du mouvement se fait dans la direction de coupe mais peut aussi être appliqué dans les directions de lecture et de phase.

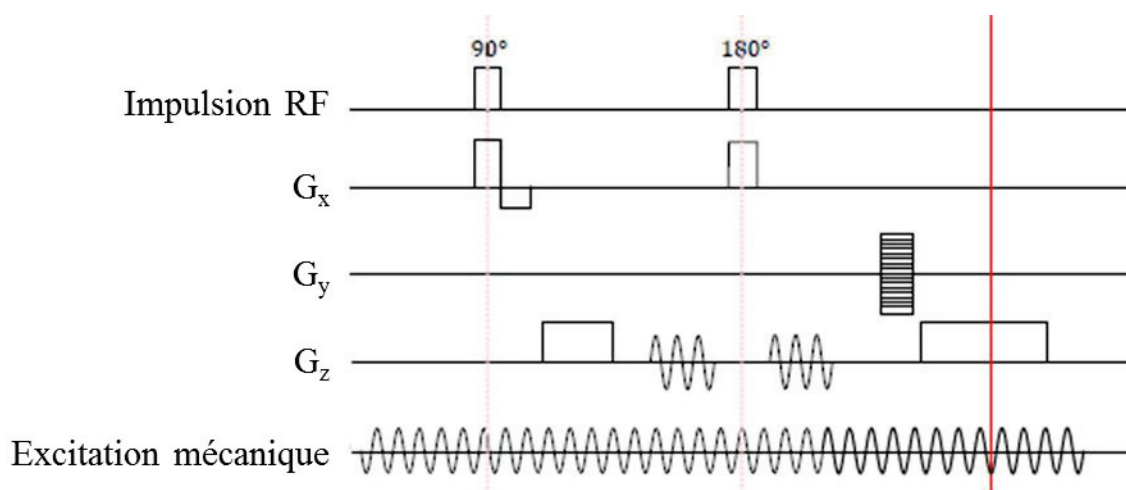


Figure A 7 : Chronogramme de la séquence d'écho de spin utilisée pour l'ERM.

# Annexe 4 : Résultats d'analyse statistique (fantômes d'agarose)

Cette annexe contient les tableaux de résultats du modèle linéaire mixte et présentés en documents annexes dans un article présenté au chapitre 2 (section 2.3.2).

G',  $\phi$ , c were evaluated by using linear mixed-effects models that included groups ( $\alpha$ -Syn, A $\beta$ , BSA) and frequency as fixed-effect and random effect grouped by phantom used.

Reference group: BSA - Reference Frequency: 400 Hz

**Table A 1: Linear mixed-effects model analysis evaluating G'  $\phi$  and c and including the groups  $\alpha$ -Syn, A $\beta$  and  $\phi$  and frequency as fixed-effect. The phantom used were included as random effect**

<b>G'</b>	$R^2 = 0.80$	
	<b><math>\beta</math> (95% CI)</b>	<b>p value</b>
<b>Freq 600</b>	0.35 ( -0.34 - 1.05 )	<b>0.357</b>
<b>Freq 800</b>	1.22 ( 0.7 - 1.73 )	<b>0.003</b>
<b>Freq 900</b>	1.36 ( 0.9 - 1.82 )	<b>0.001</b>
<b>Freq 1000</b>	1.69 ( 1.15 - 2.22 )	<b>0.001</b>
<b>Freq 1200</b>	2.37 ( 1.79 - 2.95 )	<b>&lt;0.001</b>
<b>A<math>\beta</math> group</b>	-0.44 ( -1.14 - 0.27 )	<b>0.272</b>
<b><math>\alpha</math>-Syn group</b>	-0.43 ( -1.25 - 0.4 )	<b>0.348</b>
<b>Phi</b>	$R^2 = 0.74$	
	<b><math>\beta</math> (95% CI)</b>	<b>p value</b>
<b>Freq 600</b>	-0.1 ( -0.14 - -0.06 )	<b>0.001</b>
<b>Freq 800</b>	-0.17 ( -0.21 - -0.14 )	<b>&lt;0.001</b>
<b>Freq 900</b>	-0.18 ( -0.23 - -0.14 )	<b>&lt;0.001</b>
<b>Freq 1000</b>	-0.17 ( -0.22 - -0.12 )	<b>0.001</b>
<b>Freq 1200</b>	-0.2 ( -0.24 - -0.16 )	<b>&lt;0.001</b>
<b>A<math>\beta</math> group</b>	0.08 ( 0 - 0.16 )	<b>0.090</b>
<b><math>\alpha</math>-Syn group</b>	0.09 ( 0.03 - 0.14 )	<b>0.020</b>
<b>C</b>	$R^2 = 0.71$	
	<b><math>\beta</math> (95% CI)</b>	<b>p value</b>
<b>Freq 600</b>	0.1 ( -0.04 - 0.23 )	<b>0.196</b>
<b>Freq 800</b>	0.25 ( 0.1 - 0.4 )	<b>0.016</b>
<b>Freq 900</b>	0.28 ( 0.11 - 0.45 )	<b>0.016</b>
<b>Freq 1000</b>	0.36 ( 0.2 - 0.52 )	<b>0.004</b>
<b>Freq 1200</b>	0.48 ( 0.31 - 0.66 )	<b>0.002</b>
<b>A<math>\beta</math> group</b>	-0.1 ( -0.21 - 0 )	<b>0.107</b>
<b><math>\alpha</math>-Syn group</b>	-0.09 ( -0.26 - 0.07 )	<b>0.298</b>



## Annexe 5 : Reconstruction multifréquence

Plusieurs aspects doivent être pris en compte pour assurer une reconstruction multifréquence :

- L'algorithme d'inversion va influencer le temps de traitement des données et certaines caractéristiques des élastogrammes obtenus, comme la détection des interfaces entre deux zones aux propriétés mécaniques différentes
- La résolution des images et les filtres utilisés vont moduler les valeurs de  $G^*$ ,  $k_r$  ou  $c$  obtenues

Dans cette annexe, nous présentons les choix que nous avons faits en matière de reconstruction, leurs avantages et leurs inconvénients.

Nous avons choisi d'utiliser une méthode d'inversion directe. Cette méthode se base sur une estimation locale de la longueur d'onde pour évaluer les paramètres viscoélastiques à chaque fréquence. Une hypothèse d'homogénéité locale et de linéarité est utilisée dans ce modèle. La présence d'une interface, que ce soit au bord des inclusions dans l'étude sur les fantômes d'agarose, ou entre les différentes régions anatomiques du cerveau, surtout en présence de bruit, est donc mal appréhendée par cet algorithme, qui peut propager une erreur dans les pixels adjacents (Manduca et al. 2001). De plus, pour ce type de reconstruction, le rapport entre la résolution, le bruit des images et la longueur d'onde peut entraîner des erreurs d'estimation des propriétés mécaniques (Papazoglou et al. 2008; Yue et al. 2017). En effet, lorsque le rapport longueur d'onde/taille des pixels ( $\lambda/a$ ) est élevé, il y a une sous-estimation de  $\lambda$  et donc de la vitesse et de  $G'$ , liée à la présence de bruit, à l'inverse, pour des valeurs de  $\lambda/a$  faibles, les paramètres élastiques sont surestimés à cause de la discrétisation de l'échantillonnage. De plus, plus le RSB diminue, plus  $G'$  et  $c$  sont sous-estimés, le bruit ajoutant des variations à haute fréquence spatiale dans l'image de phase, apparaissant comme des petites longueurs d'onde lors de la reconstruction. Comme la fréquence variait pendant les acquisitions ERM, le rapport  $\lambda/a$  pour les échantillons variait entre 5 et 14, selon une estimation faite sur les profils de phase. Il existe une possibilité de petites surestimations à 400 Hz ou de sous-estimations de la vitesse des ondes à hautes fréquences. Cependant, aux RSB (entre 20 et 35) et  $\lambda/a$  considérés, la répercussion de cette variation devrait rester minimale.

Il est possible de compenser ces différences en utilisant un filtre qui lisserait le bruit différemment à chaque fréquence. N'ayant mené aucune simulation permettant de régler le



niveau de filtre, nous avons préféré conserver cette faible erreur sur les estimations des paramètres mécaniques plutôt que de prendre le risque d'ajouter un biais par le filtrage. Finalement, les ajustements obtenus en utilisant ces données avec un niveau de filtrage constant correspondent bien à une loi de puissance, et y est resté dans l'intervalle théorique attendu [0;1] (Holm et Sinkus 2010), indiquant que la gamme de fréquences utilisée était suffisamment petite pour minimiser l'impact d'une évolution de  $\lambda/a$  sur la valeur finale de y. En outre, y pour la BSA et les fibrilles a été obtenu en suivant le même protocole, tout biais de reconstruction devrait avoir influencé l'ensemble des groupes étudiés, sans distinction.

En ce qui concerne les rats, la gamme de fréquences utilisée (800-1200 Hz) et donc l'étendue des rapports  $\lambda/a$  (compris entre 5 et 10) est plus petite que dans le cas des échantillons. En revanche, le rapport phase à bruit est plus élevé. Cette augmentation du bruit compromet l'ajustement selon la loi puissance car elle augmente la variabilité pour les points utilisés dans l'ajustement. L'ajustement des lois puissance pâtit fortement des fluctuations à l'extrémité des gammes de fréquence imagées (Clauset, Shalizi, and Newman 2009), l'ajout de bruit à des données qui étaient déjà peu nombreuses (4 fréquences seulement) pourrait donc fortement compromettre l'analyse.

Au cours de ce travail de thèse, une interface graphique préexistante au laboratoire et permettant de régler différents paramètres de la reconstruction (filtres, algorithme d'inversion...) a été développée afin de pouvoir optimiser toutes les étapes de la reconstruction, à chaque fréquence lors de prochaines études. Nous n'avons pas réussi cependant à l'utiliser pour les études décrites dans les chapitres 2 et 3, n'ayant pas réussi à reproduire nos résultats avec un filtre et une inversion équivalentes.

## Annexe 6 : Test mécanique du banc d'ERM *ex vivo*

De façon à mieux comprendre l'évolution des amplitudes mesurées à différentes fréquences, des tests mécaniques ont été conduits. Un capteur de déformation a été installé à la base de la languette supportant l'aiguille et transmettant les ondes aux échantillons. Une mesure de la déformation a ensuite été menée hors de l'IRM, à l'aide du logiciel DeWeSoft X3-SP7. Un balayage en fréquence a été fait (100 – 1200 Hz), avec une amplitude constante au niveau du générateur basse fréquence (2 V). La valeur de la déformation mesurée est proportionnelle à l'amplitude des ondes générées. Elle est faible à basse fréquences, atteint 158  $\mu\text{m.m}^{-1}$  autour de 500 Hz. Elle chute ensuite brutalement (23  $\mu\text{m.m}^{-1}$  mesurés à 580 Hz), puis augmente progressivement à nouveau pour atteindre 28  $\mu\text{m.m}^{-1}$  à 800 Hz et 66  $\mu\text{m.m}^{-1}$  à 900 Hz. Un pic est atteint à 1000 Hz (210  $\mu\text{m.m}^{-1}$ ), avant une diminution progressive de la déformation à plus hautes fréquences (cf. Figure A 8).

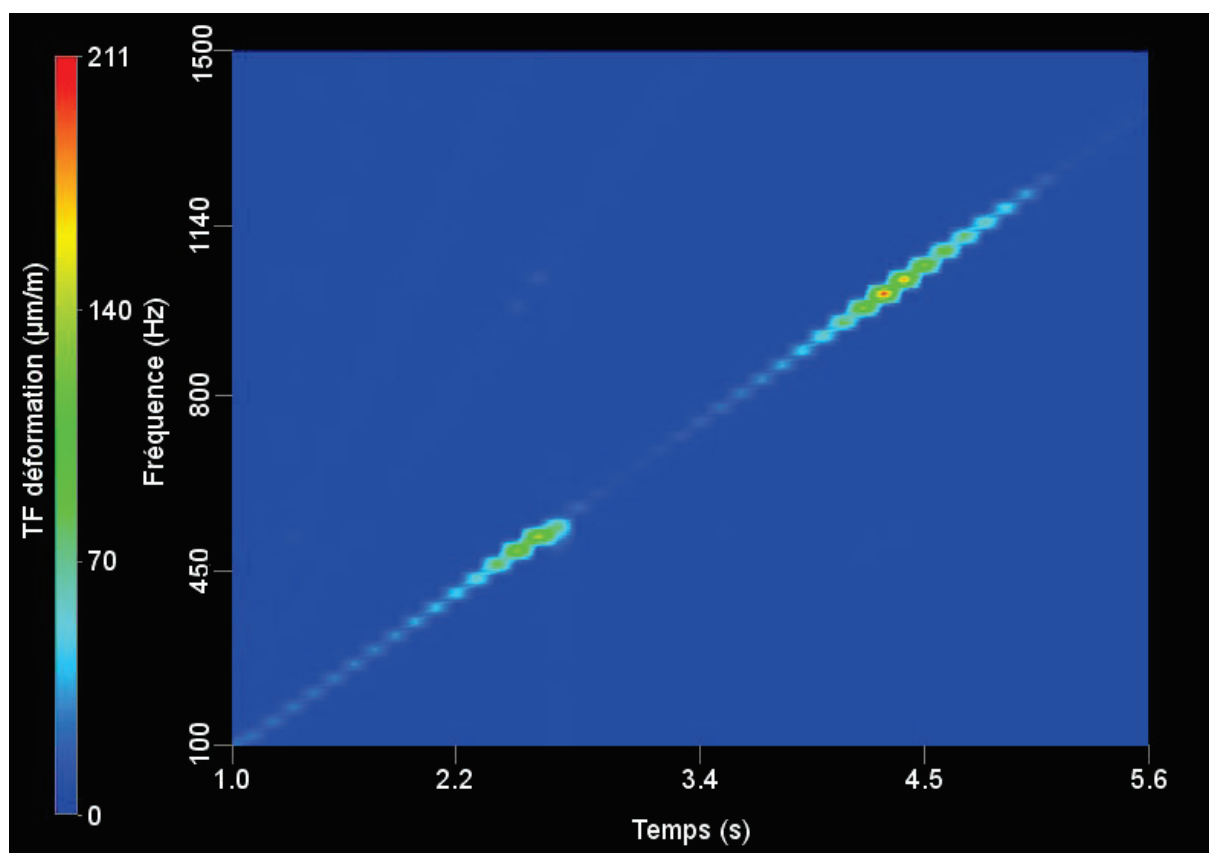


Figure A 8 : Amplitude de la transformée de Fourier mesurée au bout du banc d'élastographie lors d'un balayage en fréquence de 100 à 1200 Hz pour le piézoélectrique. La tension d'entrée avant amplification est de 2 V.

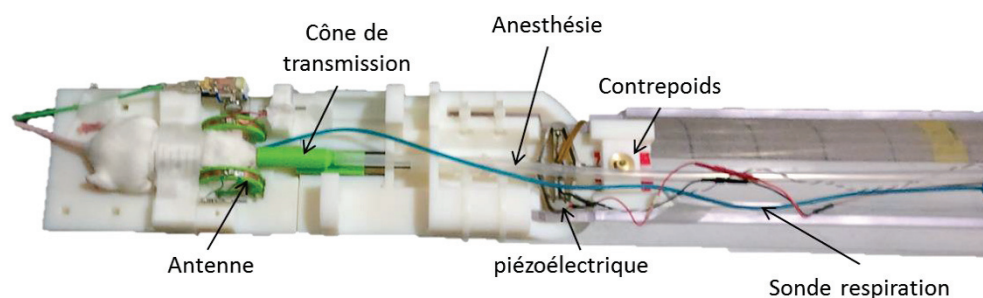
Ces mesures, faites à amplitude d'entrée (générateur) constante indiquent une résonance sélective du banc autour de 500 Hz, et une seconde plus importante autour de 1000 Hz.

Lors des acquisitions ERM (à 400, 600, 800, 900, 1000 et 1200 Hz), afin de maintenir une amplitude d'onde dans les échantillons constante à toutes les fréquences imagées, l'amplitude du générateur basse fréquence doit être plus faible à 1000 Hz comparé aux autres fréquences. Cela évitera un enroulement trop prononcé des ondes.

Cette acquisition donne les propriétés du banc lors pour une acquisition dans une configuration donnée du banc. Lors de sa mise en place, le serrage du contrepoids peut modifier la contrainte pesant sur l'excitateur piézoélectrique. En conséquence, les résonances mises en évidence ici pourraient disparaître ou être décalées.

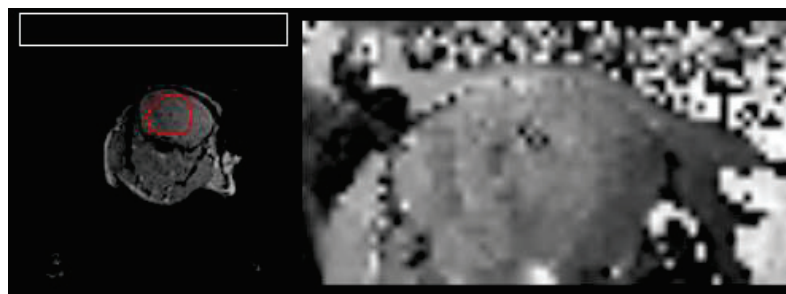
## Annexe 7 : développement de bancs d'ERM *in vivo*

Deux bancs d'imagerie *in vivo* ont été développés. Lors du développement du premier banc, une bobine de type Helmholtz accompagnée d'un coupleur a été utilisée, comme pour le dispositif *ex vivo*, l'excitateur piézoélectrique et son contrepoids conservés. Un cône transmettant les vibrations au niveau du museau de la souris a été utilisé pour éviter un mouvement d'ensemble du crâne de la souris. Le cône a aussi l'avantage de permettre l'acheminement du gaz anesthésiant vers la souris (cf. Figure A 9).



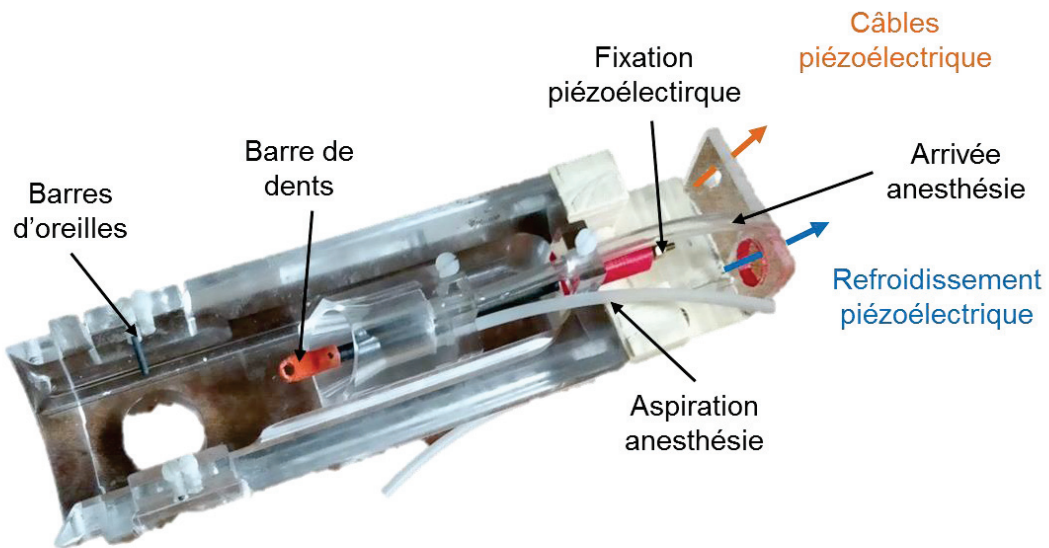
**Figure A 9 : Banc d'élastographie *in vivo* adapté à l'imagerie ERM du cerveau de souris.**

Lors d'acquisitions tests, les performances de la bobine se sont révélées correctes même si elles nécessitaient une amélioration du point de vue de l'uniformité : pour une séquence FLASH (TR/TE = 15 ms/6 ms, temps d'acquisition de 2 minutes, voxel de  $312 \times 312 \times 625 \mu\text{m}^3$ ) le RSB était égal à 49, mais une zone d'ombre était apparue du côté gauche des images. Le système de contention s'est aussi révélé insuffisant, l'amplitude des ondes trop faibles, et le banc trop lourd car il penchait et reposait donc sur le tube de l'IRM (cf. Figure A 10).



**Figure A 10 : À gauche, image d'une coupe axiale d'un cerveau de souris *in vivo* (acquisition FLASH, les zones contourées en rouge et blanc indiquent les ROIs utilisées pour le calcul du RSB) et image de phase ERM du même cerveau de souris.**

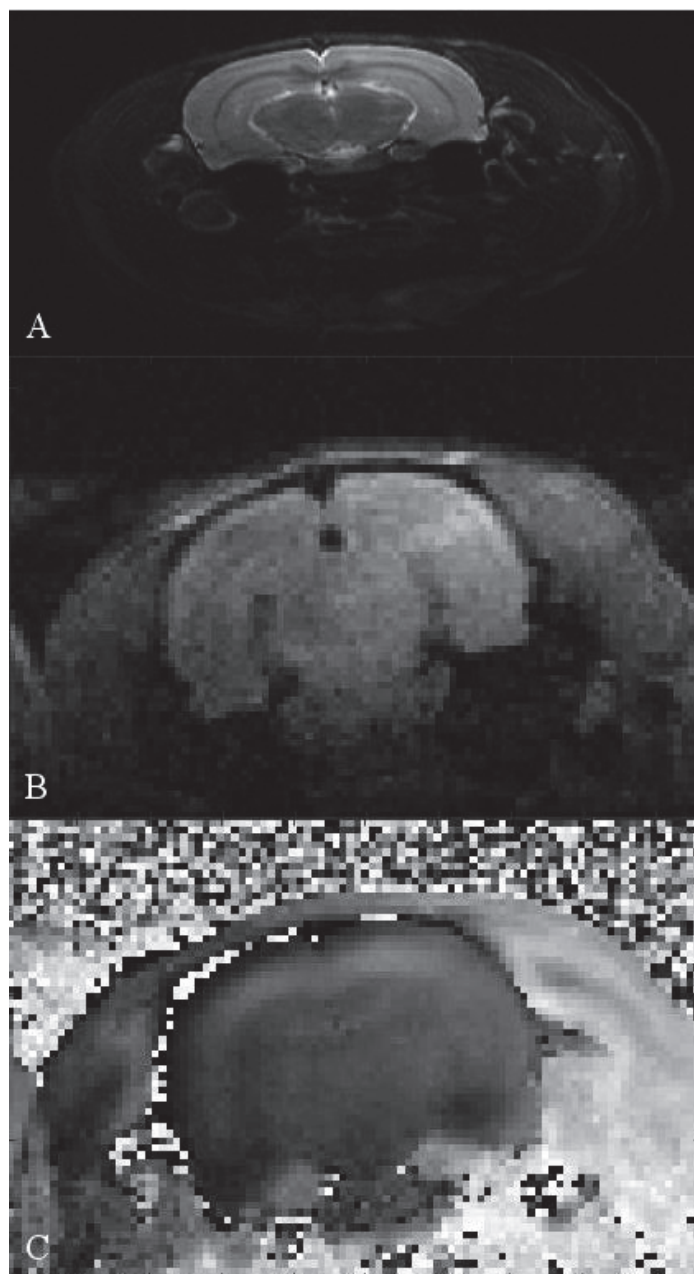
Un second banc a été mis en place par la suite. Un lit commercial (Bruker) déjà usiné et dédié à l'imagerie du cerveau de rat *in vivo* IRM a été adapté. Il comportait un berceau, des barres d'oreilles et un cône de nez coulissant pouvant acheminer l'anesthésie. Une tige de carbone, fixée à une barre de dents en PLA et à l'excitateur piézoélectrique coulisse dans le cône d'anesthésie. Une arrivée d'anesthésie et un tube pour l'aspiration ont été fixés au banc. Afin de pouvoir refroidir le piézoélectrique et ainsi accélérer les séquences IRM, une arrivée d'air alimentée par une pompe a été prévue, avec le passage des câbles d'alimentation du piézoélectrique (cf. Figure A 11).



**Figure A 11 : Banc d'élastographie *in vivo* développé pour rats et souris.**

Pour ce dispositif, une bobine de surface « tête rat » RapidBiomed est utilisée pour la réception et une bobine volumique RapidBiomed pour l'émission ( $\text{\O} 72 \text{ mm}$ ). Ce banc peut être utilisé sur rats ou souris et a l'avantage de très bien maintenir la tête du rat grâce à la bobine de surface tête rat qui épouse la forme de la tête du rat sur le banc.

Ce banc a été testé pour l'imagerie d'un cerveau de rat *in vivo*, à 1000 Hz. Une image anatomique du cerveau est présentée Figure A 12.A. L'amplitude moyenne des ondes était de  $6.14 \pm 0.02 \text{ }\mu\text{m}$ . Malgré cette amplitude mesurée relativement importante, le front d'onde est difficile à distinguer sur les images (cf. Figure A 12.C).



**Figure A 12 : A. Image anatomique RARE d'un cerveau de rat in vivo. B. Image de magnitude et C. image de phase d'une coupe centrale d'une acquisition ERM à 1000 Hz de ce même cerveau.**

## Annexe 8 : Tests ERM sur des cerveaux *ex vivo*

Après les premiers tests effectués sur des cerveaux de rats *ex vivo*, nous avons noté que l'amplitude des ondes propagées était trop faible, et diminuait de façon très rapide en s'éloignant de l'aiguille par rapport aux acquisitions sur fantômes. Il n'était pas possible de complètement compenser cette perte en augmentant la tension aux bornes du piézoélectrique. En effet, le refroidissement du piézoélectrique se révèle moins efficace lorsque la tension augmente, et des températures critiques (80°C) sont rapidement atteintes en appliquant une tension de 6V au niveau du générateur basse fréquence (avant amplification). De plus, des fréquences parasites (harmoniques) peuvent être générées lorsque la puissance du piézoélectrique est augmentée. De plus, l'ensemble du banc peut entrer en vibration. D'autres problèmes logistiques liés au transport des rats sont apparus alors que nous essayions d'augmenter l'amplitude des ondes dans les cerveaux. Nous avons donc essayé d'améliorer la propagation des ondes dans les cerveaux, tout en simplifiant le transport des échantillons à imager.

### Utilisation de cerveaux congelés

Les rats utilisés dans cette étude sont injectés et stabulés au CERMEP, à l'est de Lyon, et imagés à CREATIS, au nord de la ville. Un article suggérait qu'une congélation du cerveau, rapide et à suffisamment basse température pourrait permettre de conserver les propriétés mécaniques du tissu cérébral lors de leur décongélation (Boulet, Kelso, and Othman 2011). Nous espérons pouvoir éviter d'avoir à transporter les animaux vivants pour les sacrifier à CREATIS avec cette méthode. De plus, le matériel nécessaire à la perfusion des cerveaux n'était pas disponible sur le site de l'imageur. Nous avons donc congelé des cerveaux que nous avons transporté ensuite avec des pastilles de glace.

Malheureusement, après décongélation, l'amplitude des ondes était encore plus faible que lors de nos précédents essais. Au toucher, les cerveaux étaient très mous après la session d'imagerie. Le cycle de congélation/décongélation sur un cerveau non fixé et cryoprotégé détériore bien les cellules et donc la structure tissulaire.

### Utilisation de cerveaux frais

Des cerveaux frais ont finalement été utilisés, avec le sacrifice des rats directement sur le site de la Doua. L'amplitude des ondes restait faible ( $2.5 \pm 3 \mu\text{m}$  pour une tension au



générateur de 6 V à 1000 Hz). Nous avons fait l'hypothèse que l'aiguille que nous utilisons glissait contre les tissus sans les entraîner dans son mouvement. Nous avons finalement appliqué de la glue sur l'aiguille avant de placer l'échantillon par-dessus. De cette façon, la propagation a été fortement améliorée, on a même pu atteindre une amplitude moyenne de  $10.7 \pm 7 \mu\text{m}$  à 1000 Hz dans un cerveau (rat injecté avec des fibrilles) pour une tension au générateur de 3 V.

Malgré ces améliorations, l'amplitude des ondes est restée tributaire du montage du piézoélectrique sur le banc (un serrage imparfait des vis peut conduire à une diminution critique des ondes dans le cerveau). Il y a aussi une baisse d'amplitude lorsque dans les mêmes conditions, deux cerveaux sont imagés d'affilée ( $4.4 \pm 2 \mu\text{m}$  vs  $1.8 \pm 2 \mu\text{m}$ ). Cette baisse pourrait être liée à un ramollissement de l'aiguille, ou à une moins bonne accroche de la glue sur une aiguille mal nettoyée après l'imagerie d'un premier cerveau.



# Publications et communications

## Articles dans des revues à comité de lecture

**M. Bigot, F. Chauveau, O. Beuf, S. A. Lambert.** Magnetic Resonance Elastography of Rodent Brain. *Front. Neurol.* 2018; 10:3389/fneur.2018.01010.

**M. Bigot, F. Chauveau, C. Amaz, R. Sinkus, O. Beuf, S. A. Lambert.** The apparent mechanical effect of isolated A $\beta$  and  $\alpha$ -Syn aggregates revealed by multi-frequency MRE. *NMR in Biomedicine*, 2019 (*article accepté*).

## Communications dans des congrès internationaux avec comité de lecture

**M. Bigot, F. Chauveau, H. Dorez, C. Mandon, C. Marquette, K. Tse Ve Koon, P. M. Lefebvre, D. Grenier, H. Raki, O. Beuf, S. A. Lambert.** New 3D-printed elastography bench for MR study of engineered tissue and histology, à 1<sup>st</sup> international MRE workshop, Berlin, Allemagne, 2017. (*presentation orale*)

**M. Bigot, H. Dorez, C. Mandon, C. Marquette, K. Tse Ve Koon, P. M. Lefebvre, D. Grenier, H. Raki, F. Chauveau, O. Beuf, S. A. Lambert.** Development of an elastography bench for MR exam of small samples, à l'EMIM, Glasgow, 2019. (*poster*)

**M. Bigot, F. Chauveau, O. Beuf, S. A. Lambert.** *In vitro* and *ex vivo* characterization of protein aggregates with multi-frequency MR Elastography, à l'ISMRM, Montréal, Canada, 2019. (*poster*)

**S. A. Lambert, T. Gerges, R. Delamea, M. Bigot, H. Dorez, P. Lombard, V. Semet, M. Cabrera.** Design of a volume MRI coil by metalizing 3D printing substrates by electroless and/or electroplating processes, à l'ISMRM, Montréal, Canada,. (*presentation orale*)

## Communications dans des congrès nationaux et régionaux avec comité de lecture

**M. Bigot, F. Chauveau, C. Mandon, O. Beuf, S. A. Lambert.** Effect of cerebral protein aggregates on tissue mechanical properties measured by Magnetic Resonance, au Forum en Rhône-Alpes Auvergne de Labex en Santé, Lyon, France, 2016. (*poster*)

**M. Bigot, H. Dorez, C. Mandon, C. Marquette, K. Tse Ve Koon, P. M. Lefebvre, D. Grenier, H. Raki, F. Chauveau, O. Beuf, S. A. Lambert.** Développement d'un banc d'élastographie pour l'histologie et l'étude des tissus issus de l'ingénierie tissulaire – Résultats préliminaires, au CNIV, Paris, France, 2017. (*présentation orale*)

**M. Bigot, H. Dorez, C. Mandon, C. Marquette, K. Tse Ve Koon, P. M. Lefebvre, D. Grenier, H. Raki, F. Chauveau, O. Beuf, S. A. Lambert.** Development of an elastography bench for MR exam of small samples, à l'ITMO, Lyon, France, 2017. (*poster*)

**M. Bigot, F. Chauveau, C. Devillard, C. Mandon, C. Marquette, O. Beuf, S. A. Lambert.** Caractérisation d'agrégats fibrillaires par élastographie IRM, Journée de l'EDISS, Lyon, France, 2018. (*poster*)

**M. Bigot, F. Chauveau, C. Devillard, C. Mandon, C. Marquette, O. Beuf, S. A. Lambert.** Fibril aggregates characterization with MR Elastography, à l'assemblée générale du Labex PRIMES, Lyon, France, 2018. (*présentation orale*)

**M. Bigot, F. Chauveau, R. Sinkus, O. Beuf, S. A. Lambert.** In vitro and ex vivo characterization of protein aggregates with multi-frequency MR Elastography, à la SFRMBM, Strasbourg, France, 2019. (*poster*)

**M. Bigot, F. Chauveau, H. Dorez, C. Mandon, C. Marquette, K. Tse Ve KOON, P. M. Lefebvre, D. Grenier, H. Raki, O. Beuf, S. A. Lambert.** Development of a bench for small samples elastography, au 2<sup>nd</sup> Forum en Rhône-Alpes Auvergne de Labex en Santé, Lyon, France, 2019. (*poster*)

## Animation scientifique

Participation au réseau FINYS (French Imaging Network for Young Scientists). Organisation d'événements permettant la rencontre des jeunes chercheurs en imagerie et facilitant leur accès à l'emploi : participation à l'organisation d'apéros FINYS à Lyon, et du meeting annuel du réseau, médiation d'une session (FINYS – Les jeunes chercheurs en imagerie) réservée aux jeunes au CNIV 2017.

# Références

- Alzet®. 2018. “Preparation of Artificial CSF.” Alzet.Com. November 4, 2018. [http://www.alzet.com/products/guide\\_to\\_use/cfs\\_preparation.html](http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html).
- Arani, Arvin, Matthew C. Murphy, Kevin J. Glaser, Armando Manduca, David S. Lake, Scott A. Kruse, Clifford R. Jack, Richard L. Ehman, and John Huston. 2015. “Measuring the Effects of Aging and Sex on Regional Brain Stiffness with MR Elastography in Healthy Older Adults.” *NeuroImage* 111 (May): 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.02.016>.
- Åslund, Andreas, Christina J. Sigurdson, Therése Klingstedt, Stefan Grathwohl, Tristan Bolmont, Dara L. Dickstein, Eirik Glimsdal, et al. 2009. “Novel Pentameric Thiophene Derivatives for in Vitro and in Vivo Optical Imaging of a Plethora of Protein Aggregates in Cerebral Amyloidoses.” *ACS Chemical Biology* 4 (8): 673–84. <https://doi.org/10.1021/cb900112v>.
- Atay, Stefan M., Christopher D. Kroenke, Arash Sabet, and Philip V. Bayly. 2008. “Measurement of the Dynamic Shear Modulus of Mouse Brain Tissue in Vivo by Magnetic Resonance Elastography.” *Journal of Biomechanical Engineering* 130 (2): 021013. <https://doi.org/10.1115/1.2899575>.
- Barnhill, Eric, Lyam Hollis, Ingolf Sack, Jürgen Braun, Peter R. Hoskins, Pankaj Pankaj, Colin Brown, Edwin J. R. van Beek, and Neil Roberts. 2017. “Nonlinear Multiscale Regularisation in MR Elastography: Towards Fine Feature Mapping.” *Medical Image Analysis* 35 (January): 133–45. <https://doi.org/10.1016/j.media.2016.05.012>.
- Bermejo-Pareja, Felix, Desiree Antequera, Teo Vargas, Jose A. Molina, and Eva Carro. 2010. “Saliva Levels of Abeta1-42 as Potential Biomarker of Alzheimer’s Disease: A Pilot Study.” *BMC Neurology* 10 (1): 108. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-10-108>.
- Bertalan, Gergely, Jing Guo, Jürgen Braun, and Ingolf Sack. 2017. “Tomoelastography of the Mouse Brain.” In , 47. Berlin.
- Bertalan, Gergely, Jing Guo, Heiko Tzschätzsch, Charlotte Klein, Eric Barnhill, Ingolf Sack, and Jürgen Braun. 2019. “Fast Tomoelastography of the Mouse Brain by Multifrequency Single-Shot MR Elastography.” *Magnetic Resonance in Medicine* 81 (4): 2676–87. <https://doi.org/10.1002/mrm.27586>.
- Bigot, Mathilde, Fabien Chauveau, Olivier Beuf, and Simon A. Lambert. 2018. “Magnetic Resonance Elastography of Rodent Brain.” *Frontiers in Neurology* 9 (November). <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01010>.
- Bilston, Lynne E. 2011. “Brain Tissue Mechanical Properties.” In *Neural Tissue Biomechanics*, edited by Lynne E. Bilston, 11–24. Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/8415\\_2010\\_36](https://doi.org/10.1007/8415_2010_36).
- Boulet, Thomas, Matthew L. Kelso, and Shadi F. Othman. 2011. “Microscopic Magnetic Resonance Elastography of Traumatic Brain Injury Model.” *Journal of Neuroscience Methods* 201 (2): 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.08.019>.
- Boulet, Thomas, Matthew L. Kelso, and Shadi F. Othman. 2013. “Long-Term In Vivo Imaging of Viscoelastic Properties of the Mouse Brain after Controlled Cortical Impact.” *Journal of Neurotrauma* 30 (17): 1512–20. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2788>.
- Braak, Heiko, Kelly Del Tredici, Udo Rüb, Rob A. I de Vos, Ernst N. H Jansen Steur, and Eva Braak. 2003. “Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson’s Disease.” *Neurobiology of Aging* 24 (2): 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9).

- Braun, Jürgen, Heiko Tzschätzsch, Clara Körting, Angela Ariza de Schellenberger, Marika Jenderka, Toni Drießle, Michael Ledwig, and Ingolf Sack. 2017. “A Compact 0.5 T MR Elastography Device and Its Application for Studying Viscoelasticity Changes in Biological Tissues during Progressive Formalin Fixation.” *Magnetic Resonance in Medicine*, March, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/mrm.26659>.
- Brown, Guy C., and Jonas J. Neher. 2010. “Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons.” *Molecular Neurobiology* 41 (2): 242–47. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8105-9>.
- Chatelin, Simon, Marie Humbert-Claude, Philippe Garteiser, Ana Ricobaraza, Valérie Vilgrain, Bernard E. Van Beers, Ralph Sinkus, and Zsolt Lenkei. 2016. “Cannabinoid Receptor Activation in the Juvenile Rat Brain Results in Rapid Biomechanical Alterations: Neurovascular Mechanism as a Putative Confounding Factor.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (5): 954–64. <https://doi.org/10.1177/0271678X15606923>.
- Cheon, Mookyoung, Carol K. Hall, and Iksoo Chang. 2015. “Structural Conversion of A $\beta$ 17–42 Peptides from Disordered Oligomers to U-Shape Protofilaments via Multiple Kinetic Pathways.” *PLOS Computational Biology* 11 (5): e1004258. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004258>.
- Ciccotti, Matteo, and Francesco Mulargia. 2002. “Pernicious Effect of Physical Cutoffs in Fractal Analysis.” *Physical Review E* 65 (3): 037201. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.037201>.
- Clauset, Aaron, Cosma R. Shalizi, and M. E. J. Newman. 2009. “Power-Law Distributions in Empirical Data.” *SIAM Review* 51 (4): 661–703. <https://doi.org/10.1137/070710111>.
- Clayton, Eric H., Joel R. Garbow, and Philip. V. Bayly. 2011. “Frequency-Dependent Viscoelastic Parameters of Mouse Brain Tissue Estimated by MR Elastography.” *Physics in Medicine and Biology* 56 (8): 2391–2406. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/56/8/005>.
- Coelho, Santiago, Jose M. Pozo, Marina Costantini, J. Robin Highley, Meghdoot Mozumder, Julie E. Simpson, Paul G. Ince, and Alejandro F. Frangi. 2018. “Local Volume Fraction Distributions of Axons, Astrocytes, and Myelin in Deep Subcortical White Matter.” *NeuroImage* 179 (October): 275–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.06.040>.
- Costantini, Mario 1998. “A Novel Phase Unwrapping Method Based on Network Programming.” *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 36 (3): 813–21. <https://doi.org/10.1109/36.673674>.
- Décorps, Michel. 2011. *Imagerie de résonance magnétique: Bases physiques et méthodes*. EDP Sciences.
- Diguet, Elsa, Eric Van Houten, M. Green, and Ralph Sinkus. 2009. “High Resolution MR-Elastography Mouse Brain Study: Towards a Mechanical Atlas.” *Proceedings of the 17<sup>th</sup> Annual Meeting ISMRM, Honolulu, USA*
- Dittmann, Florian, Sebastian Hirsch, Heiko Tzschätzsch, Jing Guo, Jürgen Braun, and Ingolf Sack. 2016. “In Vivo Wideband Multifrequency MR Elastography of the Human Brain and Liver.” *Magnetic Resonance in Medicine* 76 (4): 1116–26. <https://doi.org/10.1002/mrm.26006>.
- ElSheikh, Mona, Arvin Arani, Avital Perry, Bradley F. Boeve, Fredric B. Meyer, Rodolfo Savica, Richard L. Ehman, and John Huston. 2017. “MR Elastography Demonstrates Unique Regional Brain Stiffness Patterns in Dementias.” *AJR. American Journal of Roentgenology* 209 (2): 403–8. <https://doi.org/10.2214/AJR.16.17455>.
- Fayed, Nicolás, Pedro J. Modrego, Gulillermo Rojas Salinas, and José Gazulla. 2012. “Magnetic Resonance Imaging Based Clinical Research in Alzheimer’s Disease.”



- Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 31 Suppl 3: S5-18. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111292>.
- Feng, Yuan, Eric H. Clayton, Yulin Chang, Ruth J. Okamoto, and Philip V. Bayly. 2013. "Viscoelastic Properties of the Ferret Brain Measured in Vivo at Multiple Frequencies by Magnetic Resonance Elastography." *Journal of Biomechanics* 46 (5): 863–70. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.12.024>.
- Feng, Yuan, Eric H. Clayton, Ruth J. Okamoto, John Engelbach, Philip V. Bayly, and Joel R. Garbow. 2016. "A Longitudinal Magnetic Resonance Elastography Study of Murine Brain Tumors Following Radiation Therapy." *Physics in Medicine & Biology* 61 (16): 6121. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/61/16/6121>.
- Feng, Yuan, Yulin Chang, Erik H. Clayton, Ruth J. Okamoto, and Philip V. Bayly. 2012. "Shear Wave Propagation of the Ferret Brain at Multiple Frequencies In Vivo," November, 779–85. <https://doi.org/10.1115/IMECE2012-88374>.
- Fovargue, Daniel, Sebastian Kozerke, Ralph Sinkus, and David Nordsletten. 2018. "Robust MR Elastography Stiffness Quantification Using a Localized Divergence Free Finite Element Reconstruction." *Medical Image Analysis* 44 (February): 126–42. <https://doi.org/10.1016/j.media.2017.12.005>.
- Fovargue, Daniel, David Nordsletten, and Ralph Sinkus. 2018. "Stiffness Reconstruction Methods for MR Elastography." *NMR in Biomedicine* 0 (0): e3935. <https://doi.org/10.1002/nbm.3935>.
- Freimann, Florian Baptist, Susanne Müller, Kaspar-Josche Streitberger, Jing Guo, Sergej Rot, Adnan Ghori, Peter Vajkoczy, Rolf Reiter, Ingolf Sack, and Jürgen Braun. 2013. "MR Elastography in a Murine Stroke Model Reveals Correlation of Macroscopic Viscoelastic Properties of the Brain with Neuronal Density." *NMR in Biomedicine* 26 (11): 1534–39. <https://doi.org/10.1002/nbm.2987>.
- Frost, Bess, and Marc I. Diamond. 2010. "Prion-like Mechanisms in Neurodegenerative Diseases." *Nature Reviews Neuroscience* 11 (3): 155–59. <https://doi.org/10.1038/nrn2786>.
- Garteiser, Philippe, Ramin S. Sahebjavaher, Leon C. Ter Beek, Septimiu Salcudean, Valérie Vilgrain, Bernard E. Van Beers, and Ralph Sinkus. 2013. "Rapid Acquisition of Multifrequency, Multislice and Multidirectional MR Elastography Data with a Fractionally Encoded Gradient Echo Sequence." *NMR in Biomedicine* 26 (10): 1326–35. <https://doi.org/10.1002/nbm.2958>.
- Gerischer, Lea M., Andreas Fehlner, Theresa Köbe, Kristin Prehn, Daria Antonenko, Ulrike Grittner, Jürgen Braun, Ingolf Sack, and Agnes Flöel. 2018. "Combining Viscoelasticity, Diffusivity and Volume of the Hippocampus for the Diagnosis of Alzheimer's Disease Based on Magnetic Resonance Imaging." *NeuroImage: Clinical* 18 (January): 485–93. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.12.023>.
- Glatard Tristan, Carole Lartizien, Bernard Gibaud, Rafael Ferreira da Silva, Germain Forestier, Frederic Cervenansky, Martino Alessandrini, Hughes Benoit-Cattin, Olivier Bernard, Sorina Camarasu-Pop, Nadia Cerezo, Patrick Clarysse, Alban Gaignard, Patrick Hugonnard, Hervé Liebgott, Simon Marache, Adrien Marion, Johan Montagnat, Joachim Tabary, Denis Friboulet. "A Virtual Imaging Platform for Multi-Modality Medical Image Simulation." *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 2013;32(1):110-118. doi:10.1109/TMI.2012.2220154
- Goldstein, Richard M., Howard A. Zebker, and Charles L. Werner. 1988. "Satellite Radar Interferometry: Two-Dimensional Phase Unwrapping." *Radio Science* 23 (4): 713–20. <https://doi.org/10.1029/RS023i004p00713>.
- Guenther, Christian, Sweta Sethi, Marian Troelstra, Ayse Sila Dokumaci, Ralph Sinkus, and Sebastian Kozerke. 2019. "Ristretto MRE: A Generalized Multi-shot GRE-MRE Sequence." *NMR in Biomedicine*, January. <https://doi.org/10.1002/nbm.4049>.



- Guo, Jing, Sebastian Hirsch, Andreas Fehlner, Sebastian Papazoglou, Michael Scheel, Juergen Braun, and Ingolf Sack. 2013. "Towards an Elastographic Atlas of Brain Anatomy." *PLOS ONE* 8 (8): e71807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071807>.
- Guo, Jing, Oleg Posnansky, Sebastian Hirsch, Michael Scheel, Matthias Taupitz, Juergen Braun, and Ingolf Sack. 2012. "Fractal Network Dimension and Viscoelastic Powerlaw Behavior: II. An Experimental Study of Structure-Mimicking Phantoms by Magnetic Resonance Elastography." *Physics in Medicine and Biology* 57 (12): 4041. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/57/12/4041>.
- Hain, Elisabeth G., Charlotte Klein, Tonia Munder, Juergen Braun, Kerstin Riek, Susanne Mueller, Ingolf Sack, and Barbara Steiner. 2016. "Dopaminergic Neurodegeneration in the Mouse Is Associated with Decrease of Viscoelasticity of Substantia Nigra Tissue." *PLOS ONE* 11 (8): e0161179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161179>.
- Hamburger, Daniel, Ofer Biham, and David Avnir. 1996. "Apparent Fractality Emerging from Models of Random Distributions." *Physical Review E* 53 (4): 3342–58. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.53.3342>.
- Hirsch, Sebastian, Jürgen Braun, and Ingolf Sack. 2017. *Magnetic Resonance Elastography: Physical Background and Medical Applications*. Wiley-VCH. <https://www.wiley.com/en-us/Magnetic+Resonance+Elastography%3A+Physical+Background+and+Medical+Applications-p-9783527340088>.
- Hiscox, Lucy V., Curtis L. Johnson, Eric Barnhill, Matt D. J. McGarry, John Huston 3rd, Edwin J. R. van Beek, John M. Starr, and Neil Roberts. 2016. "Magnetic Resonance Elastography (MRE) of the Human Brain: Technique, Findings and Clinical Applications." *Physics in Medicine and Biology* 61 (24): R401. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/61/24/R401>.
- Holm, Sverre, and Ralph Sinkus. 2010. "A Unifying Fractional Wave Equation for Compressional and Shear Waves." *The Journal of the Acoustical Society of America* 127 (1): 542–48. <https://doi.org/10.1121/1.3268508>.
- Honarvar, Mohammad, Julio Lobo, Omid Mohareri, Septimiu E. Salcudean, and Robert Rohling. 2015. "Direct Vibro-Elastography FEM Inversion in Cartesian and Cylindrical Coordinate Systems without the Local Homogeneity Assumption." *Physics in Medicine and Biology* 60 (9): 3847–68. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/60/9/3847>.
- Honarvar, Mohammad, Ramin Sahebjavaher, Ralph Sinkus, Robert Rohling, and Septimiu E. Salcudean. 2013. "Curl-Based Finite Element Reconstruction of the Shear Modulus Without Assuming Local Homogeneity: Time Harmonic Case." *IEEE Transactions on Medical Imaging* 32 (12): 2189–99. <https://doi.org/10.1109/TMI.2013.2276060>.
- Hughes, Joshua D., Nikoo Fattahi, J. Van Gompel, Arvin Arani, Fredric Meyer, Giuseppe Lanzino, Michael J. Link, Richard Ehman, and John Huston. 2015. "Higher-Resolution Magnetic Resonance Elastography in Meningiomas to Determine Intratumoral Consistency." *Neurosurgery* 77 (4): 653–59. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000000892>.
- Huston, John, Matthew C. Murphy, Bradley F. Boeve, Nikoo Fattahi, Arvin Arani, Kevin J. Glaser, Armando Manduca, David T. Jones, and Richard L. Ehman. 2016. "Magnetic Resonance Elastography of Frontotemporal Dementia." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 43 (2): 474–78. <https://doi.org/10.1002/jmri.24977>.
- Irvine, G. Brent, Omar M. El-Agnaf, Ganesh M. Shankar, and Dominic M. Walsh. 2008. "Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases." *Molecular Medicine* 14 (7): 451–64. <https://doi.org/10.2119/2007-00100.Irvine>.
- Jack, Clifford R., Michael Garwood, Thomas M. Wengenack, Bret Borowski, Geoffrey L. Curran, Joseph Lin, Gregor Adriany, Olli H. J. Gröhn, Roger Grimm, and Joseph F.

- Poduslo. 2004. “In Vivo Visualization of Alzheimer’s Amyloid Plaques by Magnetic Resonance Imaging in Transgenic Mice without a Contrast Agent.” *Magnetic Resonance in Medicine* 52 (6): 1263–71. <https://doi.org/10.1002/mrm.20266>.
- Jamin, Yann, Jessica K. R. Boulton, Jin Li, Sergey Popov, Philippe Garteiser, Jose L. Ulloa, Craig Cummings, et al. 2015. “Exploring the Biomechanical Properties of Brain Malignancies and Their Pathologic Determinants In Vivo with Magnetic Resonance Elastography.” *Cancer Research* 75 (7): 1216–24. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1997>.
- Jucker, Mathias, and Lary C. Walker. 2013. “Self-Propagation of Pathogenic Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases.” *Nature* 501 (7465): 45–51. <https://doi.org/10.1038/nature12481>.
- Jugé, Lauriane, Anne Petiet, Simon A. Lambert, Pascal Nicole, Simon Chatelin, Valerie Vilgrain, Bernard E. Van Beers, Lynne E. Bilston, and Ralph Sinkus. 2015. “Microvasculature Alters the Dispersion Properties of Shear Waves--a Multi-Frequency MR Elastography Study.” *NMR in Biomedicine* 28 (12): 1763–71. <https://doi.org/10.1002/nbm.3438>.
- Jugé, Lauriane, Alice C. Pong, Andre Bongers, Ralph Sinkus, Lynne E. Bilston, and Shaokoon Cheng. 2016. “Changes in Rat Brain Tissue Microstructure and Stiffness during the Development of Experimental Obstructive Hydrocephalus.” *PLOS ONE* 11 (2): e0148652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148652>.
- Kantarci, Kejal, Ronald C. Petersen, Bradley F. Boeve, David S. Knopman, Stephen D. Weigand, Peter C O’Brien, Maria M Shiung, et al. 2005. “DWI PREDICTS FUTURE PROGRESSION TO ALZHEIMER’S DISEASE IN AMNESTIC MILD COGNITIVE IMPAIRMENT.” *Neurology* 64 (5): 902–4. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000153076.46126.E9>.
- Kearney, Steven P., Shreyan Majumdar, Thomas J. Royston, and Dieter Klatt. 2017. “Simultaneous 3D MR Elastography of the in Vivo Mouse Brain.” *Physics in Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aa8444>.
- Klatt, Dieter, Uwe Hamhaber, Patrick Asbach, Jürgen Braun, and Ingolf Sack. 2007. “Noninvasive Assessment of the Rheological Behavior of Human Organs Using Multifrequency MR Elastography: A Study of Brain and Liver Viscoelasticity.” *Physics in Medicine and Biology* 52 (24): 7281–94. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/24/006>.
- Klatt, Dieter, Temel K. Yasar, Thomas J. Royston, and Richard L. Magin. 2013. “Sample Interval Modulation for the Simultaneous Acquisition of Displacement Vector Data in Magnetic Resonance Elastography: Theory and Application.” *Physics in Medicine and Biology* 58 (24): 8663. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/24/8663>.
- Klein, Charlotte, Elisabeth G. Hain, Juergen Braun, Kerstin Riek, Susanne Mueller, Barbara Steiner, and Ingolf Sack. 2014. “Enhanced Adult Neurogenesis Increases Brain Stiffness: In Vivo Magnetic Resonance Elastography in a Mouse Model of Dopamine Depletion.” *PLOS ONE* 9 (3): e92582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092582>.
- Knutsson, H., C. F. Westin, and G. Granlund. 1994. “Local Multiscale Frequency and Bandwidth Estimation.” In *Proceedings of 1st International Conference on Image Processing*, 1:36–40 vol.1. <https://doi.org/10.1109/ICIP.1994.413270>.
- Kofahl, Anna-Lisa, Sebastian Theilenberg, Jakob Bindl, Deniz Ulucay, Judith Wild, Sylvia Napiletzki, Birgit Schu-Schätter, et al. 2017. “Combining Rheology and MRI: Imaging Healthy and Tumorous Brains Based on Mechanical Properties.” *Magnetic Resonance in Medicine* 78 (3): 930–40. <https://doi.org/10.1002/mrm.26477>.
- Lambert, Simon A., T. Gerges, Romain Delamea, Mathilde Bigot, Hugo Dorez, P. Lombard, Vincent Semet, and M. Cabrera. 2019. “Design of a Volume MRI Coil by Metalizing 3D Printing Substrates by Electroless and/or Electroplating Processes.” Oral presented at the ISMRM 27th Annual Meeting, Montréal, Canada.

<https://submissions2.mirasmart.com/ISMRM2019/ViewSubmission.aspx?smbID=6345&validate=false>.

- Lambert, Simon A., and Ralph Sinkus. 2017. "Cardiac Magnetic Resonance Elastography (MRE)." In *Heart Mechanics - Magnetic Resonance Imaging - Advanced Techniques, Clinical Applications, and Future Trends*, CRC Press. El-Sayed H. Ibrahim.
- Lambert, Simon A., Sven Peter Näsholm, David Nordsletten, Christian Michler, Lauriane Juge, Jean-Michel Serfaty, Lynne Bilston, Bojan Guzina, Sverre Holm, and Ralph Sinkus. 2015. "Bridging Three Orders of Magnitude: Multiple Scattered Waves Sense Fractal Microscopic Structures via Dispersion." *Physical Review Letters* 115 (9): 094301. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.115.094301>.
- Lazzari, Stefano, Lucrèce Nicoud, Baptiste Jaquet, Matuada Lattuada, and Massimo Morbidelli. 2016. "Fractal-like Structures in Colloid Science." *Advances in Colloid and Interface Science* 235 (September): 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.002>.
- Lefebvre, Pauline M. 2017. "Elastographie par Résonance Magnétique : Nouvelle méthode d'acquisition fondée sur le contrôle optimal et comparaison de l'ERM avec une technique de rhéologie haute-fréquence." <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01940918>
- Lei, Yiming, Hongbin Han, Fan Yuan, Aqeel Javeed, and Yong Zhao. 2017. "The Brain Interstitial System: Anatomy, Modeling, in Vivo Measurement, and Applications." *Progress in Neurobiology, New Perspectives on Healthy Aging*, 157 (October): 230–46. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.007>.
- Lerner, Robert M., Kevin J. Parker, Jarle Holen, Raymond Gramiak, and Robert C. Waag. 1988. "Sono-Elasticity: Medical Elasticity Images Derived from Ultrasound Signals in Mechanically Vibrated Targets." In *Acoustical Imaging: Proceedings of the Sixteenth International Symposium, June 10–12, 1987*, edited by Lawrence W. Kessler, 317–27. Acoustical Imaging. Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0725-9\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0725-9_31).
- Levitt, Malcolm H. 2001. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons.
- Lewa, Czesław J. 1991. "Magnetic Resonance Imaging in the Presence of Mechanical Waves." *Spectroscopy Letters* 24 (1): 55–67. <https://doi.org/10.1080/00387019108018124>.
- Li, Bing N., Xiang Shan, Kui Xiang, Etsuko Kobayashi, Meng Wang, and Xuelong Li. 2017. "OpenMRE: A Numerical Platform for MRE Study." *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics: Systems*, 1–11. <https://doi.org/10.1109/TSMC.2017.2717481>.
- Li, Jin, Jessica K. R. Boulton, Maria Vinci, Sergey Popov, Karen Barker, Zai Ahmad, Yann Jamin, et al. 2015. "Abstract 1488: In Vivo Magnetic Resonance Elastography in Pediatric Brain Tumor Models." *Cancer Research* 75 (15 Supplement): 1488–1488. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-1488>.
- Lipp, Axel, Radmila Trbojevic, Friedemann Paul, Andreas Fehlner, Sebastian Hirsch, Michael Scheel, Cornelia Noack, Jürgen Braun, and Ingolf Sack. 2013. "Cerebral Magnetic Resonance Elastography in Supranuclear Palsy and Idiopathic Parkinson's Disease." *NeuroImage: Clinical* 3: 381–87. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.09.006>.
- Lleó, Alberto, Enrica Cavedo, Lucilla Parnetti, Hugo Vanderstichele, Sanna Kaisa Herukka, Niels Andreasen, Roberta Ghidoni, et al. 2015. "Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Trials for Alzheimer and Parkinson Diseases." *Nature Reviews Neurology* 11 (1): 41–55. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.232>.
- Lu, Yun-Bi, Kristian Franze, Gerald Seifert, Christian Steinhäuser, Frank Kirchhoff, Hartwig Wolburg, Jochen Guck, et al. 2006. "Viscoelastic Properties of Individual Glial Cells and Neurons in the CNS." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (47): 17759–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606150103>.
- Mahieu-Williamme Laurent, Sophie Gaillard, Denis Grenier, Radu Bolbos, Jean-Baptiste

- Langlois, Franck Lambertson, Sorina Camarasu-Pop, Olivier Beuf. "SNR and Volume Characterization of RF Coils: A Simple Procedure and an Automatic Post-Processing Tool for a Straightforward Comparison." 2017. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01693554>. Accessed March 14, 2019.
- Majumdar, Shreyan, and Dieter Klatt. 2017. "In Vivo Cerebral MR Elastography in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Preliminary Results." *Proceedings of the 25<sup>th</sup> Annual Meeting ISMRM, Honolulu, USA*
- Majumdar, Shreyan, Rachana Mishra, Orly Lazarov, and Dieter Klatt. 2017. "Early-Stage Analysis of Murine Models of Familial Alzheimer's Disease: Preliminary Results." *1<sup>st</sup> international MRE workshop, Berlin, Allemagne, 2017*
- Manduca, Armando, Travis E. Oliphant, Michael A. Dresner, Jilian L. Mahowald, Scott A. Kruse, Eduard Amromin, Joel P. Felmlee, James F. Greenleaf, and Richard L. Ehman. 2001. "Magnetic Resonance Elastography: Non-Invasive Mapping of Tissue Elasticity." *Medical Image Analysis* 5 (4): 237–54. [https://doi.org/10.1016/S1361-8415\(00\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S1361-8415(00)00039-6).
- Mariappan, Yogesh K, Kevin J Glaser, and Richard L Ehman. 2010. "MAGNETIC RESONANCE ELASTOGRAPHY: A REVIEW." *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)* 23 (5): 497–511. <https://doi.org/10.1002/ca.21006>.
- Mattsson, Niklas, Ulf Andreasson, Henrik Zetterberg, and Kaj Blennow. 2017. "Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease." *JAMA Neurology* 74 (5): 557–66. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.6117>.
- McGarry, Matthew D. J., Curtis L. Johnson, Bradley P. Sutton, John G. Georgiadis, Eric E. W. Van Houten, A. J. Pattison, John B. Weaver, and Keith D. Paulsen. 2015. "Suitability of Poroelastic and Viscoelastic Mechanical Models for High and Low Frequency MR Elastography." *Medical Physics* 42 (2): 947–57. <https://doi.org/10.1118/1.4905048>.
- Midroit, Maëllie, Marc Thevenet, Arnaud Fournel, Joelle Sacquet, Moustafa Bensafi, Marine Breton, Laura Chalénçon, Matthias Cavelius, Anne Didier, and Nathalie Mandairon. 2018. "Non-Imaged Based Method for Matching Brains in a Common Anatomical Space for Cellular Imagery." *Journal of Neuroscience Methods* 304 (July): 136–45. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.04.004>.
- Millward, Jason M., Jing Guo, Dominique Berndt, Jürgen Braun, Ingolf Sack, and Carmen Infante-Duarte. 2015. "Tissue Structure and Inflammatory Processes Shape Viscoelastic Properties of the Mouse Brain." *NMR in Biomedicine* 28 (7): 831–39. <https://doi.org/10.1002/nbm.3319>.
- Mougenot, Anne-Laure, Simon Nicot, Anna Bencsik, Eric Morignat, Jérémy Verchère, Latefa Lakhdar, Stéphane Legastelois, and Thierry Baron. 2012. "Prion-like Acceleration of a Synucleinopathy in a Transgenic Mouse Model." *Neurobiology of Aging* 33 (9): 2225–28. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.022>.
- Munder, Tonia, Anna Pfeffer, Stefanie Schreyer, Jing Guo, Juergen Braun, Ingolf Sack, Barbara Steiner, and Charlotte Klein. 2018. "MR Elastography Detection of Early Viscoelastic Response of the Murine Hippocampus to Amyloid  $\beta$  Accumulation and Neuronal Cell Loss Due to Alzheimer's Disease." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 47: 234–45. <https://doi.org/10.1002/jmri.25741>.
- Murphy, Matthew C., Geoffrey L. Curran, Kevin J. Glaser, Phillip J. Rossman, John Huston, Joseph F. Poduslo, Clifford R. Jack, Joel P. Felmlee, and Richard L. Ehman. 2012. "Magnetic Resonance Elastography of the Brain in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Initial Results." *Magnetic Resonance Imaging* 30 (4): 535–39. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2011.12.019>.



- Murphy, Matthew C., John Huston, and Richard L. Ehman. 2017. "MR Elastography of the Brain and Its Application in Neurological Diseases." *NeuroImage*, October. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.10.008>.
- Murphy, Matthew C., John Huston, Clifford R. Jack, Kevin J. Glaser, Armando Manduca, Joel P. Felmlee, and Richard L. Ehman. 2011. "Decreased Brain Stiffness in Alzheimer's Disease Determined by Magnetic Resonance Elastography." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 34 (3): 494–98. <https://doi.org/10.1002/jmri.22707>.
- Murphy, Matthew C., David T. Jones, Clifford R. Jack Jr., Kevin J. Glaser, Matthew L. Senjem, Armando Manduca, Joel P. Felmlee, Rickey E. Carter, Richard L. Ehman, and John Huston III. 2016. "Regional Brain Stiffness Changes across the Alzheimer's Disease Spectrum." *NeuroImage: Clinical* 10: 283–90. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.12.007>.
- Muthupillai, Raja, Derek J. Lomas, Phillip J. Rossman, James F. Greenleaf, Armando Manduca, and Richard L. Ehman. 1995. "Magnetic Resonance Elastography by Direct Visualization of Propagating Acoustic Strain Waves." *Science (New York, N.Y.)* 269 (5232): 1854–57.
- Nakada, Tsutomu, Hitoshi Matsuzawa, Hironaka Igarashi, Yukihiko Fujii, and Ingrid L. Kwee. 2008. "In Vivo Visualization of Senile-Plaque-Like Pathology in Alzheimer's Disease Patients by MR Microscopy on a 7T System." *Journal of Neuroimaging* 18 (2): 125–29. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6569.2007.00179.x>.
- Nelson, Peter T., Irina Alafuzoff, Eileen H. Bigio, Constantin Bouras, Heiko Braak, Nigel J. Cairns, Rudolph J. Castellani, et al. 2012. "Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 71 (5): 362–81. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>.
- Niedworok, Christian J., Alexander P. Y. Brown, M. Jorge Cardoso, Pavel Osten, Sebastien Ourselin, Marc Modat, and Troy W. Margrie. 2016. "AMAP Is a Validated Pipeline for Registration and Segmentation of High-Resolution Mouse Brain Data." *Nature Communications* 7 (July). <https://doi.org/10.1038/ncomms11879>.
- Oliphant, Travis E., Randall R. Kinnick, Armando Manduca, Richard L. Ehman, and James F. Greenleaf. 2000. "An Error Analysis of Helmholtz Inversion for Incompressible Shear, Vibration Elastography with Application to Filter-Design for Tissue Characterization." In *2000 IEEE Ultrasonics Symposium. Proceedings. An International Symposium (Cat. No.00CH37121)*, 2:1795–98 vol.2. <https://doi.org/10.1109/ULTSYM.2000.921671>.
- Ophir, Jonathan, Ignacio Céspedes, Hari Ponnekanti, Youseph Yazdi, and Xuexiang Li. 1991. "Elastography: A Quantitative Method for Imaging the Elasticity of Biological Tissues." *Ultrasonic Imaging* 13 (2): 111–34. <https://doi.org/10.1177/016173469101300201>.
- Organisation mondiale de la santé. 2019. "La démence." Site web institutionnel. Organisation mondiale de la santé. May 14, 2019. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
- Othman, Shadi F., Thomas Boulet, Huihui Xu, and Matthew L. Kelso. 2013. "Brain Mechanical Imaging (BMI)." In *Mechanics of Biological Systems and Materials, Volume 5*, 87–92. Conference Proceedings of the Society for Experimental Mechanics Series. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4427-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4427-5_13).
- Papazoglou, Sebastian, Uwe Hamhaber, Jürgen Braun, and Ingolf Sack. 2008. "Algebraic Helmholtz Inversion in Planar Magnetic Resonance Elastography." *Physics in Medicine and Biology* 53 (12): 3147–58. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/12/005>.
- Patz, Samuel, Navid Nazari, Paul E. Barbone, Ben Fabry, Daniel Fovargue, David Nordsletten, and Ralph Sinkus. 2017. "Functional Neuroimaging in the Brain Using Magnetic

- Resonance Elastography". *Proceedings of the 25<sup>th</sup> Annual Meeting ISMRM. Honolulu, USA*
- Perani, Daniela, Leonardo Iaccarino, Adriaan A. Lammertsma, Albert D. Windhorst, Paul Edison, Ronald Boellaard, Oskar Hansson, et al. 2019. "A New Perspective for Advanced Positron Emission Tomography–Based Molecular Imaging in Neurodegenerative Proteinopathies." *Alzheimer's & Dementia*, June. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.02.004>.
- Perrinez, Phillip R., Francis E. Kennedy, Elijah E. W. Van Houten, John B. Weaver, and Keith D. Paulsen. 2010. "Magnetic Resonance Poroelastography: An Algorithm for Estimating the Mechanical Properties of Fluid-Saturated Soft Tissues." *IEEE Transactions on Medical Imaging* 29 (3): 746–55. <https://doi.org/10.1109/TMI.2009.2035309>.
- Petiet, Alexandra, Mathieu Santin, Anne Bertrand, Christopher J. Wiggins, Fanny Petit, Diane Houitte, Philippe Hantraye, et al. 2012. "Gadolinium-Staining Reveals Amyloid Plaques in the Brain of Alzheimer's Transgenic Mice." *Neurobiology of Aging* 33 (8): 1533–44. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.009>.
- Petitprez, Karine, Michel Laurence, Sabrina Adin, Caroline Baclet-Roussel, Pierre Deblois, Thomas Broucker, Nathalie Dumoitier, et al. 2011. "Maladie d'Alzheimer et maladies apparentées : diagnostic et prise en charge - Recommandations." Haute Autorité de la Santé. [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-12/recommandation\\_maladie\\_d\\_alzheimer\\_et\\_maladies\\_apparentees\\_diagnostic\\_et\\_prise\\_en\\_charge.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-12/recommandation_maladie_d_alzheimer_et_maladies_apparentees_diagnostic_et_prise_en_charge.pdf).
- Petkova, Aneta T., Richard D. Leapman, Zhihong Guo, Wai-Ming Yau, Mark P. Mattson, and Robert Tycko. 2005. "Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Fibrils." *Science* 307 (5707): 262–65. <https://doi.org/10.1126/science.1105850>.
- Posnansky, Oleg, Jing Guo, Sebastian Hirsch, Sebastian Papazoglou, Jürgen Braun, and Ingolf Sack. 2012. "Fractal Network Dimension and Viscoelastic Powerlaw Behavior: I. A Modeling Approach Based on a Coarse-Graining Procedure Combined with Shear Oscillatory Rheometry." *Physics in Medicine and Biology* 57 (12): 4023. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/57/12/4023>.
- Riek, Kerstin, Dieter Klatt, Hassan Nuzha, Susanne Mueller, Ulf Neumann, Ingolf Sack, and Jürgen Braun. 2011. "Wide-Range Dynamic Magnetic Resonance Elastography." *Journal of Biomechanics* 44 (7): 1380–86. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.12.031>.
- Riek, Kerstin, Jason M. Millward, Isabell Hamann, Susanne Mueller, Caspar F. Pfueller, Friedemann Paul, Jürgen Braun, Carmen Infante-Duarte, and Ingolf Sack. 2012. "Magnetic Resonance Elastography Reveals Altered Brain Viscoelasticity in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *NeuroImage: Clinical* 1 (1): 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2012.09.003>.
- Rosa-Neto, Pedro, Ging-Yuek R. Hsiung, and Mario Masellis. 2012. "Fluid Biomarkers for Diagnosing Dementia : Rationale and Recommendations for Canadian Physicians." In .
- Rouvière, Olivier, Meng Yin, M. Alex Dresner, Phillip J. Rossman, Lawrence J. Burgart, Jeff L. Fidler, and Richard L. Ehman. 2006. "MR Elastography of the Liver: Preliminary Results." *Radiology* 240 (2): 440–48. <https://doi.org/10.1148/radiol.2402050606>.
- Ruoslahti, Erkki. 1996. "Brain Extracellular Matrix." *Glycobiology* 6 (5): 489–92. <https://doi.org/10.1093/glycob/6.5.489>.
- Sack, Ingolf, Bernd Beierbach, Jens Wuerfel, Dieter Klatt, Uwe Hamhaber, Sebastian Papazoglou, Peter Martus, and Jürgen Braun. 2009. "The Impact of Aging and Gender on Brain Viscoelasticity." *NeuroImage* 46 (3): 652–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.02.040>.

- Sack, Ingolf, Kaspar-Josche Streitberger, Dagmar Krefting, Friedemann Paul, and Jürgen Braun. 2011. “The Influence of Physiological Aging and Atrophy on Brain Viscoelastic Properties in Humans.” *PLOS ONE* 6 (9): e23451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023451>.
- Salameh, Najat, Line Souris, and Mathieu Sarracanie. 2011. “Feasibility of Brain MR-Elastography at 1.5 T with a Novel Wave Generator: An Animal Study.” *Proceedings of the 19<sup>th</sup> Annual Meeting ISMRM. Montréal, Canada*
- Santin, Mathieu D., Thomas Debeir, S. Lori Bridal, Thomas Rooney, and Marc Dhenain. 2013. “Fast in Vivo Imaging of Amyloid Plaques Using  $\mu$ -MRI Gd-Staining Combined with Ultrasound-Induced Blood–Brain Barrier Opening.” *NeuroImage* 79 (October): 288–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.04.106>.
- Schindler, Suzanne E., James G. Bollinger, Vitaliy Ovod, Kwasi G. Mawuenyega, Yan Li, Brian A. Gordon, David M. Holtzman, et al. 2019. “High-Precision Plasma  $\beta$ -Amyloid 42/40 Predicts Current and Future Brain Amyloidosis.” *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008081>.
- Schmidt, John L., J. Dennis Tweten, Ruth J. Okamoto, Andrew A. Badachhape, Joel R. Garbow, and Phillip V. Bayly. 2017. “Anisotropic Shear Modulus Estimation in Ex Vivo White Matter of the Brain Using Magnetic Resonance Elastography and Finite Element Modeling.” In , 25:1372. Hawaiï. <http://indexsmart.miramart.com/ISMRM2017/PDFfiles/1372.html>.
- Schmitt, Joseph M. 1998. “OCT Elastography: Imaging Microscopic Deformation and Strain of Tissue.” *Optics Express* 3 (6): 199–211. <https://doi.org/10.1364/OE.3.000199>.
- Schregel, Katharina, Navid Nazari, Michal O. Nowicki, Miklos Palotai, Sean E. Lawler, Ralph Sinkus, Paul E. Barbone, and Samuel Patz. 2017. “Characterization of Glioblastoma in an Orthotopic Mouse Model with Magnetic Resonance Elastography.” *NMR in Biomedicine* 0 (0): e3840. <https://doi.org/10.1002/nbm.3840>.
- Schregel, Katharina, Eva Wuerfel, Philippe Garteiser, Ines Gemeinhardt, Timour Prozorovski, Orhan Aktas, Hartmut Merz, Dirk Petersen, Jens Wuerfel, and Ralph Sinkus. 2012. “Demyelination Reduces Brain Parenchymal Stiffness Quantified in Vivo by Magnetic Resonance Elastography.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (17): 6650–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200151109>.
- Schwarb, Hillary, Curtis L. Johnson, Matthew D. J. McGarry, and Neal J. Cohen. 2016. “Medial Temporal Lobe Viscoelasticity and Relational Memory Performance.” *NeuroImage* 132 (May): 534–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.02.059>.
- Seelaar, Harro, Jonathan D. Rohrer, Yolande A. L. Pijnenburg, Nick C. Fox, and John C. van Swieten. 2010. “Clinical, Genetic and Pathological Heterogeneity of Frontotemporal Dementia: A Review.” *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, January, jnnp.2010.212225. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.212225>.
- Sigurdsson, Einar M., Youssef Z. Wadghiri, Lisa Mosconi, Jeffrey A. Blind, Elin Knudsen, Ayodeji Asuni, Henrieta Scholtzova, et al. 2008. “A Non-Toxic Ligand for Voxel-Based MRI Analysis of Plaques in AD Transgenic Mice.” *Neurobiology of Aging* 29 (6): 836–47. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.12.018>.
- Simon, M., Jing Guo, Sebastian Papazoglou, H. Scholand-Engler, C. Erdmann, U. Melchert, M. Bonsanto, et al. 2013. “Non-Invasive Characterization of Intracranial Tumors by Magnetic Resonance Elastography.” *New Journal of Physics* 15 (8): 085024. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/8/085024>.
- Sinkus, Ralph, Michael Tanter, Stefane Catheline, Jörn Lorenzen, Christianne Kuhl, Elke Sondermann, and M. Fink. 2005. “Imaging Anisotropic and Viscous Properties of Breast Tissue by Magnetic Resonance-Elastography.” *Magnetic Resonance in Medicine* 53 (2): 372–87. <https://doi.org/10.1002/mrm.20355>.



- Sinkus, Ralph, Simon Lambert, Khaled Z. Abd-Elmoniem, Caryn Morse, Theo Heller, Christian Guenther, Ahmed M. Ghanem, Sverre Holm, and Ahmed M. Gharib. 2018. “Rheological Determinants for Simultaneous Staging of Hepatic Fibrosis and Inflammation in Patients with Chronic Liver Disease.” *NMR in Biomedicine* 31 (10): e3956. <https://doi.org/10.1002/nbm.3956>.
- Sinkus, Ralph, Katja Siegmann, Tanja Xydeas, Mickael Tanter, Claus Claussen, and Mathias Fink. 2007. “MR Elastography of Breast Lesions: Understanding the Solid/Liquid Duality Can Improve the Specificity of Contrast-Enhanced MR Mammography.” *Magnetic Resonance in Medicine* 58 (6): 1135–44. <https://doi.org/10.1002/mrm.21404>.
- Smith, Jeffrey F., Tuomas P. J. Knowles, Christopher M. Dobson, Cait E. MacPhee, and Mark E. Welland. 2006. “Characterization of the Nanoscale Properties of Individual Amyloid Fibrils.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (43): 15806–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604035103>.
- Sperling, Reisa A., Paul S. Aisen, Laurel A. Beckett, David A. Bennett, Suzanne Craft, Anne M. Fagan, Takeshi Iwatsubo, et al. 2011. “Toward Defining the Preclinical Stages of Alzheimer’s Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer’s Disease.” *Alzheimer’s & Dementia : The Journal of the Alzheimer’s Association* 7 (3): 280–92. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003>.
- Spottiswoode, B. S., X. Zhong, A. T. Hess, C. M. Kramer, E. M. Meintjes, B. M. Mayosi, and F. H. Epstein. 2007. “Tracking Myocardial Motion From Cine DENSE Images Using Spatiotemporal Phase Unwrapping and Temporal Fitting.” *IEEE Transactions on Medical Imaging* 26 (1): 15–30. <https://doi.org/10.1109/TMI.2006.884215>.
- Streitberger, Kaspar-Josche, Martin Reiss-Zimmermann, Florian Baptist Freimann, Simon Bayerl, Jing Guo, Felix Arlt, Jens Wuerfel, Jürgen Braun, Karl-Titus Hoffmann, and Ingolf Sack. 2014. “High-Resolution Mechanical Imaging of Glioblastoma by Multifrequency Magnetic Resonance Elastography.” *PLOS ONE* 9 (10): e110588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110588>.
- Streitberger, Kaspar-Josche, Ingolf Sack, Dagmar Krefting, Caspar Pfüller, Jürgen Braun, Friedemann Paul, and Jens Wuerfel. 2012. “Brain Viscoelasticity Alteration in Chronic-Progressive Multiple Sclerosis.” *PloS One* 7 (1): e29888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029888>.
- Teipel, Stefan, Alexander Drzezga, Michel J Grothe, Henryk Barthel, Gaël Chételat, Norbert Schuff, Pawel Skudlarski, et al. 2015. “Multimodal Imaging in Alzheimer’s Disease: Validity and Usefulness for Early Detection.” *The Lancet Neurology* 14 (10): 1037–53. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00093-9).
- Tzschätzsch, Heiko, Jing Guo, Florian Dittmann, Sebastian Hirsch, Eric Barnhill, Korinna Jöhrens, Jürgen Braun, and Ingolf Sack. 2016. “Tomoelastography by Multifrequency Wave Number Recovery from Time-Harmonic Propagating Shear Waves.” *Medical Image Analysis* 30 (May): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.media.2016.01.001>.
- Valtorta, Davide, and Edoardo Mazza. 2006. “Measurement of Rheological Properties of Soft Biological Tissue with a Novel Torsional Resonator Device.” *Rheologica Acta* 45 (5): 677. <https://doi.org/10.1007/s00397-005-0026-6>.
- Van Reeth, Eric, Pauline M. Lefebvre, Hélène Ratiney, Simon A. Lambert, Michael Tesch, Elisabeth Brusseau, Denis Grenier, et al. 2018. “Constant Gradient Elastography with Optimal Control RF Pulses.” *Journal of Magnetic Resonance* 294 (September): 153–61. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.07.013>.
- Vappou, Jonathan, Elodie Breton, Philippe Choquet, Rémy Willinger, and André Constantinesco. 2008. “Assessment of in Vivo and Post-Mortem Mechanical Behavior of Brain Tissue Using Magnetic Resonance Elastography.” *Journal of Biomechanics* 41 (14): 2954–59. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.07.034>.

- Verdier, Claude. 2003. "Rheological Properties of Living Materials. From Cells to Tissues." *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 5 (2): 67–91. <https://doi.org/10.1080/10273360410001678083>.
- Verdurand, Mathieu, Fabien Chauveau, Alexia Daoust, Anne-Laure Morel, Frédéric Bonnefoi, François Liger, Anne Bérod, and Luc Zimmer. 2016. "Differential Effects of Amyloid-Beta 1–40 and 1–42 Fibrils on 5-HT1A Serotonin Receptors in Rat Brain." *Neurobiology of Aging* 40 (April): 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.12.008>.
- Verdurand, Mathieu, Elise Levigoureux, Wael Zeinyeh, Laurent Berthier, Meriem Mendjel-Herda, Florence Cadarossanesaib, Caroline Bouillot, et al. 2018. "In Silico, in Vitro, and in Vivo Evaluation of New Candidates for  $\alpha$ -Synuclein PET Imaging." *Molecular Pharmaceutics* 15 (8): 3153–66. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00229>.
- Vrselja, Zvonimir, Stefano G. Daniele, John Silbereis, Francesca Talpo, Yury M. Morozov, André M. M. Sousa, Brian S. Tanaka, et al. 2019. "Restoration of Brain Circulation and Cellular Functions Hours Post-Mortem." *Nature* 568 (7752): 336–43. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1099-1>.
- Wadghiri, Youssef Zaim, Jialin Li, Jinhuan Wang, Dung Minh Hoang, Yanjie Sun, Hong Xu, Wai Tsui, et al. 2013. "Detection of Amyloid Plaques Targeted by Bifunctional USPIO in Alzheimer's Disease Transgenic Mice Using Magnetic Resonance Microimaging." *PloS One* 8 (2): e57097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057097>.
- Weickenmeier, Johannes, Mehmet Kurt, Efe Ozkaya, Max Wintermark, Kim Butts Pauly, and Ellen Kuhl. 2017. "Magnetic Resonance Elastography of the Brain: A Comparison between Pigs and Humans." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, August. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.08.029>.
- Wuerfel, Jens, Friedemann Paul, Bernd Beierbach, Uwe Hamhaber, Dieter Klatt, Sebastian Papazoglou, Frauke Zipp, Peter Martus, Jürgen Braun, and Ingolf Sack. 2010. "MR-Elastography Reveals Degradation of Tissue Integrity in Multiple Sclerosis." *NeuroImage* 49 (3): 2520–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.06.018>.
- Xiang, Kui, Xia Li Zhu, Chang Xin Wang, and Bing Nan Li. 2013. "MREJ: MRE Elasticity Reconstruction on ImageJ." *Computers in Biology and Medicine* 43 (7): 847–52. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2013.04.005>.
- Yamakoshi, Yoshiki, J. Sato, and T. Sato. 1990. "Ultrasonic Imaging of Internal Vibration of Soft Tissue under Forced Vibration." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 37 (2): 45–53. <https://doi.org/10.1109/58.46969>.
- Yasar, Temel K., Thomas J. Royston, and Richard L. Magin. 2013. "Wideband MR Elastography for Viscoelasticity Model Identification." *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 70 (2): 479–89. <https://doi.org/10.1002/mrm.24495>.
- Yin, Ziying, Steven P. Kearney, Richard L. Magin, and Dieter Klatt. 2017. "Concurrent 3D Acquisition of Diffusion Tensor Imaging and Magnetic Resonance Elastography Displacement Data (DTI-MRE): Theory and in Vivo Application." *Magnetic Resonance in Medicine* 77 (1): 273–84. <https://doi.org/10.1002/mrm.26121>.
- Yue, Jin Long, Marion Tardieu, Felicia Julea, Tanguy Boucneau, Ralph Sinkus, Claire Pellot-Barakat, and Xavier Maître. 2017. "Acquisition and Reconstruction Conditions in Silico for Accurate and Precise Magnetic Resonance Elastography." *Physics in Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aa9164>.
- Zheng, YanPeng, JinSheng He, and Tao Hong. 2010. "Biomarkers of Alzheimer's Disease in Body Fluids." *Science China Life Sciences* 53 (4): 490–96. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-0081-9>.

Zorgani, Ali, Rémi Souchon, Au-Hoang Dinh, Jean-Yves Chapelon, Jean-Michel Ménager, Samir Lounis, Olivier Rouvière, and Stefan Catheline. 2015. “Brain Palpation from Physiological Vibrations Using MRI.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (42): 12917–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509895112>.