



Doctoral Thesis

Functional brain connectivity in rodents: technology, disease models and pharmacological modulations

Author(s):

Hankov, Georges

Publication Date:

2019

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000380404> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH N° 26218

**Functional brain connectivity in rodents: technology, disease models
and pharmacological modulations**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

GEORGES HANKOV

M. Sc. & M. Res, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, France

born on 07.09.1988

citizen of France

accepted on the recommendation of

Prof. Markus Rudin, examiner

Prof. Markus von Kienlin, co-examiner

Prof. Klaas Enno Stephan, co-examiner

2019

Summary

Functional magnetic resonance imaging (fMRI) has become an important technique for exploring brain function in healthy and disease conditions, in both humans and animals. While human fMRI has been long studied, the number of small animal imaging studies has started growing only recently. In that context, fMRI experiments in rodents have typically adopted methods that worked well in humans without exploring their fundamental differences and whether other approaches might be better suited.

The goal of the thesis was to first define an optimal methodology to acquire fMRI data and achieve the best compromise between Blood Oxygenation Level Dependent (BOLD) sensitivity, temporal stability and susceptibility to distortions for small animal imaging. The second objective was to validate the developed method in various fMRI applications in rats as well as in mice and test its sensitivity to depict changes upon pharmacological modulations. These applications mainly include stimulus evoked fMRI and particularly resting-state fMRI.

As suggested by some literature reports, we first implemented the Principle of Echo-Shifting with a train of observation (PRESTO) pulse sequence and tested its potential for fMRI in rodents. Despite some advantages related to its 3D scheme and the shorter echo train length, the method resulted in insufficient signal-to-noise ratio to detect BOLD signals unless it was combined with a cryogenically cooled receiver coil instead of the commonly used room temperature one.

As another alternative, we explored the use of 2-, 3-, 4- or 8-segments echo-planar imaging (EPI) and compared it to commonly used single shot version. We furthermore tried to understand the interplay between the different parameters (repetition time, echo time, slice thickness, flip angle, partial-Fourier acceleration, saturation slices, ghost correction methods, etc.) and their impact on signal stability. As such, we explored the parameter space for small animal fMRI and defined a set of parameters that we considered as optimal for rats and another one optimal for mice studies. Even if our results suggest that two or three shots EPI is a viable alternative to the conventional single shot EPI for some applications (those seeking higher geometric fidelity), we concluded that single shot EPI provides

advantages that make the method still superior especially for resting-state fMRI (e.g. very fast temporal resolution, higher SNR and SNR_t, less susceptible to ghosting artifacts).

In a second part, we tested the capabilities of this set of optimized parameters to reliably detect BOLD signals in response to the presence (se-fMRI) or the absence (rs-fMRI) of a stimulus. We first tested the ability of the sequence to monitor the BOLD response to electrical stimulation and then visual stimulation in rats. The results showed that the selected parameters are reliable enough to detect robust and reproducible BOLD responses, particularly to visual stimulations. Then, we evaluated in a small experiment making use of 7 rats, the ability of the method to measure BOLD low frequency fluctuations with a high quality so that signal correlation between different regions can be best characterized and functional connectivity can be robustly studied. The results of this experiment, which is in accordance with the literature, highlighted a strong isocortical hub where most cortical regions are functionally connected to each other. Besides this one, we also confirmed the existence of another hub between the different parts of the striatum and the isocortex.

Given that the methodology seemed to be working well in rats, we then chose a set of parameters for mice, built on the conclusions made in the first part of this thesis. Since we were also interested in assessing the sensitivity of the method to detect functional connectivity changes upon pharmacological modulations, we designed a treatment study in a mouse model of demyelination. The aim was to see if we can characterize the functional organization of the brain in this model in the first place and then in a second place detect changes upon the use of a compound which has shown previously some remyelinating potential. In addition to fMRI, our imaging protocol consisted of high resolution T2-weighted imaging, diffusion tensor imaging sequences as well as magnetic resonance spectroscopy. The experiment lasted 12 weeks (6 weeks of demyelination and 6 weeks of remyelination) during which 36 animals were imaged first at baseline and then every three weeks. The different readouts used in our protocol helped us verify the good implementation of the model and also allowed us to link our results to previous studies looking at T2-weighted images and diffusion based parameters in this same model. After confirming these results, we extended our findings to the cerebellum and found a specific fingerprint of the cerebellum undergoing de- and remyelination.

Finally, we explored the functional network dynamics of the demyelinating brain. Overall, we found an increase in the level of BOLD fluctuations' synchronicity between left and right hemisphere, that was already visible 3 weeks after the start of the study. Regions from the isocortex, thalamus and hippocampus were the first ones to be affected, followed by different parts of the midbrain region. This increase in correlation coefficients and this loss of network-like feature was further enhanced in the subsequent imaging sessions, in a nonspecific manner, targeting the whole brain. Despite the literature around clemastine, we did not observe any signs that could hint towards its remyelinating potential in that particular experimental design. Nevertheless, our method appeared to be sufficiently sensitive to reliably detect BOLD low frequency fluctuations and allow for reliable connectivity analysis.

Finally, as none of the explored pulse sequences tested in the first part of this thesis could combine high temporal stability with high geometric fidelity, we implemented and tested a method that consisted of filling the animal's ear cavities (main reason for the signal dropouts in ventral parts of the brain imaged with EPI techniques) with an innovative thermoreversible material. Indeed, the substance is liquid at room temperature and quickly jellifies at physiological temperatures, making the whole procedure fast, convenient and suitable for longitudinal studies. By replacing the air in the ear canals with a water based solution, we managed to image the brain with a very high geometrical fidelity combined with a very high temporal signal stability. The so-acquired resting-state fMRI data unveiled a strong bilateral independent component originating from the newly recovered amygdala network and proved to be reproducible through a test-retest analysis performed a week later.

Overall, we first explored in this work the parameter space for rodent fMRI and despite finding PRESTO unsuitable for most fMRI applications, we defined an optimized set of parameters for single-shot EPI which we eventually validated in various fMRI studies. For applications that truly need high geometrical fidelity, we also proposed and validated the use of Poloxamer to fill out the air cavities in the ear and recover signals from deep ventral areas of the brain, otherwise inaccessible.

Résumé

L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) est devenue une technique importante pour explorer la fonction cérébrale dans des conditions saines et pathologiques, tant chez l'homme que chez l'animal. Bien que l'IRMf ait longtemps été étudiée chez l'homme, l'imagerie chez le petit animal ne s'est développée que récemment. Par conséquent, les études chez les rongeurs ont typiquement adopté les méthodes qui ont bien fonctionnées chez l'homme, sans vraiment explorer les différences fondamentales et déterminer si d'autres approches pouvaient être mieux adaptées.

Le but de cette thèse était de tout d'abord définir une méthodologie optimale pour acquérir les données IRMf chez le petit animal, tout en cherchant à trouver le meilleur compromis possible entre la sensibilité à l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependant), la stabilité temporelle et la sensibilité aux distorsions liées à l'inhomogénéité du champ magnétique. Le deuxième objectif était de valider la méthode développée dans diverses applications d'IRMf chez le rat comme chez la souris et de tester si la méthode est appropriée pour mesurer des changements de connection cérébrale fonctionnelle liés à l'utilisation de substances pharmacologiques.

D'après quelques suggestions provenant de la littérature, nous avons tout d'abord implémenté la méthode PRESTO (Principle of Echo-Shifting with a Train of Observations) et testé son potentiel en IRMf. Malgré certains avantages liés à son schéma d'acquisition 3D et à la longueur plus courte du train d'écho, la méthode a abouti à un rapport signal sur bruit insuffisant pour détecter les signaux BOLD, sauf si l'on utilise une antenne cryogénisée à la place de l'antenne de réception standard.

En guise d'alternative, nous avons exploré l'utilisation de l'imagerie EPI à 2, 3, 4 ou 8 segments et nous l'avons comparé à la version courante en single-shot. Nous avons également essayé de comprendre l'interaction entre les différents paramètres (temps de répétition, temps d'écho, épaisseur des tranches, angle d'excitation, accélération partielle de Fourier, tranches de saturation, correction des ghosts, etc.) et leur impact sur la stabilité du signal. En tant que tel, nous avons exploré l'espace des paramètres pour l'IRMf des petits animaux et défini un ensemble de paramètres que nous avons

considérés comme optimal pour les rats et un autre optimal pour les souris. Même si nos résultats suggèrent que l'EPI à deux ou trois segments est une alternative viable à l'EPI classique pour certaines applications (celles qui recherchent une fidélité géométrique plus élevée), nous avons conclu que le single-shot EPI offre des avantages qui rendent la méthode encore supérieure, en particulier pour le resting-state IRMf (par exemple, résolution temporelle très rapide, SNR et SNRt supérieurs, moins susceptibles aux phénomènes de ghosting).

Dans une seconde partie, nous avons testé les capacités de cet ensemble de paramètres optimisés pour détecter de manière fiable les signaux BOLD en réponse à la présence (se-fMRI) ou à l'absence (rs-fMRI) d'un stimulus. Nous avons d'abord testé la capacité de la séquence à monitorer la réponse BOLD à la stimulation électrique, puis la stimulation visuelle chez le rat. Les résultats ont montré que les paramètres choisis sont suffisamment fiables pour détecter une réponse BOLD robuste et reproductible, en particulier pour la stimulation visuelle. Par la suite, nous avons évalué dans une petite expérience utilisant 7 rats, l'aptitude de la méthode à mesurer les fluctuations de basse fréquence BOLD avec une qualité élevée pour que la corrélation des signaux entre différentes régions du cerveau puisse être mieux caractérisée et que la connectivité fonctionnelle entre ces régions puisse être étudiée de manière robuste. Les résultats de cette expérience, qui par ailleurs confirment ce que l'on retrouve dans la littérature, ont mis en évidence une forte connexion néocorticale où la plupart des régions du cortex se retrouvent fonctionnellement connectées les unes aux autres.

Étant donné que la méthodologie semblait bien fonctionner chez le rat, nous avons ensuite choisi un ensemble de paramètres adaptés à la souris, reposant sur les conclusions de la partie précédente. Puisque nous voulions également juger de la sensibilité de la méthode pour détecter les changements de connectivité fonctionnelle due à des modulations pharmacologiques, nous avons conçu une étude pharmacologique dans un modèle murin de démyélinisation. Le but étant de voir s'il était possible de caractériser d'abord l'organisation fonctionnelle du cerveau dans ce modèle, puis de détecter ensuite les changements survenus lors de l'utilisation d'un composé ayant déjà montré un potentiel de remyélinisation. En plus de l'IRMf, notre protocole d'imagerie comprenait une imagerie de haute

résolution pondérée en T2, une séquence d'imagerie du tenseur de diffusion ainsi qu'une séquence de spectroscopie. L'expérience a duré 12 semaines (6 semaines de démyélinisation et 6 semaines de remyélinisation), au cours desquelles 36 animaux ont été mesurés au début de l'étude, puis toutes les trois semaines. Les différentes mesures utilisées dans notre protocole nous ont permis de vérifier la bonne mise en œuvre de notre modèle animal et nous ont également permis de relier nos résultats à des études antérieures portant sur les images pondérées en T2 et les paramètres basés sur la diffusion. Après confirmation de ces résultats, nous avons étendu nos découvertes au cervelet et trouvé une empreinte spécifique du cervelet en cours de dé et de remyélinisation. Nous avons ensuite exploré la dynamique du réseau fonctionnel du cerveau démyélinisant. Dans l'ensemble, nous avons constaté une augmentation du niveau de synchronicité des fluctuations de BOLD entre les hémisphères gauche et droit, qui était déjà visible 3 semaines après le début de l'étude. Les régions de l'isocortex, du thalamus et de l'hippocampe ont été les premières affectées, suivies par différentes zones du mésencéphale. Cette augmentation des coefficients de corrélation et cette perte de caractéristique de type réseau ont été encore accentuées lors des sessions d'imagerie suivantes, d'une manière non spécifique, ciblant l'ensemble du cerveau. En dépit d'un fort potentiel de remyélinisation, le fumarate de clémastine ne présentait aucun signe susceptible de faire penser à la promotion de la remyélinisation dans ce modèle animal particulier. Néanmoins, notre méthode semble être suffisamment sensible pour détecter de manière fiable les fluctuations de BOLD et permettre une analyse de connectivité.

Enfin, comme aucune des séquences IRM explorées dans la première partie de cette thèse n'était en mesure de combiner une stabilité temporelle élevée à une fidélité géométrique élevée, nous avons développé et testé une méthode consistant à remplir les cavités des oreilles de l'animal (parties du cerveau imagées avec les techniques EPI responsables des pertes de signal dans la région ventrale) avec un matériau thermoréversible. En effet, la substance est liquide à la température ambiante et se gélifie rapidement à température physiologique, ce qui rend l'ensemble de la procédure rapide, pratique et adaptée aux études longitudinales. En remplaçant l'air dans les conduits auditifs par une solution à base d'eau, nous avons réussi à imager le cerveau avec une fidélité géométrique très

élevée, associée à une très grande stabilité du signal temporel. Les données resting-state ainsi acquises ont révélé une composante bilatérale issue du réseau d'amygdale (typiquement masqué par les distorsions géométriques liées à la méthode EPI). Lorsque les animaux ont été imagés une semaine plus tard, nous avons pu retrouver le signal provenant de l'amygdale avec grande fidélité et reproductibilité.

Dans l'ensemble, nous avons tout d'abord exploré dans cet ouvrage l'espace des paramètres pour l'IRMf dédié aux rongeurs. Malgré le fait que PRESTO ne convenait pas à la plupart des applications de l'IRMf, nous avons implémenté un ensemble optimisé de paramètres pour le single-shot EPI que nous avons finalement validé dans diverses études d'IRMf.

Pour les applications nécessitant une haute-fidélité géométrique, nous avons également proposé et validé l'utilisation du Poloxamer pour combler les cavités d'air situées dans l'oreille interne et récupérer les signaux BOLD des zones ventrales profondes du cerveau, autrement inaccessibles.