

# Le neurostéroïde neuroactif Dehydroépiandrosterone Sulfate (DHEAS) module le système sérotoninergique dans le noyau dorsal de Raphe et la libération de liquide céphalo- rachidien de la fibre de Reissner chez le rat

Comptes Rendus Biologies 343 (2020) 101-110.

Omar El Hiba ; Ahmed Draoui ; Halima Gamrani

(traduction post-éditée par N. Bacaër, suggestions d'amélioration : nicolas.bacaer@ird.fr)



## Résumé

La Dehydroépiandrosterone sulfate (DHEAS) exerce des fonctions importantes dans le système nerveux central comme la modulation de la mort neuronale, le développement du cerveau, la cognition et le comportement. Cependant, très peu est connu concernant l'interaction de cette stéroïde avec les cellules gliales, en particulier celles formant les organes circumventriculaires (CVOs). La présente étude, d'une part, s'est focalisée sur l'évaluation du possible effet de la DHEAS sur l'organe sous commissural (SCO) chez le rat connu en tant qu'un des CVOs. L'organe sous commissural peut libérer une glycoprotéine de grand poids moléculaire nommée fibre de Reissner (RF) dans le liquide céphalorachidien (CSF) ; une activité sécrétoire remarquable. D'autre part, nous avons examiné l'innervation sérotoninergique du noyau de Raphé dorsal (DRN) et l'éventuelle innervation du SCO. Nos données ont révélé une élévation significative de l'immunoréactivité à la RF dans le SCO après une seule injection i.p de la DHEAS à une dose de 5mg/kg B.W. une réduction de sérotonine (5-HT) dans le DRN et les fibres atteignant le SCO a été aussi observée. Les présentes données ont apporté une évidence d'un possible potentiel modulateur des neurostéroïdes, en particulier la DHEAS sur l'activité sécrétoire du SCO. Cette étude pourra ouvrir une nouvelle fenêtre pour une meilleure compréhension du rôle et de l'interaction des neurostéroïdes avec un des organes circumventriculaires les plus importants du cerveau des mammifères.

## Faits saillants de la recherche

- Le sulfate de déhydroépiandrosterone (DHEAS) est l'un des neurostéroïdes les plus importants pour moduler l'activité neuronale.
- DHEAS modifie l'activité sécrétoire du SCO et augmente les quantités de fibres du Reissner probablement via une modulation des innervations sérotoninergiques du SCO.

## 1. Introduction

Le concept de neurostéroïdes a été attribué concernant l'origine de la synthèse ou de la production. Ces molécules sont reconnues comme modulateurs des activités neuronales et classées en deux types: les stéroïdes exogènes (synthétiques) et endogènes. Ce dernier est subdivisé en type hormonal (produit par les glandes endocrines) et neurostéroïdes (produit par le tissu nerveux) [ 1 ], en particulier dans les cellules neuronales et gliales [ 2 ]. Des travaux antérieurs ont montré que le neurostéroïde neuroactif déhydroépiandrosterone (DHEA) est présent dans le tissu cérébral indépendamment de son origine périphérique [ 3 ]. Les enzymes nécessaires à la biosynthèse de la DHEA ont également été trouvées dans le cerveau [ 4 , 5 ], à la fois dans les astrocytes [ 6 , 7 ] et les neurones [ 8 , 9 ]. De plus, la DHEA et son ester

sulfate (DHEAS) pourraient exercer des fonctions importantes dans le système nerveux telles que la modulation de la mort et de la survie neuronales [ 10 , 11 , 12 ], le développement cérébral [ 13 ], la cognition [ 14 , 15 ] et le comportement [ 16 , 17 , 18 ]. Les effets de la DHEA et de la DHEAS sur le système nerveux sont en partie médiés par la modulation de plusieurs systèmes de neurotransmetteurs, tels que le dopaminergique [ 19 , 20 , 21 ], le glutamatergique [ 11 , 22 ] systèmes sérotoninergiques [ 19 , 23 ] et GABAergiques [ 24 , 25 ]. Sur la base de la littérature, nos connaissances sur les effets des neurostéroïdes sur les cellules gliales sont encore très faibles, même sur celles constituant les organes circonventriculaires, en particulier l'organe sous-commissural (SCO). Ce dernier est connu comme un organe sécrétoire situé à l'entrée de l'aqueduc cérébral sous la commissure postérieure. Cette glande cérébrale libère des glycoprotéines de poids moléculaire élevé dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) où elles s'agrègent pour former la fibre de Reissner (RF) [ 26 ]. Plusieurs rôles ont été proposés pour cette glande comme l'homéostasie de l'eau [ 27 , 28], survie neuronale [ 29 ], détoxification [ 30 ], clairance des monoamines dans le LCR [ 31 ], lordose [ 32 ], dans la physiopathologie de l'hydrocéphalie [ 33 ] et éventuellement de l'encéphalopathie hépatique [ 34 ]. Des travaux antérieurs ont montré que le SCO reçoit plusieurs innervations neuronales de nature GABAergique [ 35 , 36 ], noradrénergique et dopaminergique [ 27 ] et sérotoninergique [ 28 , 34 , 37 ]. Ce dernier est le système le plus influent sur l'activité sécrétoire du SCO chez différentes espèces de mammifères [ 34 , 38 , 39 , 40 , 41 ]. Ainsi, nous avons cherché, tout au long de la présente enquête, à tester les effets modulateurs possibles du neurostéroïde DHEAS sur l'activité sécrétoire du SCO chez le rat normal, ainsi que l'évaluation de l'expression de la sérotonine dans le noyau du raphé dorsal et les fibres innervantes atteignant le SCO dans les mêmes conditions expérimentales, au moyen d'une approche immunohistochimique.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Animaux et traitement de la toxicomanie**

Toutes les expériences ont été réalisées chez le rat Sprague Dewley mâle adulte logé à température ambiante constante (25 ° C), avec un cycle de lumière obscure de 12 h avec libre accès à la nourriture dans tous les groupes étudiés. Les rats ont été traités conformément aux directives de l'Université Cadi Ayyad, Marrakech (Maroc). Toutes les procédures étaient conformes au décret européen, relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation de projets utilisant des animaux pour des procédures expérimentales, 1er février 2013, NOR: AGRG1238767A. Ainsi, tous les efforts ont été faits pour minimiser le nombre d'animaux et la souffrance.

Les animaux ont été divisés en 2 groupes: le premier des témoins salins ( n = 5) avec une seule injection de tampon physiologique salin (NaCl 0,9%. Ip), tandis que dans l'autre groupe ( n = 5) les rats ont été soumis à une seule injection. injection intrapéritonéale avec le neurostéroïde DHEAS (5 mg / kg de poids corporel) acheté auprès de Sigma (Oakville, ON, Canada). Les expériences ont été faites le matin entre 10 h et 12 h.

### **2.2. Immunohistochimie**

30 min après l'injection, suffisamment pour que la DHEAS franchisse la barrière hémato-encéphalique et induise ses effets centraux [ 42 ], les rats de chaque groupe ont été anesthésiés par voie intrapéritonéale avec du pentobarbital sodique (40 mg / kg. Ip) et perfusés par voie transcardiaque avec une solution saline physiologique réfrigérée et du paraformaldéhyde. (4%) dans du tampon phosphate (PBS, 0,1 M, pH 7,4). Les cerveaux ont été post-fixés dans la même nuit de four fixatif à 4 ° C, déshydratés dans des solutions d'éthanol graduées (50 à 100%), passés à travers des solutions de polyéthylène glycol (PEG) en série et incorporés dans du PEG pur. Coupes frontales (20 µm) ont été coupés avec un microtome, collectés et rincés dans du PBS pour laver le fixateur. Des coupes ont été réalisées dans tout le SCO et le noyau du raphé dorsal (DRN) et un immunomarquage a été réalisé sur six coupes sélectionnées. Les coupes flottantes libres ont été incubées dans des anticorps RF 5-HT ou polyclonaux [ 29] respectivement, dilué au 1/1000 dans du PBS contenant 0,3% de Triton X-100 et 1% de sérum albumine bovine. Après trois lavages dans le même tampon, les coupes ont été incubées pendant 2 h à température ambiante dans des immunoglobulines de chèvre anti-lapin biotinylées (1/1000, Dako, Copenhague, Danemark) puis, après lavage, incubées dans de la streptavidine peroxydase (1/2000; Dako, Copenhague, Danemark). L'activité de la peroxydase a été révélée en incubant des coupes dans 0,03% de DAB (3-3-diaminobenzidine, Sigma, Oakville, Canada) dans un tampon Tris 0,05 M, pH 7,5, contenant 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les coupes ont ensuite été collectées, déshydratées et

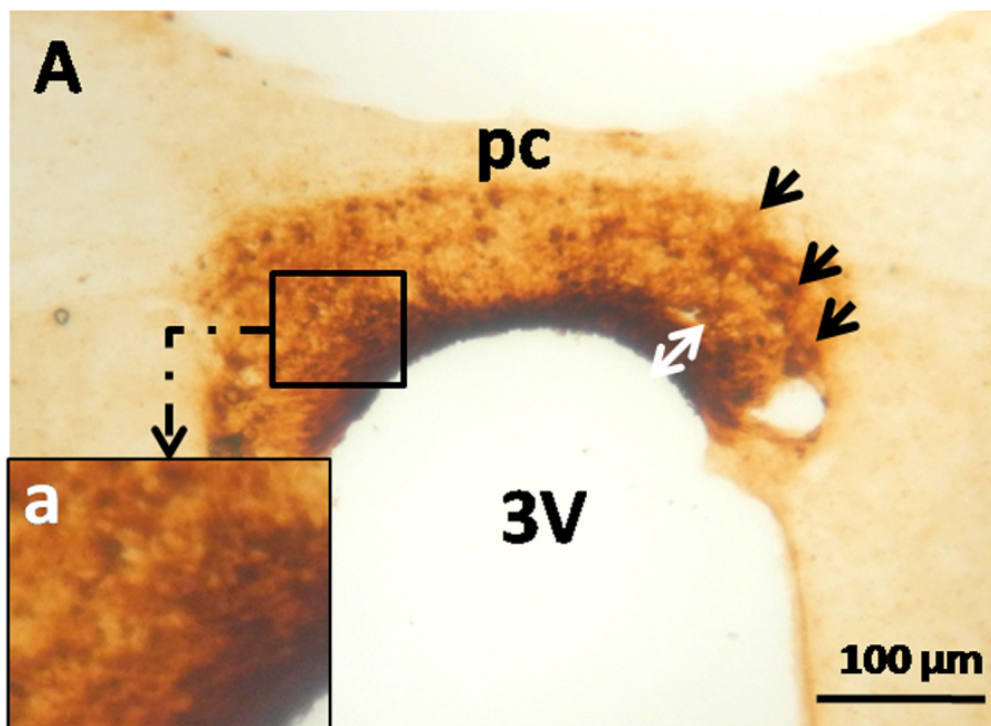
montées dans Eukit pour une observation en microscopie optique. La spécificité des matériaux immunoréactifs a été testée suite à la soumission des lames au même protocole immunohistochimique décrit ci-dessus soit en utilisant le sérum préimmun soit en omettant les anticorps primaires. Ces tests ont montré que les anticorps primaires utilisés contre les RF et la 5-HT présentent un marquage spécifique [ 34 ]. La quantification des matériaux immunoréactifs a été réalisée selon le protocole publié par Vilaplana et Lavielle 1999 [ 43]. En bref, la numérisation et le stockage des images ont été réalisés à l'aide d'un microscope Zeiss-Axioskop 40 équipé d'un appareil photo numérique Canon. Les images ont été numérisées en 512/512 pixels avec huit bits de résolution de gris et ont été stockées au format TIFF. Le traitement et la quantification des images ont été effectués à l'aide d'Adobe Photoshop v.6.0. Après transformation de chaque image en mode binaire, les pourcentages de pixels noirs ont été obtenus à l'aide de l'option d'histogramme d'image d'Adobe Photoshop. Ce pourcentage correspond aux zones immunopositives des fibres de Reissner dans tout le SCO, y compris les parties apicale et basale ou la zone immunoréactive 5-HT dans la partie basale entourant le SCO ou la partie médiane du noyau du raphé et les fibres s'étendant à l'extérieur de l'organe. Cinq sections de témoins salins et de rats DHEAS ont été choisies au hasard pour la quantification. La spécificité des matériaux immunoréactifs a été testée après soumission des lames à la même procédure immunohistochimique que celle décrite ci-dessus et en utilisant le sérum pré-immun ou en omettant les anticorps primaires. Ces tests ont montré que les anticorps primaires utilisés contre la 5-HT et la RF affichent un marquage spécifique comme cela a été publié précédemment [28, 34].

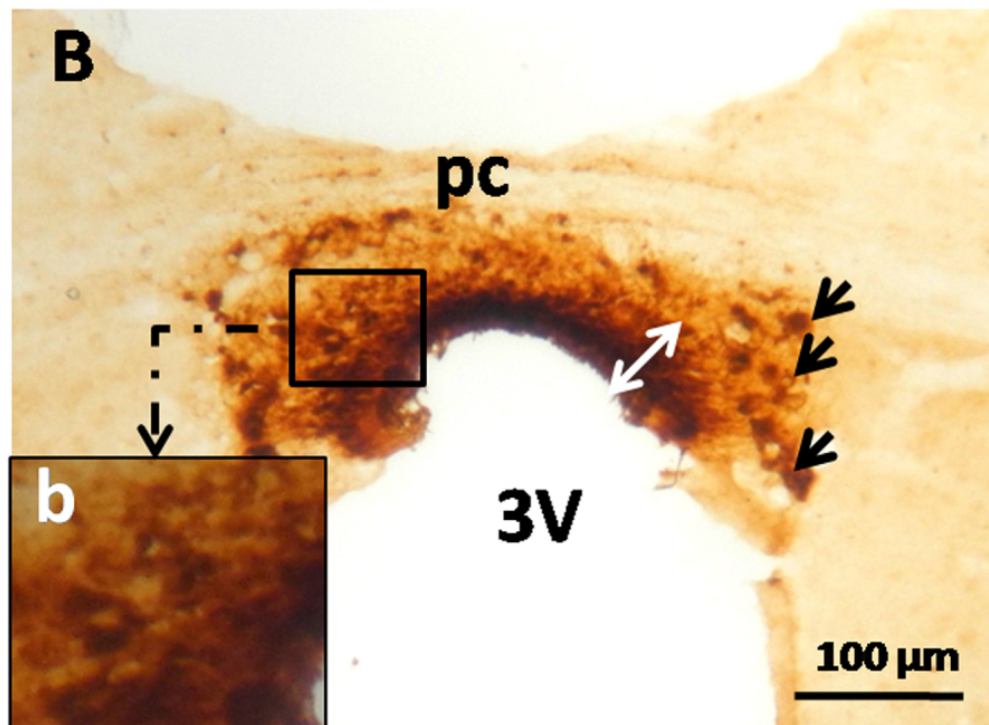
### 2.3. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM et ont été soumises au test de Student T. Une valeur de  $P < 0,05$  a été considérée comme indiquant une signification statistique entre les témoins et le groupe DHEAS. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel informatique SPSS 10.0 pour Windows® (IBM, Chicago, IL, USA).

## 3. Résultats

Nous avons effectué une analyse immunohistochimique en utilisant un antiserum contre la fibre de Reissner dans les sections frontales de l'organe sous-commissural. Dans les contrôles salins, l'immunoréactivité RF est apparue très importante et s'étend à l'ensemble du SCO (figure 1 A). Le marquage a été observé sur les trois composants de SCO: les cellules épendymales, les cellules hypendymales et les extensions basales qui semblent sécréter activement avec RF-IR élevé dans les parties apicales de l'organe (Figure 1 A, a). Chez les rats DHEAS cependant, une augmentation globale et significative (figure 1 C,  $p < 0,05$ ) de l'immunoréactivité RF a été observée dans toutes les parties du SCO, en particulier les parties apicales de l'organe (figure 1 B, b).





(C)

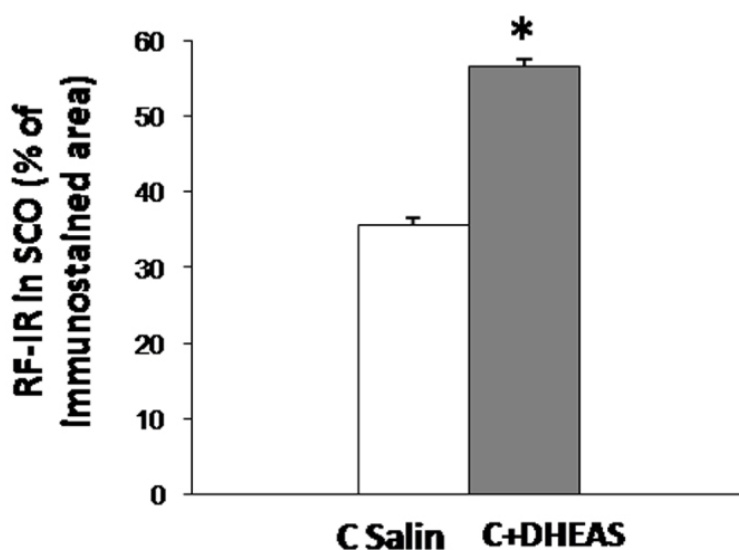


Figure 1. Micrographies légères de coupes frontales à travers l'organe sous-commissural (SCO) de rat adulte, immunomarcqué avec un antisérum contre les fibres de Reissner (RF). L'immunoréactivité RF est répartie dans tous les composants SCO chez les rats témoins salins (A), l'immunomarquage est plus évident dans la partie apicale de l'organe (Aa). L'administration de DHEAS déclenche une augmentation de l'immunoréactivité RF dans toutes les parties du SCO (B) en particulier dans la partie apicale (Bb). (C) Histogramme montrant la densité d'immunoréactivité RF du SCO dans les deux groupes étudiés. Les données sont rapportées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM et ont été soumises à un test t de Student. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme indiquant une signification statistique entre les groupes. PC: commissure postérieure, 3V: troisième ventricule, Aq: aqueduc de Sylvius.

Nous avons réalisé une évaluation immunohistochimique de l'innervation sérotoninergique, bien connue pour contrôler la libération de RF par les différents composants du SCO [ 34 , 39 , 41 ]. Chez les rats témoins salins, nous avons observé un plexus dense et continu de fibres 5-HT-immunoréactives autour de l'ensemble du SCO (figure 2 A). Les fibres immunoréactives 5-HT ont été organisées principalement sur des fibres de sérotonine perpendiculaires et parfois parallèles atteignant les épendymocytes et les cellules hypendymaires avec une condensation au niveau des parties latérales de l'organe (Figure 2 A, a). Chez les rats DHEAS,



cependant, un (Figure 2 E,  $P < 0,05$ ) et une perte évidente de l'immunoréactivité 5-HT a été observée, en particulier dans les parties basales et latérales dans tout le SCO (Figure 2 B, b).

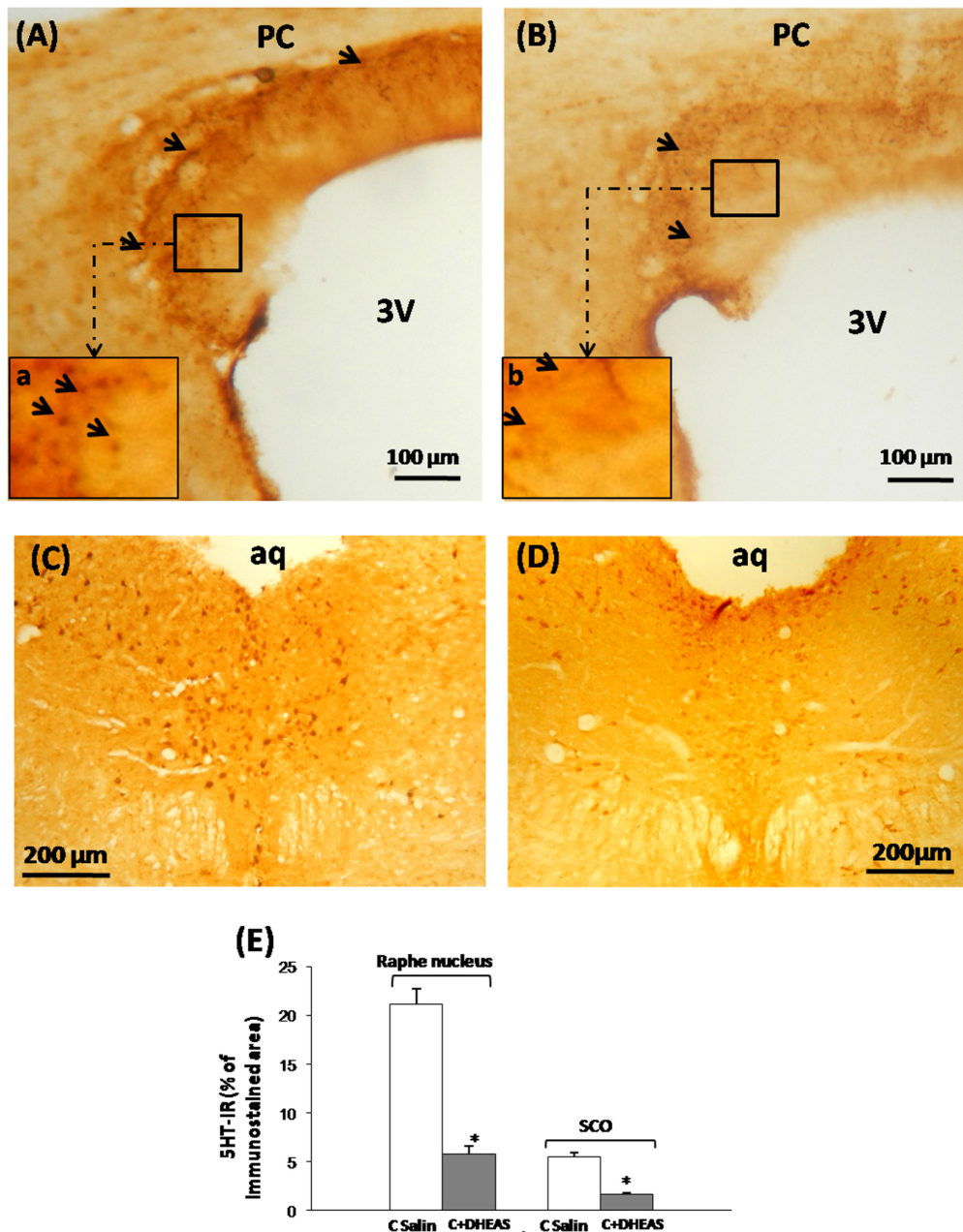


Figure 2. Micrographies légères de coupes frontales dans tout l'organe sous-commissural (SCO) (A, B) et le noyau raphé (C, D) de rat adulte immunocolore avec un antisérum contre 5-HT. Le SCO montre de nombreuses fibres 5-HT positives entourant l'organe formant un plexus dense et continu de fibres immunoréactives entourant le SCO avec une condensation principalement dans les parties latérales (Aa). Le traitement des rats avec DHEAS (B) a montré une diminution drastique de l'immunoréactivité 5HT dans tous les composés SCO (B). (E) Histogramme affichant le pourcentage d'immunoréactivité 5-HT dans la partie basale du SCO et le noyau dorsal Raphe. Les données sont rapportées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM et ont été soumises à un test t de Student. Une valeur de  $P < 0,05$  a été considérée comme indiquant une signification statistique entre les groupes.

Pour évaluer si la perte de 5-HT dans les nerfs terminaux atteignant le SCO était liée à des événements survenus au sein du péricarya d'origine, nous avons effectué une enquête immunohistochimique du noyau d'origine, le noyau du raphé dorsal (DRN), qui innervait différentes régions du cerveau, y compris le SCO [ 38 , 44 ]. Chez le rat DHEAS (Figure 2 D), nous avons observé une perte drastique d'immunocoloration dans toutes les régions du DRN par rapport aux témoins salins (Figure 2 C), correspondant à des quantités significativement diminuées (Figure E,  $P < 0,05$ ) de 5-HT dans le péricarya ainsi que dans le réseau dendritique de tout le noyau.

## 4. Discussion

Le potentiel modulateur des neurostéroïdes, en particulier la déhydroépiandrostérone (DHEA) et son ester sulfate (DHEAS), sur de multiples systèmes neuronaux, a été principalement étudié sur les systèmes dopaminergique [ 20 , 21 ], glutamatergique [ 22 ] sérotoninergique [ 19 , 23 ] et GABAergique. [ 24 , 25 ]. Néanmoins, on sait peu de choses sur les réponses gliales aux neurostéroïdes, à l'exception de certaines découvertes qui ont étudié les effets des neurostéroïdes sur les astrocytes en particulier [ 45 , 46 ]. À travers la présente enquête, nous avons cherché à évaluer l'effet de in vivo administration chez le rat de DHEAS à une dose de 5 mg / kg, lors de la libération de RF dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) par les épendymocytes SCO. Le SCO est une glande épendymaire située dans la région dorso-caudale du troisième ventricule, libérant des glycoprotéines de haut poids moléculaire appelées «fibre de Reissner» dans le liquide céphalo-rachidien [ 26 , 47 ]. Cette glande cérébrale particulière a été principalement décrite comme l'un des organes circonventriculaires (OVC) les plus reconnus dans le cerveau des mammifères [ 48 , 49 ]. Elle constitue une zone particulière d'une barrière hémato-encéphalique déficiente caractérisée par un manque de jonctions serrées entre les cellules endothéliales [ 49 ]. Par conséquent, il est hautement perméable aux molécules de poids moléculaire élevé et aux substances polaires [49]. De nombreuses fonctions ont été attribuées à cet organe particulier, impliqué dans différentes conditions physiopathologiques (voir introduction). Cependant, le mécanisme d'action impliquant cette glycoprotéine dans de telles fonctions est encore un sujet de débat. Après une seule injection avec le neurostéroïde neuroactif DHEAS (5 mg / kg) chez le rat, nous avons observé une immunoréactivité des fibres de Reissner sensiblement augmentée au sein des cellules hypendymales et épendymaires constituant respectivement les parties basale et apicale du SCO. Cela nous a conduit à suggérer une possible libération accrue de matériel de sécrétion dans le LCR et les vaisseaux sanguins [ 50]. À ce jour, la signification fonctionnelle d'un tel phénomène n'est pas encore établie, bien que nous spéculions un possible rôle régulateur RF des niveaux de monoamines et de leurs métabolites dans le LCR. Le soutien de ce point de vue est fourni par certaines preuves substantielles montrant que le complexe SCO-RF participe à l'élimination du LCR de certaines monoamines en les liant. Ainsi, la RF, in vitro ou in vivo, se lie à l'épinéphrine (EP), à la noradrénaline (NEP) et au 5HT [ 31 , 37 , 51 ]. L'hypothèse de liaison a également été soutenue par des études récentes de biologie moléculaire. Les glycoprotéines RF ont des séquences répétées [ 47 ] qui présentent une forte homologie avec un ou deux domaines de transporteurs de monoamine [52]. Ces domaines se lient et transportent le long du LCR certaines monoamines et métabolites tels que EP, NEP, dopamine (DA), 5-HT et L-DOPA [ 31 ]. De plus, les rats dépourvus de RF présentaient une concentration accrue dans le LCR de certaines monoamines et de leurs métabolites tels que la 5-HT, l'EP et l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) [ 53 ]. Ces données soutiennent en outre le rôle du SCO-RF dans la clairance des monoamines cérébrales atteignant le LCR. Sinon, des preuves considérables ont montré que la DHEAS et la DHEA provoquent des changements profonds dans le système monoaminergique. En effet, en présence des antagonistes des récepteurs dopaminergiques D2, la spiperone et le sulpiride, la DHEAS pourrait produire une facilitation marquée de la libération élevée de [3H] NEP provoquée par K<sup>+</sup> de manière dose-dépendante. De plus, Monnetet coll. [ 54 ] ont rapporté que DHEAS pourrait potentialiser la libération de [3H] NEP évoquée par NMDA à partir de coupes d'hippocampe. Il a été démontré que la DHEA et la DHEAS augmentent la libération de dopamine, mais dans des conditions expérimentales différentes. DHEAS (10<sup>-7</sup> -10<sup>-8</sup> M) augmente la libération de dopamine dans les cultures de cellules hypothalamiques [ 55 ] et les cellules PC12 [ 56 ]. La DHEA augmente également la libération de dopamine dans les cellules PC12, mais plus tôt que la DHEAS [ 56]. Par conséquent, la DHEA et la DHEAS augmentent la libération de dopamine, mais probablement par des mécanismes différents. Les résultats ci-dessus semblent soutenir notre point de vue selon lequel la RF est impliquée dans la régulation des niveaux de LCR éventuellement augmentés de certaines monoamines et de leurs métabolites se produisant dans le cerveau supplémenté avec DHEAS.

Une autre preuve qui peut en partie expliquer la montée des matériaux SCO-RF en présence de DHEAS (notre constatation) est que le SCO est une cible de nombreuses sorties neuronales, dont une de nature sérotoninergique [ 28 , 34 ]. En effet, nos résultats actuels ont apporté une preuve expérimentale d'une perte d'immunoréactivité 5-HT au sein des fibres sérotoninergiques innervant l'ensemble du SCO après l'administration de DHEAS (5 mg / kg de poids corporel). Ceci était concomitant avec un déficit au sein du noyau d'origine, le DRN. Sinon, des preuves substantielles suggèrent que le système sérotoninergique, qui provient du noyau du raphé dorsal (DRN), contrôle négativement l'activité sécrétoire SCO chez le rat [ 28 , 34 , 57]. Ces données sont en parfaite concordance avec nos résultats. Par conséquent, l'augmentation de la teneur en fibres de Reissner induite par la DHEAS dans le SCO semble être la conséquence éventuelle d'une

régulation négative de la 5-HT par le neurostéroïde neuroactif DHEAS. En effet, plusieurs effets des neurostéroïdes sur le métabolisme de la sérotonine ont été élucidés dans différentes conditions expérimentales. En fait, dans l'hypothalamus de souris B6 nourries avec un régime supplémenté en DHEA (0,45% p / p) pendant 7 jours, les niveaux de 5-HT avaient tendance à diminuer avec son métabolite acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA), suggérant une réduction de 5 Synthèse HT [ 23 ]. De plus, la DHEA (200 mg / kg, ip) augmente la teneur en 5-HIAA dans le mésencéphale et diminue les niveaux de 5-HT dans le cervelet [ 58]. À une dose de 25 mg / kg, il augmente également les taux de 5-HIAA dans l'hypothalamus latéral (LH), l'hypothalamus ventromédial (VMH) et le raphé, et augmente le rapport 5-HIAA / 5-HT dans le noyau paraventriculaire (PVN) et raphé [ 20 ]. Ces études ont montré que la DHEA et / ou son métabolite androstènedione peuvent à la fois augmenter ou diminuer la synthèse et le renouvellement de la 5-HT à différentes doses et dans différentes régions du cerveau. 5. Conclusion

Grâce à la présente enquête, nous avons montré un effet particulier de DHEAS sur l'activité sécrétoire du SCO dans le cadre des organes circonventriculaires. Ce dernier présentait une augmentation évidente du matériel de sécrétion réparti dans toutes les cellules SCO. Une telle augmentation de la libération de RF par les épendymocytes SCO peut impliquer un effet direct possible du neurostéroïde sur les épendymocytes de l'organe ou une modulation indirecte via le système sérotoninergique connu pour contrôler l'activité sécrétoire du SCO. La signification fonctionnelle d'une telle réaction n'est pas entièrement établie, bien qu'elle puisse être impliquée dans un éventuel rôle régulateur RF des niveaux de monoamines et / ou de métabolites dans le liquide céphalo-rachidien.

### **Les conflits d'intérêts**

Les auteurs déclarent n'avoir aucun intérêt concurrent.

### **Remerciements**

Cette recherche a été financée par une subvention de PROTARS III D14 / 71. Nous remercions également CNRST-Maroc, CNERs Maroc, la coopération Maroc-Tunisienne, IBRO, ISN et Neuromed pour leur soutien financier.

### **Bibliographie**

1. R. C. Melcangi; L. M. Garcia-Segura; A. G. Mensah-Nyagan Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives, *Cell. Mol. Life Sci.*, Volume 65 (2008), pp. 777-797
2. E. E. Baulieu Neurosteroids: a novel function of the brain, *Psychoneuroendocrinology*, Volume 23 (1998), pp. 963-987
3. P. Robel; E. Beaulieu Neuro-Steroids: 3Beta-Hydroxy-delta-A5-derivatives in the rodent brain, *Neurochemistry*, Volume 7 (1985), pp. 953-958
4. N. A. Compagnone; S. H. Mellon Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators, *Front. Neuroendocrinol.*, Volume 21 (2000), pp. 1-56
5. S. H. Mellon; L. D. Griffin; N. A. Compagnone Biosynthesis and action of neurosteroids, *Brain Res. Rev.*, Volume 37 (2001), pp. 3-12
6. I. H. Zwain; S. S. C. Yen Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain, *Endocrinology*, Volume 140 (1999), pp. 3843-3852
7. S. R. King; P. R. Manna; T. Ishii; P. J. Syapin; S. D. Ginsberg; K. Wilson; L. P. Walsh; K. L. Parker; D. M. Stocco; R. G. Smith; D. J. Lamb An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain, *J. Neurosci.*, Volume 22 (2002), pp. 10613-10620
8. K. Shibuya; N. Takata; Y. Hojo; A. Furukawa; N. Yasumatsu; T. Kimoto; T. Enamia; K. Suzuki; N. Tanabe; H. Ishii; H. Mukai; T. Takahashi; T. Hattori; S. Kawato Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction, *Biochim. Biophys. Acta*, Volume 1619 (2003), pp. 301-316
9. Y. Hojo; T. Hattori; T. Enami; A. Furukawa; K. Suzuki; H.-t. Ishii; H. Mukai; J. H. Morrison; W. G. M. Janssen; S. Kominami; N. Harada; T. Kimoto; S. Kawato Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 and P450 aromatase localized in neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Volume 101 (2004), pp. 865-870

10. F. Correa; N. García; G. García; E. Chávez Dehydroepiandrosterone as an inducer of mitochondrial permeability transition, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Volume 87 (2003), pp. 279-284
11. K. Kurata; M. Takebayashi; S. Morinobu; S. Yamawaki Beta-estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against N-Methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Volume 311 (2004), pp. 237-245
12. M. Xilouri; P. Papazafiri Anti-apoptotic effects of allopregnanolone on P19 neurons, *Eur. J. Neurosci.*, Volume 23 (2006), pp. 43-54
13. N. A. Compagnone; S. H. Mellon Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Volume 95 (1998), pp. 4678-4683
14. C. A. Frye; E. H. Lacey The neurosteroids DHEA and DHEAS may influence cognitive performance by altering affective state, *Physiol. Behav.*, Volume 66 (1999), pp. 85-92
15. P. V. Miguez; A. N. B. Johnston; S. P. R. Rose Dehydroepiandrosterone and its sulphate enhance memory retention in day-old chicks, *Neuroscience*, Volume 109 (2002), pp. 243-251
16. L. B. Nicolas; W. Pinoteau; S. Papot; S. Routier; G. Guillaumet; S. Mortaud Aggressive behavior induced by the steroid sulfatase inhibitor COUMATE and by DHEAS in CBA / H mice, *Brain Res.*, Volume 922 (2001), pp. 216-222
17. J. Fedotova; N. Sapronov Behavioral effects of dehydroepiandrosterone in adult male rats, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, Volume 28 (2004), pp. 1023-1027
18. R. Maayan; D. Touatiwerner; E. Ram; R. Strous; O. Keren; A. Weizman The protective effect of frontal cortex dehydroepiandrosterone in anxiety and depressive models in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Volume 85 (2006), pp. 415-421
19. J. Pham; J. Porter; D. Svec; C. Eiswirth; F. Svec The effect of dehydroepiandrosterone on Zucker rats selected for fat food preference, *Physiol. Behav.*, Volume 70 (2000), pp. 431-441
20. J. Porter; M. Van Vrancken; C. Corll; H. Thompson; F. Svec The influence of dehydroepiandrosterone and 8-OH-DPAT on the caloric intake and hypothalamic neurotransmitters of lean and obese Zucker rats, *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.*, Volume 288 (2005), p. R928-R935
21. O. El Hiba; H. Gamrani; H. Chatoui; S. Ahboucha Loss of tyrosine hydroxylase expression within the nigro-striato-cortical pathways in the cirrhotic rat: the possible restorative effect of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate, *Acta Histochem.*, Volume 115 (2013), pp. 637-645
22. L. Chen; X. Dai; M. Sokabe Chronic administration of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) primes for facilitated induction of long-term potentiation via sigma 1 (?1) receptor: optical imaging study in rat hippocampal slices, *Neuropharmacology*, Volume 50 (2006), pp. 380-392
23. F. Catalina; S. G. Speciale; V. Kumar; L. Milewich; M. Bennett Food restriction-like effects of dietary dehydroepiandrosterone. Hypothalamic neurotransmitters and metabolites in Male C57BU6 and (C57BU6 × DBA/2)F1 mice, *Soc. Exp. Biol. Med.*, Volume 226 (2001), pp. 208-215
24. R. Huang; G. H. Dillon Functional characterization of GABA A receptors in neonatal hypothalamic brain slice, *J Neurophysiol.*, Volume 88 (2002), pp. 1655-1663
25. S. D. Sullivan; S. M. Moenter Neurosteroids alter ?-aminobutyric acid postsynaptic currents in gonadotropin-releasing hormone neurons: a possible mechanism for direct steroidal control, *Endocrinology*, Volume 144 (2003), pp. 4366-4375
26. F. Nualart; S. Hein; E. M. Rodffiguez; A. Oksche Identification and partial characterization of the secretory glycoproteins of the bovine subcommissural organ-Reissner's fiber complex. Evidence for the existence of two precursor forms, *Mol. Brain Res.*, Volume 11 (1991), pp. 227-238
27. C. D. Balaban; R. J. Schuerger; W. B. Severs Evidence for a noradrenergic projection to the subcommissural organ Carey, *Neurosci. Lett.* (1994), pp. 209-213
28. H. Chatoui; O. El Hiba; A. Elgot; H. Gamrani The rat SCO responsiveness to prolonged water deprivation: implication of Reissner's fiber and serotonin system, *C. R. Biol.*, Volume 335 (2012), pp. 253-260
29. A. Meiniel; R. Meiniel; R. Didier; I. Creveaux; S. Gobron; H. Monnerie; B. Dastugue The subcommissural organ and Reissner's fiber complex. An Enigma in the Central Nervouq System, *Prog. Histochem. Cytochem.*, Volume 30 (1996), pp. 1-66
30. J. H. B. Dieren; H. G. B. Vuiings; J. H. W. M. Rombout; A. T. M. de Gunst-Schoonderwoerd The subcommissural organ-liquor fibre complex: the binding of catecholamines to the liquor fibre in frogs of the *Rana esculenta* complex, *Acta Zool.*, Volume 64 (1983), pp. 47-53
31. T. Caprile; S. Hein; S. Rodr?iguez; H. Montecinos; E. Rodr?iguez Reissner fiber binds and transports away monoamines present in the cerebrospinal fluid, *Mol. Brain Res.*, Volume 110 (2003), pp. 177-



32. S. Ahboucha; H. Gamrani Differences in protein expression in the subcommissural organ of normal and lordotic lizards (*Agama impalearis*), *Metab. Brain Dis.*, Volume 16 (2001), pp. 219-226
33. A. Meiniel The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: which role in hydrocephalus?, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Volume 39 (2007), pp. 463-468
34. O. El Hiba; H. Gamrani; S. Ahboucha Increased Reissner's fiber material in the subcommissural organ and ventricular area in bile duct ligated rats, *Acta Histochem.*, Volume 114 (2012), pp. 673-681
35. H. Gamrani; M. F. Belin; M. Aguera; A. Calas; J. F. Pujol Radioautographic evidence for an innervation of the subcommissural organ by GABA-containing nerve fibres, *J. Neurocytol.*, Volume 424 (1981), pp. 411-424
36. D. Weissmann-Nanopoulos; M. F. Belin; M. Didier; M. Aguera; M. Partisani; M. Maitre; J. F. Pujol Immunohistochemical evidence for neuronal and non-neuronal synthesis of gaba in the rat subcommissural organ, *Neurochem. O' Int.*, Volume 5 (1983), pp. 785-791
37. A. Abbaoui; L. Tamegart; R. El Fari; H. Gamrani Subcommissural organ–Reissner's fiber complex plasticity in two animal models of copper intoxication and modulatory effect of curcumin: involvement of serotonin, *J. Chem. Neuroanat.*, Volume 97 (2019), pp. 80-86
38. L. Lbger; A. Degueurce; J. J. Lundberg; J. F. Pujol; K. Mqllgar Origin and Influence of the serotonergic innervation of the subcommissural organ in the rat, *Neuroscience*, Volume 10 (1983), pp. 411-423
39. H. G. B. Vullings; J. H. B. Dieren Secretory activity of the subcommissural organ in *Rana temporaria* under osmotic stimulation, *Cell Tissue Res.*, Volume 241 (1985), pp. 663-670
40. S. Ahboucha; M. Didier-bazes; A. Meiniel; M. Fèvre-Montange; H. Gamrani Secretory activity and serotonin innervation of lizard's subcommissural organ, *Neuroreport*, Volume 11 (2000), pp. 2611-2615
41. A. Laalaoui; S. Ahboucha; M. Didier-bazes; M. Fevre-montange; A. Meiniel; H. Gamrani Postnatal secretion of the subcommissural organ of the *Meriones shawi*: control of serotonin innervation, *Dev. Brain Res.*, Volume 126 (2001), pp. 75-80
42. H. Asaba; K. Hosoya; H. Takanaga; S. Ohtsuki; E. Tamura; T. Takizawa; T. Terasaki Blood – brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2, *J. Neurochem.*, Volume 126 (2000), pp. 75-80
43. J. Vilaplana; M. Lavielle A method to quantify glial fibrillary acidic protein immunoreactivity on the suprachiasmatic nucleus, *J. Neurosci. Methods*, Volume 88 (1999), pp. 181-187
44. M. Didier-Bazes; B. Voutsinos; M. Aguera; C. Peyron; H. Akaoka; M. F. Belin Specific potentialities of embryonic rat serotonergic neurons to innervate different periventricular targets in the adult brain, *J. Comp. Neurol.*, Volume 45 (1997), pp. 29-45
45. Å. Fex Svenningsen; G. Wicher; J. Lundqvist; H. Pettersson; M. Corell; M. Norlin Effects on DHEA levels by estrogen in rat astrocytes and CNS co-cultures via the regulation of CYP7B1-mediated metabolism, *Neurochem. Int.*, Volume 58 (2011), pp. 620-624
46. A. R. Jayakumar; R. Ruiz-cordero; X. Y. Tong; M. D. Norenberg Brain edema in acute liver failure: role of neurosteroids, *Arch. Biochem. Biophys.*, Volume 536 (2013), pp. 171-175
47. F. Nualart; S. Hein; C. R. Yulis; A. M. Zárraga; A. Araya; E. M. Rodríguez Partial sequencing of Reissner's fiber glycoprotein I (RF-Gly I), *Cell Tissue Res.*, Volume 292 (1998), pp. 239-250
48. V. R. B. Anderson; L. J. E. Hofer; H. H. Storch Der Reaktionsmechanismus der Fischer-Tropsch-Synthese, *Chemie-Ing-Techn.*, Volume 30 (1958), pp. 560-566
49. P. M. Gross; A. Weindl Peering through the windows of the brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, Volume 7 (1987), pp. 663-672
50. E. M. Rodriguez; H. Herrera; B. Peruzzo; S. Rodriguez; S. Hein; A. Oksche Light- and electron-microscopic immunocytochemistry and lectin histochemistry of the subcommissural organ: evidence for processing of the secretory material, *Cell Tissue Res.*, Volume 243 (1986), pp. 545-559
51. J. Hess; G. Sterba Studies concerning the function of the complex subcom-missural organ-liquor fibre: the binding ability of the liquor fibre to pyrocatechin derivatives and its functional aspects, *Brain Res.*, Volume 58 (1973), pp. 303-312
52. J. P. Finn; R. H. Edwards Multiple residues contribute independently to differences in ligand recognition between vesicular monoamine transporters 1 and 2, *J. Biol. Chem.*, Volume 273 (1998), pp. 3943-3947
53. S. Rodríguez; K. Vio; C. Wagner; M. Barría; E. H. Navarrete; V. D. R. J. M. Pérez-figares; E. M. Rodríguez Changes in the cerebrospinal-fluid monoamines in rats with an immunoneutralization of the

- subcommissural organ-Reissner's fiber complex by maternal delivery of antibodies \*, *Exp. Brain Res.*, Volume 128 (1999), pp. 278-290
54. F. P. Monnet; V. Mahei; P. Robelt; E. Baulieut Release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus, *Neurobiology*, Volume 92 (1995), pp. 3774-3778
55. H. E. Murray; G. E. Gillies Differential effects of neuroactive steroids on somatostatin and dopamine secretion from primary hypothalamic cell cultures, *J. Neuroendocrinol.*, Volume 9 (1997), pp. 287-295
56. I. Charalampopoulos; E. Dermizaki; L. Vardouli; C. Tsatsanis; C. Stournaras; A. N. Margioris; A. Gravanis Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization, *Endocrinology*, Volume 146 (2005), pp. 3309-3318
57. K. Mollgard; J. J. Lundberg Morphologic consequences of serotonin neurotoxin administration: neuron-target cell interaction in the rat subcommissural organ, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Volume 305 (1978), pp. 262-288
58. T. H. U. Nguyen; J. Porter; F. Svec Dehydroepiandrosterone (DHEA) decreases open-field spontaneous activity of Zucker rats, *Physiol. Behav.*, Volume 67 (1999), pp. 725-731