

Université de Montréal

**MÉCANISMES DE L'INHIBITION DES CELLULES PYRAMIDALES DE
L'HIPPOCAMPE VIA LES RÉCEPTEURS GABA_B CHEZ LES RAT :
ÉTUDES ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES IN VITRO**

par

TRI MANH PHAM

**Département de physiologie
Centre de recherche en sciences neurologiques
Faculté de médecine**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor
en sciences neurologiques**

décembre 1998

©PHAM Tri Manh, 1998



W
4
U58
1999
V.048

Université de Montréal

RECHERCHES DE L'INSTITUT DE GÉNÉTIQUE ET DE CYTOLOGIE DE
L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉTUDES ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES EN VITRO

1999

THÈSE DE M. A. G.

Présentée au département de biologie
Centre de recherche en neurosciences
à l'Université de Montréal

Cette thèse a été présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en biologie
à l'Université de Montréal

1999

1999



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

MÉCANISMES DE L'INHIBITION DES CELLULES PYRAMIDALES DE
L'HIPPOCAMPE VIA LES RÉCEPTEURS GABA_B CHEZ LES RAT :
ÉTUDES ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES IN VITRO

Présentée par

TRI MANH PHAM

a été évalué par un jury composé de personnes suivantes:

ur Vincent Castellucci, président-rapporteur
ur Angel Alonso, examinateur externe
ur Jean-Claude Lacaille, directeur de recherche
ur Louis-Éric Trudeau, membre du jury

Thèse acceptée le: 99-04-14.....

SOMMAIRE

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le neurotransmetteur inhibiteur principal dans le système nerveux central. Dans l'hippocampe, le GABA agit sur deux types de récepteurs sur la membrane des cellules pyramidales: les récepteurs GABA_A et GABA_B. Les récepteurs GABA_A sont liés à une conductance Cl⁻ et assurent la majorité des inhibitions rapides dans le cerveau. Les récepteurs GABA_B sont responsables des inhibitions lentes par l'ouverture d'une conductance K⁺ liée aux protéines G. Les études présentées dans cette thèse visent à clarifier les mécanismes d'inhibition GABA_B dans l'hippocampe chez le rat.

Le premier projet a mis en évidence les mécanismes des réponses GABA_B induite par le GABA, suite au blocage pharmacologique des récepteurs GABA_A lors d'enregistrement intracellulaire des cellules pyramidales de la région du CA1 de l'hippocampe. L'application locale du GABA et du baclofen dans la couche dendritique des cellules pyramidales a évoqué des réponses hyperpolarisantes impliquant l'ouverture de conductance K⁺, puisque leurs potentiels d'équilibre étaient similaires à celui du K⁺. Cependant, l'application du Ba²⁺, un bloqueur de certains canaux K⁺, a supprimé réversiblement les réponses au baclofen, alors que celles du GABA n'étaient réduites que de 50%. De plus, les réponses au GABA ont été réduites par l'injection intracellulaire de GTP γ S. Finalement, un antagoniste GABA_B, le CGP35348, a bloqué complètement et réversiblement les réponses au baclofen, alors que celles au GABA n'ont été que réduites. Par contre, un

antagoniste de plus haute affinité, le CGP55845A, a bloqué complètement les réponses du GABA. Ces résultats suggèrent qu'en présence d'antagonistes de récepteurs GABA_A, le GABA génère dans les cellules pyramidales deux réponses distinctes couplées aux récepteurs GABA_B via des protéines G: 1- le GABA (et le baclofen) active des conductances K⁺ sensibles au Ba²⁺ via des récepteurs GABA_{B1}, et 2- le GABA (mais non le baclofen) active des conductances K⁺ insensibles au Ba²⁺ via des récepteurs GABA_{B2}.

Le deuxième projet a examiné si le GABA endogène pouvait activer des conductances K⁺ hétérogènes couplées aux récepteurs GABA_B. La libération de GABA endogène a été produite par stimulation électrique simple et répétitive des fibres GABAergiques ou induite chimiquement par la 4-aminopyridine (4-AP) qui synchronise la décharge des interneurones. En présence d'antagonistes de récepteurs GABA_A, NMDA et non-NMDA, les PPSIs monosynaptiques tardifs évoqués électriquement ou induits par la 4-AP ont été réversiblement bloqués par le Ba²⁺ alors que les hyperpolarisations induites par le GABA exogène dans les mêmes cellules n'étaient toujours réduites que de 50%. L'application de l'antagoniste de récepteurs GABA_B, le CGP55845A, a supprimé ces PPSIs monosynaptiques, alors que l'injection intracellulaire de GTPγS les a réduit.

Ces résultats suggèrent que le GABA endogène libéré par ces différents protocoles n'active que des conductances K⁺ sensibles au Ba²⁺ couplées aux récepteurs GABA_{B1} via des protéines G. Les récepteurs GABA_{B1} sont activés par le GABA endogène, le baclofen et le GABA exogène et seraient localisés à des sites

intra-synaptiques. Par contre, seul le GABA exogène a activé les conductances K^+ insensibles au Ba^{2+} couplées aux récepteurs $GABA_{B2}$. Ces récepteurs seraient donc localisés à des sites extra-synaptiques.

Mots clés: GABA, baclofen, conductances K^+ , récepteur extrasynaptique

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xv
Premier chapitre: introduction générale	
1.0 L'hippocampe.....	1
1.1 Connectivité de la formation hippocampique.....	2
2.0 Le neurotransmetteur inhibiteur GABA.....	3
2.1 L'inhibition dans l'hippocampe	4
2.1.1 L'inhibition rétrograde.....	5
2.1.2 L'inhibition antérograde.....	5
2.2 L'inhibition polysynaptique.....	5
2.2.1 Le PPSI précoce ou rapide dans l'hippocampe.....	7
2.2.2 Le PPSI tardif ou lent dans l'hippocampe.....	7
2.3 Les PPSIs observés dans les autres régions du cerveau.....	8
2.4 Les PPSIs monosynaptiques.....	9
3.0 Les PPSIs évoqués par l'acide glutamique.....	10
4.0 Les PPSI spontanés de type GABA _A	12

5.0 Les PPSIs spontanés de type GABA _B	12
5.1 Les PPSIs spontanés de type GABA _B induits par la 4-aminopyridine	14
6.0 Mécanismes postsynaptiques du récepteur GABA _A	15
6.1 Mécanismes postsynaptiques de l'hyperpolarisation GABA _A	16
6.2 Mécanismes postsynaptiques de la dépolarisation GABA _A	17
6.3 Les récepteurs GABA _C	20
7.0 Mécanismes postsynaptiques du récepteur GABA _B	20
7.1 Mécanismes postsynaptiques GABA _B activés par le baclofen	22
7.2 Mécanismes postsynaptiques GABA _B activés par le GABA	24
7.3 Structure du récepteur GABA _B	25
8.0 Les récepteurs GABA _B présynaptiques	26
8.1 Dépression de l'inhibition par stimulation répétée	27
8.2 Mécanismes GABA _B de la dépression présynaptique	30
8.3 Les mécanismes GABA _B pré et postsynaptiques sont distincts	31
9.0 Objectifs de la recherche	32

Deuxième chapitre: premier article

"Multiple Postsynaptic Actions of GABA via GABA _B Receptors . on CA1 Pyramidal Cells of Rat Hippocampal Slices"	37
---	----

Troisième chapitre: deuxième article

"Distincts GABA _B Actions via Synaptic and Extrasynaptic Receptors in Rat Hippocampus In Vitro"	88
---	----

Quatrième chapitre : discussion générale

4.1 Inhibition des cellules pyramidales médiée par les récepteurs GABA _B	139
4.1.1 Conductances K ⁺ activées par le GABA et le baclofen.....	140
4.1.2 Effets différentiels du Ba ²⁺ sur les réponses au GABA et au baclofen	141
4.1.3 Mécanismes ioniques de réponse non-GABA _A induite par le GABA.....	142
4.1.3.1 Réponse dépolarisante GABA _B induite par le GABA.....	143
4.1.4 Le GABA et le baclofen n'activent pas les mêmes récepteurs GABA _B	144
4.1.5 Hétérogénéité des récepteurs GABA _B postsynaptiques.....	145
4.2 Mécanismes GABA _B activés par le GABA endogène.....	146
4.2.1 Propriétés des PPSIs lents évoqués par stimulation électrique simple.....	146
4.2.2 Propriétés des PPSIs lents induits par le 4-AP.....	147

4.2.3 Propriétés des PPSIs lents évoqués	
par stimulation électrique répétée.....	147
4.2.4 Récepteurs GABA _B synaptiques et extrasynaptiques.....	147
4.3 Implications physiologiques	150
4.4 Perspectives d'avenir pour récepteurs GABA _B	152
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE.....	156
ANNEXE.....	183
Contribution de l'étudiant aux articles	184

LISTE DES TABLEAUX**PREMIER CHAPITRE**

Tableau 1. Propriété des récepteurs GABA.....35

DEUXIÈME CHAPITRE

Table 1. Summary of properties of GABA and (-)BAC responses.....73

Table 2. Summary of effects of GABA_B antagonists on the amplitude of GABA
and (-)BAC responses.....74

LISTE DES FIGURES

DEUXIÈME CHAPITRE

Figure 1. Pharmacologically isolated non-GABA _A responses and (-)BAC responses.....	78
Figure 2. Differential sensitivity of GABA and (-)BAC responses to Ba ²⁺	79
Figure 3. E _{rev} of Ba ²⁺ resistant GABA responses	80
Figure 4. GABA responses with KCl-filled electrodes	81
Figure 5. GABA responses with electrodes containing the K ⁺ channel blocker Cs ⁺	82
Figure 6. GABA responses during recordings with electrodes containing LiCl	83
Figure 7. GABA responses during recordings with electrodes containing GTPγS	84
Figure 8. Differential sensitivity of GABA and (-)BAC responses to GABA _B antagonists.....	85
Figure 9. Block of GABA responses by the GABA _B antagonist CGP55845A.....	86

TROISIÈME CHAPITRE

Figure 1. Monosynaptic late IPSPs evoked by stimulation of different dendritic layers.....	128
---	-----

Figure 2. Effect of GABA _B antagonist on monosynaptic late IPSPs.....	129
Figure 3. Effects of intracellular GTPγS on monosynaptic late IPSPs.....	130
Figure 4. Differential effects of Ba ²⁺ on monosynaptic late IPSPs and GABA _B responses.....	131
Figure 5. Effects of Ba ²⁺ on monosynaptic early and late IPSPs.....	132
Figure 6. Properties of 4-aminopyridine induced late IPSPs.....	133
Figure 7. Effects of GABA _B receptor antagonist on 4-AP-induced late IPSP.....	134
Figure 8. Effects of intracellular GTPγS on 4-AP-induced late IPSPs.....	135
Figure 9. Differential effects of Ba ²⁺ on 4-AP-induced late IPSPs and on GABA _B responses.....	136
Figure 10. Effects of Ba ²⁺ on monosynaptic late IPSCs evoked by stimulus trains.....	137

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Chapitre 1 et 4

AMPC	adenosine monophosphate cyclique
3-APPA	acide 3-amino propylphosphonique
ATP	adenosine triphosphate
CPSE	courant postsynaptique excitateur
CPSI	courant postsynaptique inhibiteur
epp	excitatory postsynaptic potential
E_{GABA}	potentiel d'équilibre de GABA
E_{K}	potentiel d'équilibre du potassium
E_{Cl}	potentiel d'équilibre du chlore
GABA	acide gamma-aminobutyrique
GDP β S	Guanosine-5'-O-(β -thio-triphosphate)
GTP γ S	Guanosine-5'-O-(γ -thio-triphosphate)
5-HT	5-HydroxyTryptamine
I_{GABA}	courant induit par le GABA
I_{bac}	courant induit par le baclofen
I_{AHP}	courant K^+ après-hyperpolarisation
$I_{\text{K(A)}}$	courant K^+ de type A
mepp	miniature excitatory postsynaptic potential
mCPSI	courant postsynaptique inhibiteur miniature
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
PKC	protéine kinase C
PPSE	potentiel postsynaptique excitateur
PPSI	potentiel postsynaptique inhibiteur
PPSI _A	PPSI médié par les récepteurs GABA _A
PPSI _B	PPSI médié par les récepteurs GABA _B
sPPSI	PPSI spontané
str.	stratum
4-AP	4-aminopyridine
TACA	acide trans-4-aminocrotonique
THA	Tetrahydro aminoacridine
THIP	4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol

TTX tetrodotoxine

Chapitre 2 et 3

ACSF artificial cerebrospinal fluid
AP-5 2-amino-5-phosphonopentanoic acid
BAC baclofen
BIC bicuculline
CNQX 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione
 E_{rev} equilibrium potential
GABA gamma aminobutyric acid
IPSP inhibitory postsynaptic potential
IPSC inhibitory postsynaptic current
KAc potassium acetate
l-m stratum lacunosum moleculare
NMDA N-Methyl-D-Aspartate
NIP nipecotic acid
or stratum oriens
rad stratum radiatum
4-AP 4-aminopyridine
 V_m membrane potential

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Le Docteur Jean-Claude Lacaille, mon superviseur, pour la formation scientifique qu'il m'a donnée.

A mes collègues de laboratoire Sylvain Williams, Don Samulack, Isabel Jutras, Mohamed Ouardouz, France Morin, Yaël Perez, Suzanne Nurse, Gavin Woodhall, Andrew Chapman, Christine Gee, Frédéric Manseau, Christian Patenaude, et Isabelle Latour que j'ai eu la chance de côtoyer.

Les docteurs Vincent Castellucci, Angel Alonso, Louis-Éric Trudeau, pour avoir accepté d'être membre de mon jury et pour leur commentaires constructifs.

Enfin, je désire exprimer ma gratitude au FCAR, à la Fondation Savoy et au Docteur Lacaille pour leur appui financier.

PREMIER CHAPITRE

INTRODUCTION

1.0 L'hippocampe

L'hippocampe est une structure du cerveau impliquée dans les fonctions cognitives ainsi que dans certaines pathophysiologies neurologiques. Des études neuropsychologiques ont suggéré que l'hippocampe joue un rôle important dans la mémoire (Scoville et Milner, 1957). L'hippocampe semble être impliqué plus spécifiquement dans le système de mémoire déclarative (Squire, 1987). Au niveau pathophysiologique, l'hippocampe est impliqué dans l'épilepsie du lobe temporal qui semble résulter de la décharge synchronisée des cellules pyramidales de l'hippocampe (Ben-Ari, 1985; Wong et al., 1984; Traub et al., 1989).

L'hippocampe possède une organisation anatomique très ordonnée. La formation hippocampique est composée de cinq divisions anatomiques qui forment une boucle en série: le cortex entorhinal, le gyrus dentelé, les régions CA3 et CA1 de la corne d'Ammon et le subiculum (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934).

Le terme hippocampe est utilisé pour désigner l'ensemble du gyrus dentelé et de la corne d'Ammon. Examiné en coupe transverse, l'hippocampe est composé de deux couches de cellules principales, dont les corps cellulaires sont précisément alignés côte à côte, la couche granulaire gyrus dentelé et la couche pyramidale de la corne d'Ammon, lesquelles forment deux C imbriqués frontalement l'un dans l'autre. Au niveau de la corne d'Amon, 4 aires contigües ont été distinguées par Lorente de Nó (1934) sur la base de la morphologie du soma des cellules pyramidales : CA1, CA2, CA3 et CA4.

Au niveau du CA1, une coupe transverse de l'hippocampe révèle 5 couches

dans un axe dorsal-ventral (Ramon y Cajal, 1911): i) la couche *alveus* qui est composée des axones de cellules pyramidales; ii) la couche *oriens* qui est constituée des dendrites basales des cellules pyramidales, d'interneurones, et de fibres commissurales provenant des régions CA3 ipsi- et contralatérales ; iii) la couche *pyramidale* qui est formée de corps cellulaires de cellules pyramidales, ainsi que d'interneurones; iv) la couche *radiatum* qui est composée de dendrites apicales des cellules pyramidales, d'interneurones, et de fibres afférentes (collatérales de Schaffer) de la région CA3 , et v) la couche *lacunosum-moleculare*, adjacente à la fissure hippocampique, et qui est composée de dendrites distales des cellules pyramidales, d'interneurones et de fibres afférentes du cortex entorhinal. Les cellules pyramidales et granulaires de l'hippocampe sont des cellules excitatrices qui libèrent le glutamate (Nadler et al., 1976, 1978). Les interneurones, avec leurs axones locaux inhibent les cellules pyramidales et granulaires ainsi que les autres interneurones en libérant l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur (Andersen et al., 1964 a,b).

1.1 Connectivité de la formation hippocampique

Le cortex entorhinal reçoit ses principales afférences des aires associatives du néocortex. Cette information est traitée par les neurones du cortex entorhinal et est ensuite relayée par leurs axones vers le gyrus dentelé. Cette information d'origine corticale est traitée dans l'hippocampe par un réseau d'inter-connexions synaptiques complexes. La partie principale de ce réseau est le circuit trisynaptique,

qui a été largement caractérisée *in vitro* parce qu'il est préservé dans des coupes transverses de l'hippocampe (Andersen et al., 1966a,b): i) les fibres du cortex entorhinal (voie perforante) qui projettent sur les dendrites des cellules granulaires du gyrus dentelé, ii) les axones des cellules granulaires (fibres moussues) qui contactent les dendrites apicales des cellules pyramidales du CA3; et iii) les axones des cellules du CA3 (collatérales de Schaffer) qui forment des synapses sur les dendrites apicales des cellules pyramidales du CA1.

L'hippocampe est formée par une répétition de ces circuits, disposés en lamelles, chacune contenant la même séquence de trois synapses excitatrices (Andersen et al., 1964a,b, 1969). Les axones des cellules pyramidales du CA1 projettent ensuite vers le complexe subiculaire, et finalement pour boucler le circuit, les cellules pyramidales du subiculum projettent au cortex entorhinal (Andersen, 1975). En plus de la voie perforante, les fibres du cortex entorhinal projettent directement à l'aire CA1 formant ainsi la voie temporo-ammonique (Steward et Scoville, 1976).

2.0 Le neurotransmetteur inhibiteur GABA

Le GABA est un acide aminé dérivé de l'acide glutamique. Il a été identifié par Roberts et Frankel (1950) ainsi qu'Awapara et al. (1950) comme constituant normal du système nerveux central (SNC). Son rôle physiologique, comme substance endogène inhibitrice du cerveau, a été mis en évidence par Bazemore et al. (1957) qui ont identifié ses effets inhibiteurs sur des neurones de crustacés.

Le GABA est synthétisé dans les terminaisons axonales par décarboxylation de l'acide glutamique et stocké dans les vésicules. La réaction est catalysée par une enzyme spécifique, la décarboxylase du glutamate dont le coenzyme est le phosphate de pyridoxal (vitamine B6) (Balasz et al., 1970). Le GABA est libéré à partir des terminaisons axonales de façon synaptique et récupéré par le même neurone (Iversen et Bloom, 1972) mais aussi par les cellules gliales (McGeer et al., 1975) par un système de transport à haute affinité dépendant des ions Na^+ et Cl^- (Kavanaugh et al., 1992). Après récupération dans les terminaisons nerveuses, le GABA est catabolisé, par transamination par l'enzyme α -cétoglutarate aminotransférase, en acide succinique et en NH_3 (McGeer et al., 1978).

Les premières évidences conclusives montrant le rôle du GABA comme neurotransmetteur inhibiteur dans le cerveau ont été rapportées par Krnjevic et Schwartz (1967) qui ont démontré que les potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSIs) évoqués par stimulation électrique et les réponses hyperpolarisantes induites par l'application du GABA sur les cellules du cortex avaient une sensibilité semblable à la concentration intracellulaire de Cl^- et un potentiel d'équilibre identique. Avec la découverte de l'antagoniste des récepteurs GABA_A , la bicuculline, un antagonisme spécifique et compétitif des réponses synaptiques du GABA a été démontré (Curtis et al., 1970).

2.1 L'inhibition dans l'hippocampe

L'excitabilité des cellules pyramidales de l'hippocampe est contrôlée par un

réseau local d'interneurones qui modulent leur décharge via deux types d'inhibition: l'inhibition rétrograde et l'inhibition antérograde.

2.1.1 L'inhibition rétrograde

L'inhibition rétrograde a été mise en évidence dans l'hippocampe par Kandel et al. (1961). Ces chercheurs ont démontré, au moyen d'enregistrement intracellulaire chez l'animal *in vivo*, que la stimulation électrique du fornix, qui active antidromiquement les axones des cellules pyramidales du CA3, génère des potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSIs) associé à une augmentation de conductances au Cl⁻ dans les cellules pyramidales. Des PPSIs de même nature ont été obtenus par stimulation antidromique des cellules pyramidales via les fibres commissurales, du septum et des fimbria *in vivo* (Andersen et al., 1964a,b) et via l'alvéus dans des tranches d'hippocampe *in vitro* (Dingledine et Langmoen, 1980). Deux étapes sont impliqués dans la genèse de cette inhibition rétrograde: (a) les cellules pyramidales excitent via leurs fibres collatérales récurrentes les interneurones; (b) les interneurones qui sont ainsi activés inhibent à leur tour, via leurs projections axonales locales, plusieurs cellules pyramidales (Andersen et al., 1964a,b). Dans ce type d'inhibition, un seul interneurone peut inhiber simultanément plusieurs cellules pyramidales, à cause de la divergence des ramifications synaptiques des interneurones.

2.1.2 L'inhibition antérograde

L'inhibition antérograde diffère de l'inhibition rétrograde en n'impliquant pas une activation des cellules pyramidales mais plutôt une excitation directe des interneurons par des afférences excitatrices. Ces afférences activent les interneurons qui inhibent ensuite les cellules pyramidales (Buzsaki, 1984; Turner, 1990). L'inhibition antérograde implique donc l'activation des afférences excitatrices (les fibres collatérales de Schaffer, les fibres commissurales et associationnelles) et non celle des cellules pyramidales comme point de départ. Les PPSIs générés par stimulation des afférences excitatrices sont complexes du fait que la majorité des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe reçoivent les mêmes afférences excitatrices que les cellules pyramidales (Andersen et al., 1964b, 1969) mais leur seuil d'activation est plus faible que celui des cellules pyramidales (Knowles et Schwartzkroin, 1981; Lacaille et al., 1987).

2.2 L'inhibition polysynaptique

La stimulation électrique des fibres collatérales de Schaffer et/ou des fibres commissurales évoque une réponse multiphasique dans les cellules pyramidales (Newberry and Nicoll, 1984b; Alger, 1984; Nicoll et al., 1990). Cette réponse est constituée de 3 composantes: un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE), suivi d'un PPSI biphasique composé d'un PPSI précoce (ou rapide) et d'un PPSI tardif (ou lent). Le PPSE provient de l'activation des récepteurs au glutamate de type N-méthyl-D-Aspartate (NMDA) et non-NMDA (Collingridge et al., 1988; Andreasen et al., 1989). Les PPSIs précoces proviennent de l'activation du circuit d'inhibition

rétrograde et/ou antérograde (Alger et Nicoll, 1982; Alger, 1984; Knowles et al., 1984) alors que les PPSIs tardifs proviennent du circuit d'inhibition antérograde (Newberry et Nicoll, 1984b; Alger, 1984; Knowles et al., 1984).

2.2.1 Le PPSI précoce ou rapide dans l'hippocampe

Le PPSI précoce (rapide) résulte de la liaison du GABA au récepteur de type $GABA_A$ (Tableau 1) qui est un canal sélectif au Cl^- (Alger et Nicoll, 1982a; Knowles et al., 1984). Pour les cellules pyramidales de l'hippocampe, cette ouverture des canaux Cl^- cause une hyperpolarisation rapide de la membrane qui a un potentiel d'équilibre au voisinage de $-70mV$ (Alger et Nicoll, 1982a). Le PPSI précoce peut être dépolarisant si le potentiel de repos de la membrane cellulaire est plus négatif que le potentiel d'équilibre du Cl^- (E_{Cl}) ou si le gradient transmembranaire de Cl^- est inversé en utilisant une électrode intracellulaire contenant une concentration élevée de KCl. Le PPSI précoce polysynaptique se distingue par sa haute conductance (~ 20 pS, Segal et Barker, 1984a) et leur courte durée (environ 100ms; Knowles et al., 1984; Alger et Nicoll, 1982a). La bicuculline, un antagoniste compétitif des récepteurs $GABA_A$, et la picrotoxine, un bloqueur non-compétitif des canaux $GABA/Cl^-$ abolissent les PPSI précoces (Alger et Nicoll, 1982a; Knowles et al., 1984). Les PPSIs rapides, hyperpolarisants ou dépolarisants, inhibent les potentiels d'action par un effet de "shunt" sur la membrane (Connors et al., 1988; Weiss et Hablitz, 1984).

2.2.2 Le PPSI tardif ou lent dans l'hippocampe

Le PPSI tardif (lent) se distingue par une plus faible conductance (~ 10 nS, Hablitz et Thalmann, 1987) et une plus longue durée (600-1000ms; Newberry et Nicoll, 1984; Thalmann, 1984; Hablitz et Thalmann, 1987; Nathan et al., 1990). Le potentiel d'équilibre du PPSI tardif se situe au voisinage du potentiel d'équilibre du K^+ , ($E_K, \sim -90$ mV) et varie en fonction de la concentration extracellulaire du K^+ (Nicoll et Alger, 1981; Thalmann et Ayala, 1982). Le PPSI tardif est antagonisé par certains bloqueurs des canaux K^+ tel le Ba^{2+} extracellulaire (Newberry et Nicoll, 1984b), le Cs^+ intracellulaire (Alger, 1984), et le QX-314 intracellulaire (Nathan et al., 1990). Le PPSI tardif est causé par l'activation des récepteurs $GABA_B$ (Tableau 1) puisqu'il est sensible aux antagonistes $GABA_B$ comme le phaclofen (Dutar et Nicoll, 1988), saclofen (Lambert et al., 1989), CGP35348 (Olpe et al., 1990), et CGP55845A (Jarolimek et al., 1993). Alors que le rapide décours du PPSI précoce est attribué à l'activation de canaux ioniques (Cl^-) par le GABA, le lent décours temporel du PPSI tardif s'explique par le temps impliqué dans l'activation de récepteurs métabotropes $GABA_B$, de protéines G, et l'ouverture de canaux K^+ (Thalmann, 1988). Ainsi, l'inactivation de protéines G par la toxine pertussis (Andrade et al., 1986) ou le $GTP\gamma S$ (Andrade et al., 1986) diminue l'amplitude des PPSIs tardifs. Malgré sa faible conductance, le PPSI tardif tempère efficacement les réponses excitatrices prolongées par son effet hyperpolarisant sur le potentiel membranaire (Hablitz et Thalmann, 1987; Davies et al., 1991).

2.3 Les PPSIs observés dans les autres régions du cerveau

Des PPSI précoces et tardifs similaires à ceux démontrés dans l'hippocampe ont été observés dans les cellules du néocortex de plusieurs espèces, tel le rat (Connors et al., 1988), le chat (Connors et al., 1988), le cobaye (Deisz et Prince, 1989) et l'homme (McCormick, 1989), ainsi que dans les cellules de projection du noyau géniculé du thalamus du chat (Soltesz et al., 1988). Dans ces cellules, une stimulation des fibres afférentes génère ainsi une réponse multiphasique dans les cellules principales: un PPSE suivi d'un PPSI précoce (rapide) et d'un PPSI tardif (lent). Ces PPSIs précoces sont associés avec l'ouverture des canaux Cl^- (Thompson et al., 1988a) et ont un potentiel d'équilibre près de -70 à -75mV . Les PPSIs tardifs sont associés avec l'activation des conductances K^+ et leur potentiel d'équilibre se situe près de -80 à -90mV . L'antagoniste des récepteurs GABA_A , la bicuculline, bloque ces PPSIs précoces (Connors et al., 1988; McCormick, 1989), tandis que les antagonistes des récepteurs GABA_B , tel le phaclofen, le CGP35348, réduisent les PPSIs tardifs (Karlsson et al., 1988; Deisz et al., 1997).

Les PPSIs précoces et tardifs produisent ainsi la majorité des inhibitions rapides dans le cerveau (Nicoll et al., 1990; Sivilotti et Nistri, 1991).

2.4 Les PPSIs monosynaptiques

Les PPSIs précoces et tardifs peuvent être étudiés en isolation en bloquant pharmacologiquement les synapses excitatrices (Davies et al., 1990). En présence d'antagonistes des récepteurs non-NMDA et NMDA, une stimulation électrique

proximale excite directement les interneurons inhibiteurs et évoque ainsi des PPSIs monosynaptiques biphasiques dans les cellules pyramidales (Davies et al., 1990). Les PPSIs monosynaptiques apparaissent avec une plus courte latence (environ quelques ms) puisqu'ils ne sont pas précédés d'un PPSE. Ils sont composés d'un PPSI précoce et d'un PPSI tardif ayant les mêmes caractéristiques que leurs homologues polysynaptiques. Ces PPSIs précoces ont un potentiel d'équilibre près de celui du Cl⁻ (-60 à -70mV), sont sensibles aux antagonistes des récepteurs GABA_A, et sont de courte durée (entre 200 et 300 ms) (Davies et al., 1990). Les PPSIs monosynaptiques tardifs ont un potentiel d'équilibre près de celui du K⁺ (entre -85 et -100mV), sont sensibles aux antagonistes GABA_B et sont de plus longue durée (entre 300 et 1000ms) (Hablitz et Thalmann, 1987; Davies et al., 1990).

3.0 Les PPSIs évoqués par l'acide glutamique

Biscoe et Straughan (1966) ont démontré que le L-glutamate excite les neurones de l'hippocampe in vivo. D'autres travaux sur des tranches d'hippocampe in vitro ont rapporté que les cellules pyramidales de l'hippocampe étaient excitées par le glutamate (Dudar, 1974; Schwartzkroin et Andersen, 1975) et des agonistes sélectifs des récepteurs au glutamate de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA), et non-NMDA (Collingridge et al., 1983). Les interneurons peuvent être stimulés chimiquement par l'application locale du glutamate dans les couches dendritiques, évoquant des PPSIs dans les cellules pyramidales du CA1 (Taube et Schwartzkroin, 1987; Madison et Nicoll, 1988). Les PPSIs évoqués ainsi par le glutamate (glut-

PPSIs) sont généralement monophasiques, de faible amplitude, avec un temps de montée lent (environ 100 ms) et une longue durée (environ 300-400 ms) et sont supprimés par la tétródotoxine, suggérant qu'ils proviennent de la décharge d'interneurones excités par le glutamate (Taube et Schwartzkroin, 1987; Williams et Lacaille, 1990; Samulack et al., 1993).

Les récepteurs GABA et les conductances ioniques qui produisent les glut-PPSIs diffèrent selon les sous-types d'interneurones activés. Les PPSIs résultant de l'application du glutamate dans le stratum lacunosum-moleculare, ont un potentiel d'inversion de -75mV et donc près de E_{Cl} , mais sont insensibles aux antagonistes des récepteurs GABA_A, la bicuculline et la picrotoxine (Williams et Lacaille, 1990; 1992). L'application locale de l'antagoniste des récepteurs GABA_B, le 2-OH saclofen, réduit ces glut-PPSIs, suggérant qu'ils sont médiés par des récepteurs GABA_B (Williams et Lacaille, 1992). Les glut-PPSIs résultant de l'application du glutamate dans le stratum pyramidale affichent un potentiel d'équilibre d'environ -70mV, semblable au potentiel d'équilibre du PPSI précoce évoqué dans la même cellule (Samulack et al., 1993) et sont diminués par la bicuculline (Samulack et al., 1993). Les glut-PPSIs évoqués par l'application de glutamate dans le stratum pyramidale sont donc médiés par des récepteurs GABA_A seulement. Finalement, les glut-PPSIs évoqués par l'application de glutamate dans la couche oriens/alveus sont réduits en partie par des antagonistes GABA_A et GABA_B et ont donc deux composantes: une majeure d'origine GABA_A et une mineure d'origine GABA_B (Samulack et Lacaille, 1993).

Ces résultats suggèrent que les PPSIs rapides GABA_A et les PPSIs lents GABA_B peuvent provenir de la stimulation de distincts sous-types d'interneurones et que les récepteurs GABA_A et GABA_B ne sont pas nécessairement localisés aux mêmes synapses.

4.0 Les PPSI spontanés de type GABA_A

Paul Fatt et Bernard Katz (1952) ont découvert des réponses synaptiques spontanées de faible amplitude dans les fibres musculaires. En raison de leur similarité aux potentiels postsynaptiques excitateurs de plaque (*epp*), ils sont appelés potentiels postsynaptiques excitateurs de plaque miniatures (*mepps*). A la jonction neuromusculaire, les *mepps* sont observés à des intervalles aléatoires d'environ 1 par seconde. Les *mepps* découlent de la libération spontanée d'un quanta d'acétylcholine (ACh).

Des réponses synaptiques spontanées miniatures sont aussi observées dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Brown et al., 1979). Les réponses postsynaptiques spontanées inhibitrices sont de faible amplitude (environ -2mV; Alger et Nicoll, 1980a) et leur fréquence varie entre 0.1-5 Hz (Collingridge et al., 1984; Bergles et al., 1996). Ces courants/potentiels postsynaptiques inhibiteurs spontanés (sCPSI/sPPSI) résultent de potentiels d'action dans les fibres GABAergiques (Alger et Nicoll, 1980a; Collingridge et al., 1984). Les sPPSIs sont médiés par l'activation des récepteurs GABA_A /canaux Cl⁻ puisqu'ils sont supprimés par l'antagoniste GABA_A, la bicuculline (Alger et Nicoll, 1980a). Ces sPPSIs sont

difficilement détectables, puisque le potentiel d'équilibre du Cl^- diffère peu du potentiel de repos, mais sont facilement mis en évidence en inversant le gradient Cl^- par l'injection intracellulaire de Cl^- au moyen d'une microélectrode (Alger et Nicoll, 1980a)

La libération spontanée de GABA à partir d'interneurones s'effectue par deux mécanismes: 1) dépendant des potentiels d'action présynaptiques ou, 2) par exocytose spontanée de quanta de GABA (Edwards et al., 1990). Les sPPSIs dépendant des potentiels d'action sont abolis par la tétrodotoxine (TTX), un bloqueur des canaux Na^+ voltage-dépendants, (Brown et al., 1979; Alger et Nicoll, 1980). Des CPSIs persistent en présence de la TTX et sont appelés CPSIs miniatures (mCPSIs), par analogie avec les *mepps* de la jonction neuromusculaire. Les mCPSIs ont une décroissance monoexponentielle avec une constante de temps d'environ 5-15ms (Collingridge et al., 1984). Grâce à leur faible niveau de bruit et de courants de fuite, les techniques d'enregistrement de patch-clamp en configuration cellule entière permettent une détection optimale des s/mCPSIs (Edwards et al., 1990; Otis et al., 1991).

5.0 Les PPSIs spontanés de type GABA_B

Le GABA libérée de façon spontanée n'active généralement pas les récepteurs GABA_B . Dans l'hippocampe, l'activation des récepteurs GABA_B postsynaptiques exigerait un niveau plus intense de stimulation électrique ou d'activation d'interneurones (Otis et Mody, 1992). Des PPSIs spontanés dûs à

l'activation de récepteurs GABA_B peuvent être induits dans les cellules granulaires de l'hippocampe en élevant la concentration extracellulaire de K⁺ (6.5-10.5mM KCl) (Piguet, 1993). Par contre, dans l'aire tegmentaire ventrale et le noyau latéral de l'amygdale, des PPSIs spontanés médiés par les récepteurs GABA_B ont été observés par Sugita et al., (1992). Les potentiels synaptiques de courte durée (30-50ms) étaient d'origine GABA_A puisqu'ils étaient sensibles à la bicuculline tandis que ceux de longue durée (100-200ms) résultaient de l'activation des récepteurs GABA_B, puisqu'ils étaient supprimés par le 2-OH-saclofen.

5.1 Les PPSIs spontanés de type GABA_B induits par la 4-Aminopyridine

Les aminopyridines sont des composés connus pour leurs actions potentialisatrices aux synapses excitatrices et inhibitrices (Lemeignan, 1972; Jankowska et al., 1977; Lundh et Thesleff, 1977). Dans l'hippocampe, la 4-aminopyridine (4-AP) bloque certains canaux K⁺ dépendants du voltage, notamment le courant transitoire I_A et le courant à inactivation lente I_D (Storm, 1990). L'application de la 4-AP à des tranches d'hippocampe génère des réponses postsynaptiques mixtes (PPSE et PPSI) spontanées et de grande amplitude, et potentialise les réponses évoquées par stimulation électrique (Buckle et Haas, 1982; Voskuyl et Albus, 1985; Segal, 1987; Avoli et al., 1988). La 4-AP augmente la libération du neurotransmetteur par une combinaison de facteurs: 1- une prolongation des potentiels d'action présynaptique attribuée au blocage des conductances K⁺ repolarisantes (Haas et al., 1983), 2- une modulation positive des

canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Rogawski et Barker, 1983), 3- une synchronisation des interneurons inhibiteurs (Michelson et Wong, 1994).

A faible concentration (micromolaire), la 4-AP affecte préférentiellement les cellules GABAergiques de l'hippocampe (Michelson et Wong, 1994). En présence de la 4-AP, un bloqueur de certains canaux K^+ dépendants du voltage, ces interneurons subissent une dépolarisation et produisent des décharges synchrones en bouffée dues à plusieurs mécanismes: 1- des interactions synaptiques dépolarisantes entre interneurons résultant d'une activation soutenue des récepteurs GABA_A et une inversion du gradient chlore au niveau dendritique (voir section 6.2) et, 2- leur couplage électrotonique via des jonctions électriques (Michelson et Wong, 1994). Tout comme les PPSIs monosynaptiques, les PPSIs induits par la 4-AP sont composés d'un PPSI rapide, médié par l'activation des récepteurs GABA_A , suivi d'un PPSI lent causé par l'activation des récepteurs GABA_B (Perreault et Avoli, 1989; Segal, 1987). Les PPSIs rapides induits par la 4-AP possèdent, en plus, une composante dépolarisante (Avoli et al., 1988) résultant d'une stimulation soutenue des récepteurs GABA_A dendritiques due à une libération augmentée de GABA (Staley et al., 1995; voir section 6.2). En présence d'antagonistes de récepteurs GABA_A , NMDA et non-NMDA, une faible concentration de 4-AP induit des PPSIs lents de grande amplitude (15mV) et apparaissent à une fréquence de 0.2-2Hz dans les cellules granulaires de l'hippocampe (Jarolimek et Misgeld, 1993). Le potentiel d'équilibre de ces PPSIs_B est près de -100mV, donc près du potentiel d'équilibre du K^+ (Jarolimek et Misgeld, 1993). Ces PPSIs induits par la 4-AP impliquent

l'activation des récepteurs GABA_B puisqu'ils sont bloqués par l'antagoniste des récepteurs GABA_B, le CGP55845A (Jarolimek et al., 1993).

6.0 Mécanismes postsynaptiques du récepteur GABA_A

Dans l'hippocampe, l'inhibition synaptique via les récepteurs GABA_A implique normalement une hyperpolarisation rapide (Andersen et al., 1964a,b). Par contre, dans certaines conditions, l'activation des récepteurs postsynaptiques GABA_A produit une dépolarisation des cellules pyramidales (Andersen et al., 1980).

6.1 Mécanismes postsynaptiques de l'hyperpolarisation GABA_A

Le récepteur GABA_A est une protéine transmembranaire composée de plusieurs sous-unités formant un canal central sélectif au Cl⁻ (Schofield et al., 1987). Le récepteur GABA_A est membre de la superfamille des récepteurs-canaux à ligand et donc partage certaines similarités structurales et fonctionnelles avec les récepteurs/canaux nicotiniques de l'acétylcholine, 5-HT₃ de la sérotonine et glycinergiques (Schofield et al., 1987). C'est un récepteur constitué d'une protéine hétéro-pentamérique formée à partir d'une combinaison de sous-unités transmembranaires (α, β, γ , et δ) (Olsen et Tobin, 1990). Chaque sous-unité a été clonée et se manifeste dans le cerveau sous plusieurs isoformes ($\alpha_{1-6}, \beta_{1-4}, \gamma_{1-3}, \delta$) (Tableau 1) (MacDonald et Olsen, 1994).

Une très grande hétérogénéité de récepteurs GABA_A est observée et provient de différentes permutations de diverses sous-unités (mais incluant toujours α, β et γ).

Ces sous-unités (α, β, γ , et δ) sont exprimées dans les neurones de l'hippocampe (McKernan et Whiting, 1996). La liaison de deux molécules de GABA au complexe récepteur/canal GABA_A déclenche l'ouverture du canal Cl⁻ qui est doté d'une haute conductance (30pS, Bormann et al., 1987). Le muscimol est un agoniste sélectif des récepteurs GABA_A (DeFeudis, 1982; Brehm et al., 1972), la bicuculline est un antagoniste compétitif des récepteurs GABA_A (Curtis and Johnston, 1974; Curtis et al., 1972) et la picrotoxine est un bloqueur non-compétitif des canaux GABA_A/Cl⁻ (Curtis et al., 1969; Crossman et al., 1973).

Dans l'hippocampe, l'activation des récepteurs GABA_A produit donc, normalement, une hyperpolarisation via l'entrée du Cl⁻ (Andersen et al., 1980). Par contre, deux types de CPSI_A monosynaptiques GABA_A ont été mis en évidence dans les cellules pyramidales du CA1 de l'hippocampe, ayant des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques distinctes (Pearce, 1993; Pearce et al., 1995). La première réponse, appelée GABA_{A, rapide}, est évoquée par la stimulation des fibres inhibitrices près du corps cellulaire. Cette réponse décroît rapidement (3-8 ms) et est antagonisée par le furosémide. La deuxième réponse, appelée GABA_{A, lent}, est évoquée par stimulation des fibres inhibitrices dans les couches dendritiques apicales. Elle affiche un temps de décroissance lent (30-70 ms) et une insensibilité au furosémide. De plus, ces deux réponses synaptiques montrent une différence de sensibilité à la bicuculline. Ces données suggèrent une hétérogénéité de canaux GABA_A dans les cellules pyramidales (Pearce, 1993) et qui pourrait être associée spécifiquement à certaines synapses GABAergiques (Ouardouz et Lacaille, 1997).

6.2 Mécanismes postsynaptiques de la dépolarisation GABA_A

Dans plusieurs circonstances, chez l'animal mature, des réponses dépolarisantes GABA_A ont été observées dans les cellules pyramidales de l'hippocampe: i) l'application locale du GABA dans les couches dendritiques d'une cellule pyramidale (Andersen et al., 1980), ii) lors d'une stimulation orthodromique intense ou répétitive (200Hz) (Grover et al., 1993), et iii) lors d'une stimulation orthodromique en présence d'agents qui modulent les récepteurs GABA_A (barbituriques: Alger et Nicoll, 1982b) ou qui augmentent la libération du GABA (4-aminopyridine: Avoli et al., 1988; ou Zn²⁺: Xie et Smart, 1991). Ces réponses dépolarisantes sont médiées par des récepteurs GABA_A puisque la bicuculline les supprime (Andersen et al., 1980; Alger et Nicoll, 1982b; Grover et al., 1993).

Chez le nouveau-né, le GABA, semble jouer un rôle de neurotransmetteur excitateur durant le développement du cerveau. Ben-Ari et al., (1989) ont observé, durant la première semaine après la naissance, des dépolarisations spontanées géantes dans les neurones pyramidales du CA3, médiées par les récepteurs-canaux GABA_A/Cl⁻. Les neurones à ce stade de développement semblent nécessiter un certain niveau de dépolarisation et une concentration accrue de Ca²⁺ intracellulaire pour stimuler le développement des neurites (Cherubini et al., 1991). Par ailleurs, les dépolarisations GABA_A semblent jouent un rôle dans la plasticité de la transmission synaptique à ce stade de développement, via leur action sur l'entrée du Ca²⁺ par les canaux Ca²⁺ et les canaux NMDA (Ben-Ari et al., 1997). Après la première semaine, l'action du GABA via l'activation des récepteurs GABA_A devient hyperpolarisante

(Ben-Ari et al., 1989)

Le potentiel d'équilibre des réponses dépolarisantes GABA_A se situe aux environs de -40mV (Andersen et al., 1980). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les mécanismes ioniques de ce courant GABA_A dépolarisant. Pour expliquer la réponse hyperpolarisante au niveau somatique et dépolarisante au niveau dendritique, il a été proposé que E_{Cl^-} est plus négatif que le potentiel de repos au niveau du soma et plus positif au niveau des dendrites (Misgeld et al., 1986). Cependant, il a été montré lors d'enregistrements extra et intracellulaires que les réponses GABA hyperpolarisantes et dépolarisantes se manifestent au niveau des dendrites (Alger et Nicoll, 1982b; Lambert et al., 1991b).

Des travaux sur les fibres musculaires de crustacés (Kaila et Voipio, 1987) et sur les neurones spinaux de souris (Bormann et al., 1987) ont démontré que les canaux Cl⁻ activés par le GABA sont aussi perméables aux ions HCO₃⁻, avec un rapport de perméabilité HCO₃⁻/Cl⁻ de 0.2. Se basant sur la perméabilité du canal GABA_A au HCO₃⁻, Staley et al. (1995) ont proposé que la réponse biphasique évoquée par stimulation répétitive ou par application de GABA est due à une stimulation intense des récepteurs GABA_A qui résulte en une dissipation du gradient Cl⁻. L'activation des récepteurs GABA_A cause premièrement une entrée du Cl⁻ et l'hyperpolarisation de membrane. L'activation soutenue des récepteurs GABA_A produit ensuite une accumulation de Cl⁻ dans le volume restreint du compartiment dendritique et un effondrement graduel du gradient Cl⁻. Le changement de gradient Cl⁻ déplace E_{Cl} vers un potentiel membranaire plus dépolarisé. Cependant, le

gradient HCO_3^- vers l'extérieur est maintenu, dû à la régénération rapide des ions HCO_3^- intracellulaires et la disparition des ions HCO_3^- extracellulaire par l'action de l'enzyme anhydrase carbonique. A ce stade, le courant GABA consiste donc d'ions Cl^- et HCO_3^- sortant et la réponse est donc dépolarisante. Le courant GABA varie donc en fonction du temps et de l'intensité de stimulation des récepteurs GABA_A .

6.3 Les récepteurs GABA_C

Un troisième sous-type de récepteur GABA, pharmacologiquement distinct des récepteurs GABA_A et GABA_B , a été identifié dans la rétine des vertébrés (Qian et Dowling, 1993, 1994). N'étant sensible, ni à la bicuculline, ni au baclofen, ce nouveau récepteur a été appelé GABA_C (Tableau 1). Les récepteurs GABA_C incorporent un canal Cl^- , sensible à la picrotoxine, mais sont différents des récepteurs GABA_A par leur plus grande sensibilité au GABA, leur temps d'ouverture plus long, et leur petite conductance (7 pS, Feigenspan et al., 1993).

Polenzani et al. (1991) ont été les premiers à exprimer les récepteurs GABA_C dans des ovocytes de Xénope. Par la suite, Cutting et al. (1991, 1992) ont cloné les deux sous-unités $\rho 1$ et $\rho 2$ qui forment le canal Cl^- de ce récepteur et qui ont 30-38% d'homologie avec les sous-unités α, β, γ et δ des récepteurs GABA_A . Les récepteurs GABA_C sont pharmacologiquement différents des récepteurs GABA_A . Ils sont insensibles aux benzodiazépines et aux barbituriques mais sont activés par le muscimol et l'acide trans-4-aminocrotinique (TACA) (Johnston, 1997).

7.0 Mécanismes postsynaptiques du récepteur GABA_B

Les récepteurs GABA_B sont présents dans les systèmes nerveux central et périphérique (Bowery, 1993; Bowery et al., 1981). Ils peuvent être couplés à des conductances Ca²⁺ ou K⁺. Dunlap (1981) a découvert que l'activation des récepteurs GABA_B par le baclofen réduisait la composante Ca²⁺ des potentiels d'actions somatiques dans les neurones sensoriels du ganglion de la racine dorsale en culture. Il a été démontré subséquemment que cette activation des récepteurs GABA_B réduisait directement les courants Ca²⁺ (Dolphin et Scott, 1987). La réduction des courants Ca²⁺ par le baclofen est inhibée par la toxine pertussis et le GDPβS (Holz et al., 1986) et potentiée par le GTPγS (Scott et Dolphin, 1986) suggérant l'implication des protéines G dans cette réponse. Ni l'AMP cyclique, la forskoline, un activateur ou un inhibiteur de la PKC, ou l'acide arachidonique n'affectent la réponse au baclofen (Holz et al., 1986; Dolphin et al., 1989). De plus, lors d'enregistrement en mode "cell-attached", l'application de baclofen à l'extérieur de la pipette d'enregistrement n'a aucun effet sur les courants Ca²⁺, alors que la même application de baclofen, à l'intérieur de la pipette inhibe les courants Ca²⁺ (Green et Cottrell, 1988). Ces résultats suggèrent que les protéines G agissent directement sur les canaux Ca²⁺ sans impliquer d'autres messagers secondaires diffusibles. Récemment, il a été démontré que l'inhibition des canaux Ca²⁺ par les protéines G impliquent une interaction directe des sous-unités G_{βγ} des protéines G avec la boucle I-II intracellulaire de la sous-unité α₁ des canaux calciques (Ikeda, 1996; Qin et al., 1997).

Dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe en culture, l'activation des récepteurs GABA_B par le baclofen module aussi négativement les courants Ca²⁺ (Scholz et Miller, 1991). Cette réponse est supprimée par le 2-OH-saclofen et la toxine pertussis, mais potentialisée par le GTPγS, impliquant donc les récepteurs GABA_B et les protéines G (Scholz et Miller, 1991).

En plus de la modulation négative des canaux Ca²⁺, l'activation des récepteurs GABA_B hyperpolarise les cellules pyramidaux de l'hippocampe en augmentant une conductance K⁺ (Newberry et Nicoll, 1984a,b). L'activation des récepteurs GABA_B hyperpolarise une variété d'autres neurones dans le SNC, tel que ceux du néocortex (Deisz et Prince, 1989), locus coeruleus (Shefner et Osmanovic, 1991), thalamus (Soltesz et al., 1988), noyau suprachiasmatique (Jiang et al., 1995), noyau accumbens (Uchimura et North, 1991), et substance noire (Lacey et al., 1988).

7.1 Mécanismes postsynaptiques des hyperpolarisations GABA_B activés par le baclofen

Le baclofen, un dérivé β-chlorophenyl de l'acide γ-aminobutyrique (GABA), est l'agoniste prototypique des récepteurs GABA_B (Tableau 1). Dans l'hippocampe, l'application locale du baclofen, ou du GABA, en présence d'antagonistes GABA_A, hyperpolarise directement les cellules pyramidaux puisque cette réponse persiste lors de l'addition de la tétrodontoxine ou du cadmium (Newberry et Nicoll, 1984a,b; 1985; Gähwiler et Brown, 1985). L'hyperpolarisation

est attribuée à l'ouverture des canaux K^+ pour les raisons suivantes: 1- le potentiel d'équilibre de la réponse au baclofen correspond au potentiel d'équilibre du K^+ (Newberry et Nicoll, 1984a), 2- le potentiel d'équilibre de la réponse change en fonction de $[K^+]_o$ selon l'équation de Nernst, mais pas de $[Cl^-]_o$ (Newberry et Nicoll, 1984a) et, 3- la réponse induite par le baclofen est supprimée par les bloqueurs des canaux K^+ comme le Ba^{2+} extracellulaire et le Cs^+ intracellulaire (Gähwiler et Brown, 1985). L'augmentation des conductances K^+ induite par le baclofen n'est pas accompagnée de réduction de courants Ca^{2+} dans les cellules pyramidales du CA3 dans les cellules d'hippocampe en culture (Gähwiler et Brown, 1985).

L'ouverture des conductances K^+ par le baclofen s'effectue via l'activation de protéines G puisque les réponses au baclofen sont bloquées dans les cellules traitées à la toxine pertussis (Andrade et al., 1986; Thalmann, 1987) ou lors d'application intracellulaire de $GTP\gamma S$ (Thalmann, 1988) ou de $GDP\beta S$ (Andrade et al., 1986). Le mécanisme de couplage des protéines G aux canaux K^+ demeure controversé. Certains auteurs ont observé que l'activation des récepteurs $GABA_B$ par le baclofen induisait une inhibition de l'activité basale de l'adénylyl cyclase dans le cerveau de rat (Wojcik et Neff, 1984), cependant, l'AMPc ne semble pas être impliqué dans la transduction du courant I_{bac} (Andrade et al., 1986).

L'augmentation de l'AMPc par stimulation directe de l'adénylyl cyclase par la forskoline, l'application intracellulaire d'AMPc ou extracellulaire de 8-bromo-AMPc ne réduisent pas le courant I_{bac} mais bloquent le courant I_{AHP} (Andrade et al.,

1986). Ces résultats suggèrent que l'activation des récepteurs GABA_B ouvrent des canaux K⁺ qui sont couplés directement aux protéines G.

La relation courant-voltage du courant I_{bac} affiche parfois une rectification entrante marquée dans les cellules pyramidales en culture (Gähwiler et Brown, 1985) ou dans les tranches d'hippocampe (Inoue et al, 1985a; Ogata et al., 1987). Par contre, la relation courant-voltage de canaux K⁺ unitaires activés par le baclofen démontre une rectification sortante dans les neurones en culture (Premkumar et al., 1990a; Wagner et Dekin, 1993). Ces différentes propriétés de rectification suggèrent que le baclofen active une variété de canaux K⁺.

L'hyperpolarisation via l'ouverture de canaux K⁺ par le baclofen est produite par les récepteurs GABA_B puisqu'elle est complètement bloquée par les antagonistes GABA_B (Dutar et Nicoll, 1988a).

7.2 Mécanismes postsynaptiques GABA_B activés par le GABA

L'application du GABA, en présence d'antagonistes de récepteurs GABA_A, suscite une réponse (non-GABA_A) hyperpolarisante semblable à celle du baclofen (Newberry et Nicoll, 1985; Ogata et al., 1987). Dans ces conditions, le GABA active des conductances K⁺ puisque le potentiel d'équilibre de cette réponse (E_{GABA}) s'approche de celui du K⁺ et celui de la réponse au baclofen (Ogata et al., 1987; Newberry et Nicoll, 1985). Le GABA et le baclofen activent les mêmes conductances K⁺ puisque les réponses au GABA sont occluses suite à l'activation de conductances K⁺ par le baclofen (Dutar et Nicoll, 1988).

Par contre, certaines différences entre les réponses produites par le baclofen et le GABA suggèrent la présence de différents types de récepteurs GABA_B couplés aux conductances K⁺. Premièrement, certains antagonistes GABA_B comme le phaclofen (Dutar et Nicoll, 1988b; Müller et Misgeld, 1989), le 2-OH-saclofen (Solis et al., 1992b; Jarolimek et al., 1994), et le CGP35348 (Solis et Nicoll, 1992a), bloquent plus efficacement les réponses au baclofen que celles induites par le GABA. De plus, une hétérogénéité semble exister au niveau du mécanisme de transduction entre les récepteurs GABA_B et les canaux K⁺ car les réponses au baclofen sont réduites par l'agoniste cholinergique carbachol tandis que les réponses au GABA ne le sont pas (Müller et Misgeld, 1989). Finalement, les conductances potassiques liées aux récepteurs GABA_B semblent aussi être hétérogènes puisque la 4-aminopyridine (4-AP) bloque la réponse au baclofen mais non celle au GABA (Ogata et al., 1987). De plus, les PPSIs GABA_B induits par la 4-AP sont partiellement insensibles aux ions Cs⁺ tandis que les réponses au baclofen sont bloquées par le Cs⁺ (Jarolimek et al., 1994). Finalement, les PPSIs GABA_B produits par la stimulation d'interneurones via l'application de glutamate dans le stratum lacunosum-moleculare ne sont pas bloqués par le Ba²⁺, alors que les PPSIs tardifs stimulés électriquement le sont (Williams et Lacaille, 1992).

Ces différences de sensibilité aux antagonistes GABA_B, modulateurs cholinergiques, et bloqueurs de canaux potassiques suggèrent donc une hétérogénéité au niveau des récepteurs GABA_B et de leurs conductances potassiques.

7.3 Structure du récepteur GABA_B

Les récepteurs GABA_B ont été clonés par Kaupmann et al. (1997). Se servant de l'antagoniste GABA_B radioactif, le [¹²⁵I] CGP64213, ils ont identifié le cortex et le cervelet comme tissu pour construire la bibliothèque d'ADN complémentaire. Un premier clone d'ADN complémentaire de 4.4Kbases était identifié. Le clone, exprimé dans les cellules COS-1, correspond à une protéine GABA_BR1a (960 acides aminés). Une deuxième recherche, par technique d'hybridation avec l'ADN complémentaire de GABA_BR1a, a mené à l'identification d'un deuxième clone d'ADN complémentaire de 2.9KBases. Ce deuxième clone correspond à la protéine GABA_BR1b (844 acides aminés) (Tableau 1). Les récepteurs clonés affichent plusieurs propriétés pharmacologiques et biochimiques semblables à celles des récepteurs GABA_B natifs. Exprimés dans les cellules COS-1/HEK293, les récepteurs présentent la même sensibilité aux antagonistes CGP5699A et CGP54626A et aux agonistes GABA, 3-APPA et (-) baclofen. De plus, l'activation de ces récepteurs inhibe l'adénylyl cyclase via les protéines G. Ces récepteurs GABA_B sont monomériques, composés de sept boucles transmembranaires et très homologues aux récepteurs mGluR.

8.0 Les récepteurs GABA_B présynaptiques

La libération de neurotransmetteur est régulée par des mécanismes présynaptiques impliquant des récepteurs membranaires présynaptiques situés sur les terminaisons axonales (Starke et al., 1989). On distingue les autorécepteurs des

hétérorécepteurs selon que l'agoniste endogène de ces récepteurs présynaptiques soit le neurotransmetteur libéré par le neurone lui-même (autorécepteur) ou un autre neurotransmetteur libéré par un autre neurone (hétérorécepteur). Les autorécepteurs GABA_B ont été mis en évidence sur les terminaisons nerveuses périphériques (Bowery et al., 1981) et centrales (Bowery et al, 1980). Leur activation cause une réduction de libération du neurotransmetteur GABA. Par ailleurs, une réduction de neurotransmetteur autre que le GABA a été démontré via des hétéro-récepteurs GABA_B, telle la libération de dopamine (striatum, Bowery et al., 1980), sérotonine (cortex, Bowery et al., 1980) et glutamate (hippocampe, Lanthorn et Cotman, 1981).

8.1 Dépression de l'inhibition par stimulation répétée

Dans le néocortex et l'hippocampe, une diminution des PPSIs est observée lors d'une stimulation répétitive (Ben-Ari et al., 1979; McCarren et Alger, 1985; Deisz et Prince, 1989).

A basse fréquence (0.1 Hz), une stimulation répétitive polysynaptique n'affecte pas l'amplitude des PPSI_A et/ou PPSI_B (Deisz et Prince, 1989). Par contre, entre 0.5 et 2Hz, ces PPSIs sont atténués dès le deuxième stimulus. Après 5 stimulations à cette fréquence, l'amplitude des PPSIs se stabilise à un niveau réduit (Deisz et Prince, 1989). La dépression des PPSIs est attribuable à divers facteurs. Un des facteurs est la désensibilisation des récepteurs GABA postsynaptiques due à une exposition prolongée au GABA (Ben-Ari et al., , 1979). Un autre mécanisme est un changement des gradients ioniques Cl⁻ ou K⁺ associés aux PPSIs. Certains auteurs

ont observé un déplacement positif des potentiels d'équilibre du PPSI_A suite à une stimulation intense (10-100Hz) (Wong et Watkins, 1982; McCarren et Alger, 1985). Un tel déplacement positif du potentiel d'équilibre du Cl⁻ peut résulter de l'accumulation intracellulaire de Cl⁻, induite pendant une stimulation répétitive, et contribue à diminuer l'amplitude du PPSI_A. Deux types de résultats suggèrent que la dépression des PPSIs pourrait provenir d'une dépression présynaptique de la libération du GABA: 1- l'application du baclofen diminue l'amplitude du PPSI_A et/ou du PPSI_B, ainsi que leur conductance, sans affecter leur potentiel d'équilibre (Thompson et Gähwiler, 1989c; Deisz et Prince, 1989), et 2- l'application de l'acide nipécotique, un bloqueur de la recapture du GABA, potentialise la dépression des PPSIs évoqués à basse fréquence (Deisz et Prince, 1989). Ces données suggèrent une dépression présynaptique rétroactive via des autorécepteurs GABA_B.

Puisque le site d'action du baclofen est difficile à déterminer dans un circuit polysynaptique, Davies et al. (1990) ont introduit un paradigme de double stimulation de PPSIs monosynaptiques. Cette stimulation pairée cause une dépression du deuxième PPSI_{A/B} par rapport aux premiers PPSIs (Davies et al., 1990; Mott et Lewis, 1993). La dépression des PPSIs précoces et tardifs monosynaptiques varie en fonction de l'intervalle interstimulus et de l'intensité de la stimulation. Elle est maximale pour un intervalle entre 100-400ms et disparaît à des intervalles dépassant 5-10s (Davies et al., 1990; Mott et al., 1993). La réduction de l'amplitude des PPSIs monosynaptiques est accompagnée d'une réduction de leur conductance alors que leur potentiel d'équilibre est inchangé (Davies et al., 1990).

De plus, la cinétique des PPSIs monosynaptiques est aussi inchangée suggérant que la dépression est causée par une diminution de libération de GABA (Nathan et Lambert, 1991; Otis et Mody, 1992). Par ailleurs, la dépression des PPSIs monosynaptiques induite par stimulation pairée n'est pas affectée par l'injection de QX-314 (bloqueur des canaux K^+ couplés aux récepteurs $GABA_B$ postsynaptiques), confirmant ainsi l'origine présynaptique de la dépression (Nathan et Lambert, 1991).

La dépression des PPSIs par stimulation pairée résulte de l'activation de récepteurs $GABA_B$. L'application du baclofen et du GABA réduit l'amplitude des PPSIs monosynaptiques (Nathan et Lambert, 1991; Davies et al., 1990; Deisz et Prince, 1989; Yoon et Rothman, 1991). De plus, l'application du baclofen bloque par occlusion la dépression induite par stimulation pairée (Davies et al., 1990; Mott et al., 1993). L'application du GABA exogène réduit aussi l'amplitude des PPSIs monosynaptiques. Finalement, la dépression des PPSIs par stimulation pairée est abolie par les antagonistes $GABA_B$, phaclofen, 2-OH-saclofen, CGP35348 (Davies et Collingridge, 1993) et CGP55845A (Davies et al., 1993). Ces résultats suggèrent que le GABA endogène, ainsi que le baclofen ou le GABA exogène diminuent la libération de GABA via l'activation des auto-récepteurs $GABA_B$ dans l'hippocampe.

Des hétérorécepteurs $GABA_B$ ont été mis en évidence sur les terminaisons glutamatergiques par Isaacson et al. (1993). Une brève stimulation tétanique (5 pulses, 50 Hz) des fibres collatérales de Schaffer et des fibres GABAergiques) cause une dépression d'une réponse synaptique excitatrice subséquentement produite 200ms plus tard. Cette dépression est supprimée par les antagonistes $GABA_B$

CGP35348 (Isaacson et al., 1993) et le CGP55845A (Davies et al., 1993), mais augmenté par le SKF89976A, un bloqueur de recapture du GABA, suggérant que la dépression de la réponse excitatrice est médiée par le GABA endogène qui diffuse aux terminaisons excitatrices et active des hétéro-récepteurs GABA_B (Isaacson et al., 1993). La présence d'hétérorécepteurs GABA_B sur les fibres collatérales de Schaffer, dans les cellules pyramidales du CA1, a aussi été suggérée par l'inhibition des PPSEs par le baclofen (Lanthorn et Cotman, 1981). L'effet inhibiteur du baclofen sur les réponses synaptiques excitatrices a été aussi démontré dans d'autres régions du cerveau, tel le néostriatum (Calabresi et al., 1990) et le néocortex (Howe et al., 1987).

8.2 Mécanismes GABA_B de la dépression présynaptique

Le mécanisme par lequel l'activation des récepteurs GABA_B induit la réduction de libération du neurotransmetteur (GABA ou glutamate) n'est pas complètement connu. L'activation des récepteurs GABA_B peut réduire la libération du neurotransmetteur en augmentant les conductances K⁺ (Newberry et Nicoll, 1985) ou en modulant positivement le courant I_{K(A)} qui réduit la durée du potentiel d'action (Saint et al., 1990). Par contre les expériences avec des bloqueurs de conductances K⁺ couplées aux récepteurs GABA_B, le Ba²⁺ et le THA sont inconcluantes, parfois bloquantes (Misgeld et al., 1989; Thompson et Gähwiler, 1992a) ou pas (Lambert et al., 1991a; Lambert et Wilson, 1993) l'inhibition présynaptique induite par le baclofen.

L'activation des récepteurs GABA_B par le baclofen pourrait aussi inhiber présynaptiquement la libération de neurotransmetteur en réduisant les courants Ca²⁺ (Dunlap et Fischback, 1981b; Scholz et Miller, 1991). Wu et Saggau (1995) ont démontré en utilisant des techniques d'imagerie calciques que l'entrée du Ca²⁺ dans les terminaisons glutamatergiques était diminuée par le baclofen.

L'inhibition présynaptique semble aussi impliquer d'autres mécanismes. Scanziani et al., (1992) ont démontré que le baclofen réduisait la fréquence des CPSE miniatures, insensibles à la TTX, dans les cellules pyramidales du CA3. Ces CPSEs sont insensibles au Cd²⁺, un bloqueur des courants calciques voltage-dépendants, indiquant qu'ils ne dépendent pas de l'entrée du Ca²⁺ dans les terminaisons. Ces résultats suggèrent donc que les hétérorécepteurs GABA_B peuvent réduire la libération du glutamate par une interaction avec le processus d'exocytose (Thompson et al., 1993)..

De plus, les mécanismes couplés aux autorécepteurs GABA_B qui inhibent la libération du GABA et ceux des hétérorécepteurs GABA_B qui inhibent la libération du glutamate semblent être distincts. Dans l'hippocampe, l'inhibition des réponses excitatrices par le baclofen est insensible au Ba²⁺ (Lambert et al., 1991; Thompson et Gähwiler, 1992a), insensible à la toxine pertussis (Dutar et Nicoll, 1988b; Colmers et Pittman, 1989) mais sensible aux esters de phorbol (Dutar et Nicoll, 1988b). Par contre, l'inhibition des réponses inhibitrices par le baclofen est bloquée par le Ba²⁺, la toxine pertussis et l'ester de phorbol (Dutar et Nicoll, 1988b; Misgeld et al., 1989; Thompson et Gähwiler., 1992a).

8.3 Les mécanismes GABA_B pré et postsynaptiques sont distincts

Certaines études pharmacologiques ont suggéré que les mécanismes GABA_B pré- et postsynaptiques sont distincts. Premièrement, les récepteurs GABA_B pré- et postsynaptiques semblent être couplés, via les protéines G, à des mécanismes intracellulaires distincts. L'ester de phorbol bloque les réponses synaptiques GABA_B (Pitler et Alger, 1994) et les réponses au baclofen (Worley et al., 1987), mais il n'affecte pas l'inhibition présynaptique par stimulation (Pitler et Alger, 1994):

Deuxièmement, certains antagonistes de récepteurs GABA_B comme le phaclofen et le 2-OH-saclofen ont des effets ambigus sur l'inhibition présynaptique par le baclofen, ou la stimulation paillée, contrairement à leurs effets sur les réponses postsynaptiques au baclofen. Dans certains cas, l'inhibition présynaptique est insensible (Dutar et Nicoll, 1988b; Harrison, 1990a) à ces antagonistes GABA_B. L'antagoniste GABA_B, le CGP35348 a aussi des effets variables sur l'inhibition présynaptique (Deisz et al., 1997; Lambert et Wilson, 1993; Wilcox et Dichter, 1994). Ces résultats démontrent que les récepteurs GABA_B pré- et postsynaptiques sont dotés de propriétés pharmacologiques différentes et qu'ils sont couplés à des mécanismes de transduction distincts.

9.0 Objectifs de la recherche

Il y a donc consensus que l'application du baclofen et du GABA exogène (en présence d'antagonistes de récepteur GABA_A) hyperpolarisent les neurones pyramidaux de l'hippocampe via l'activation des récepteurs GABA_B, des protéines

G et des conductances K. Cependant, certains résultats suggèrent que le GABA et le baclofen pourraient activer différents récepteurs GABA_B, différents mécanismes de transduction et différentes conductances K⁺. Cette thèse vise donc à clarifier les mécanismes GABA_B par lesquels le GABA et le baclofen inhibent les neurones de l'hippocampe.

Dans le premier projet, nous caractérisons la différence entre les réponses non-GABA_A, produites par le GABA, et celles induites par l'agoniste GABA_B baclofen, dans les cellules pyramidales du CA1 de l'hippocampe du rat. Dans un premier temps, nous examinons électrophysiologiquement les réponses de ces deux agonistes sur le potentiel membranaire et la résistance cellulaire. Nous examinons ensuite la différence entre le déroulement temporel de ces deux réponses, leurs potentiels d'équilibre et leur sensibilité aux bloqueurs de conductances K⁺, les ions Ba²⁺ et Cs⁺.

Nous examinons aussi si les canaux K⁺ sous-jacents à ces réponses sont activés via les protéines G, en utilisant le GTPγS qui active irréversiblement les protéines G et le Li⁺ qui inactive les protéines G. Enfin, nous vérifions si les deux agonistes activent les mêmes types de récepteurs GABA_B en utilisant les antagonistes GABA_B, le CGP35348 et le CGP55845A (Jarolimek et al., 1993).

Dans le deuxième projet, ayant mis en évidence dans le premier projet que le GABA exogène active des récepteurs GABA_B couplés à deux types de conductances K⁺ différenciellement sensibles au Ba²⁺, nous vérifions si le GABA endogène active aussi des récepteurs GABA_B couplés à des conductances K⁺ hétérogènes. Les réponses synaptiques GABA_B seront obtenues: i) par stimulation électrique simple et

répétitive des fibres inhibitrices dans trois couches dendritiques pour s'assurer d'un échantillonnage complet des synapses GABAergiques, et ii) par un blocage de conductances potassiques par la 4-aminopyridine (4-AP) (libération synchrone de GABA). Les expériences se dérouleront en présence d'antagonistes des récepteurs GABA_A et des récepteurs ionotropes du glutamate. Nous vérifierons si les PPSIs tardifs monosynaptiques provenant de la stimulation de trois zones dendritiques différentes se ressemblent au niveau de leur décours temporel, leur potentiel d'équilibre, l'activation des récepteurs GABA_B et de protéines G. Nous testerons aussi la sensibilité de ces trois types de PPSIs monosynaptiques au Ba²⁺. Nous vérifierons la présence de réponses au GABA exogène insensibles au Ba²⁺ dans les mêmes cellules pour démontrer l'activation des récepteurs GABA_B couplés à différentes conductances K⁺ dans ces mêmes cellules. Finalement, nous soumettrons aussi les PPSI_Bs induits par la 4-AP aux mêmes protocoles pour déterminer si une libération plus abondante de GABA de fibres présynaptiques serait nécessaire pour activer les deux types de conductances K⁺ liées aux récepteurs GABA_B.

Tableau 1: Propriétés des récepteurs GABA

Récepteur	Agoniste	Antagoniste	Sous-unité clonée	Canal
GABA _A (ionotrope)	GABA muscimol THIP	bicuculline picrotoxine	α_{1-6} , β_{1-4} γ_{1-3} , $\delta 1$	Cl ⁻
GABA _C (ionotrope)	GABA TACA	picrotoxine	$\rho 1$, $\rho 2$	Cl ⁻
GABA _B (métabotrope)	GABA L-baclofen 3-APPA	CGP35348 CGP55845 phaclofen saclofen	GABA _B R1 GABA _B R2	K ⁺ Ca ²⁺

DEUXIÈME CHAPITRE

PREMIER ARTICLE:

**"Multiple postsynaptic Actions of GABA via GABA_B Receptors
on CA1 Pyramidal cells of Rat Hippocampal Slices"**

Publié dans:

Journal of Neurophysiology 76: 69-80, 1996

**MULTIPLE POSTSYNAPTIC ACTIONS OF GABA VIA GABA_B
RECEPTORS ON CA1 PYRAMIDAL CELLS OF RAT HIPPOCAMPAL
SLICES**

Tri M. PHAM and Jean-Claude LACAILLE

Centre de recherche en sciences neurologiques, Département de physiologie,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Running Title: GABA_B activation of distinct K⁺ conductances

Key Words: Baclofen, Ba²⁺, Cs⁺, Li⁺, GABA_B subtypes, CGP-35348, CGP-55845A.

Pages = 42

Figures = 9

Tables = 2

Address for correspondence:

Dr. J.-C. Lacaille

Département de physiologie

Faculté de médecine, Université de Montréal

P.O. Box 6128, Station Centre-Ville

Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7

Tel: (514) 343-5794

Fax: (514) 343-11

Summary and Conclusions

1. The effects of GABA on non-GABA_A receptors were investigated with intracellular recordings in CA1 pyramidal cells of rat hippocampal slices in the presence of antagonists of GABA_A receptors (50μM bicuculline [BIC] and 50μM picrotoxin [PIC]), N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors (100μM 2-amino-5-phosphonopentanoic acid [AP-5] and 40μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione [CNQX], respectively), and of a blocker of GABA uptake (1mM nipecotic acid [NIP]). The effects of GABA were compared with those of the selective GABA_B agonist (-)baclofen (CGP-11973A, (-)BAC).

2. In the presence of these antagonists, micropressure application of GABA into stratum radiatum evoked hyperpolarizations with relatively fast peak latency (2 sec) and decay (12 sec). (-)BAC, in the absence of antagonists, hyperpolarized cells but with a slower time course (peak latency 8 sec, decay 78 sec). The mean equilibrium potential (E_{rev}) of responses to GABA (-94mV; n=11) and (-)BAC (-87mV; n=8) were similar, suggesting that both responses were mediated by K⁺ conductances.

3. Bath applications of 1mM Ba²⁺ partly antagonized GABA responses in a reversible manner. The mean amplitude of the Ba²⁺-resistant GABA response was 46% of control (n=16, p<0.05). In contrast, (-)BAC responses were completely

abolished by Ba^{2+} ($n=15$), and the effect was reversible. Thus both GABA and (-)BAC activate a common Ba^{2+} -sensitive conductance, but GABA may also activate another Ba^{2+} -resistant conductance.

4. The Ba^{2+} -resistant GABA response had a similar time course to control GABA responses, but its E_{rev} was more depolarized (-79 mV, $n=8$, $p<0.05$)

5. During recordings with electrodes containing KCl to reverse the Cl^- gradient, although GABA responses were smaller in amplitude, their time course and E_{rev} (-91 mV; $n=10$) were similar to those recorded with K-acetate electrodes. Thus, Cl^- conductances may not be involved in these non-GABA_A responses elicited by GABA.

6. During recordings with electrodes containing CsCl to block outward K^+ currents, hyperpolarizing GABA responses were not observed ($n=8$). In these conditions, GABA elicited depolarizing responses with a faster time course (peak latency 1 sec, decay 5 sec) than the hyperpolarizing responses recorded with electrodes containing KCl. Hence, GABA may produce hyperpolarizations by activating K^+ conductances, but it may also produce an additional depolarizing response via other Cs^+ -insensitive conductances.

7. During recordings with electrodes containing LiCl to interfere with G-

protein activation, hyperpolarizing GABA responses were blocked and depolarizing responses were unmasked (n=5). These depolarizing responses were generally similar to those recorded with electrodes containing CsCl. GABA responses were also reduced during recordings with electrodes containing the irreversible G-protein activator guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP γ S). Thus, hyperpolarizing GABA responses may involve G-protein activation, but the depolarizing responses may not.

8. Bath application of the selective GABA_B antagonist CGP-35348 (1mM) did not significantly reduce hyperpolarizing GABA responses (18% reduction in amplitude, n=6, p>0.05), but completely suppressed (-)BAC responses (n=2). The more potent and selective GABA_B antagonist CGP-55845A (5 μ M) abolished all GABA responses (n=7). Thus, all non-GABA_A responses elicited by GABA may be mediated by GABA_B receptors.

9. In conclusion, GABA, in the presence of GABA_A antagonists, may produce in CA1 pyramidal cells two distinct postsynaptic responses mediated via GABA_B receptors and G-protein activation: 1) GABA (*and* (-)BAC) may activate a Ba²⁺-sensitive K⁺ conductance, and 2) GABA (*but not* (-)BAC) may also generate a Ba²⁺-insensitive K⁺ conductance. GABA may also generate other ionic changes, via GABA_B receptors, resulting in depolarization of pyramidal cells.

Introduction

GABA is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (Nicoll et al. 1990; Sivilotti and Nistri 1991). In the hippocampus, local GABAergic interneurons make synaptic contact with principal cells to critically influence their level of excitability (Andersen et al. 1964; Schwartzkroin and Prince 1980; Traub et al. 1987; Lacaille et al. 1989). The synaptic mechanisms of GABA have been comprehensively studied and involve principally GABA_A and GABA_B receptors (Bowery 1993; Thompson 1994). Electrical stimulation of afferent fibers and inhibitory interneurons generates two postsynaptic GABA responses in pyramidal cells. The first is a rapid hyperpolarization (the early or fast IPSP) and involves the activation of GABA_A receptors and the opening of Cl⁻ channels (Kandel et al. 1961; Andersen et al. 1964; Alger and Nicoll 1982a,b; Ben-Ari et al. 1981). The second is a slower hyperpolarization (the late or slow IPSP) and is produced by activation of GABA_B receptors, G-protein stimulation and the opening of K⁺ channels (Alger 1984; Newberry and Nicoll 1984b,1985; Andrade et al. 1986; Thalmann 1988; Dutar and Nicoll 1988; Gähwiler and Brown 1985).

In contrast to these postsynaptic responses evoked by synaptically released GABA, the postsynaptic responses to exogenous GABA are more complex. GABA applications to pyramidal cell dendrites elicit mixed depolarizing and hyperpolarizing responses via the activation of GABA_A receptors (Alger and Nicoll 1979, 1982b; Andersen et al. 1980). The hyperpolarization is mediated by the

opening of Cl^- channels and may reflect the activation of synaptic receptors (Alger and Nicoll 1982b). The depolarizing response may be due to the activation of extrasynaptic receptors and could arise from the opening of Cl^- channels at sites with an inverted Cl^- gradient (Misgeld et al. 1986) or from a bicarbonate conductance (Kaila et al. 1989). The hyperpolarizing responses caused by GABA_B receptor activation and K^+ channels opening have been characterized mostly with the use of the selective GABA_B agonist baclofen (Newberry and Nicoll 1984a, 1985; Dutar and Nicoll 1988; Gähwiler and Brown 1985) and were generally similar to the actions of exogenous GABA on GABA_B receptors (Newberry and Nicoll 1985; Solis and Nicoll 1992). However, the actions of GABA and baclofen on GABA_B receptors may not be totally similar since the responses elicited by exogenous GABA and baclofen have been reported to differ in terms of sensitivity to cholinergic agonists (Müller and Misgeld 1989), 4-aminopyridine (Ogata et al. 1987), and GABA_B receptor antagonists (Solis and Nicoll 1992). Heterogeneity of postsynaptic GABA_B responses was also suggested in studies with selective stimulation of hippocampal interneurons. In these studies, GABA_B IPSPs showed a different sensitivity to Ba^{2+} and GABA_B antagonists than the previously reported baclofen responses (Williams and Lacaille 1990, 1992).

In the present study, the postsynaptic GABA_B responses induced by exogenous GABA were examined with intracellular recordings from CA1 pyramidal cells in rat hippocampal slices. The aim of the study was to examine the responses elicited by local applications of GABA during pharmacological blockade

of GABA_A receptors, and compare them with those elicited by similar applications of (-)baclofen. We found that GABA, but not (-)baclofen, elicited two distinct GABA_B responses that could be differentiated by the K⁺ channel blocker Ba²⁺. Further experiments were carried out with different recording electrolytes (KCl, LiCl, and CsCl) and with recently developed GABA_B antagonists to examine the ionic and pharmacological mechanisms of these responses. Preliminary reports of this work have been presented (Pham and Lacaille 1994a,b).

Methods

Slices

Conventional transverse hippocampal slices (400-450 μm thick) were obtained as described previously (Lacaille and Williams 1990; Samulack et al. 1993). Briefly, male Sprague-Dawley rats (125-250g) were anesthetized with ether and decapitated. Their brain was dissected free and placed in ice-chilled, oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM) 124 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 dextrose, and saturated with 95% O₂/5% CO₂. Hippocampal slices were obtained using a McIlwain tissue chopper and placed in a gas/fluid interface chamber where the upper surface of the slices was exposed to a warmed, humidified gas mixture (95% O₂/5% CO₂). Slices were maintained at 35 ± 0.5°C. They were perfused initially (0.5-1 hour) with normal ACSF, and subsequently with PO₄/SO₄ free ACSF (NaH₂PO₄ and MgSO₄ replaced with MgCl₂) for the duration of the experiments.

Intracellular recordings

For intracellular recordings, micropipettes were filled with 4M K-acetate (KAc) and 0.01M KCl (60-90 M Ω). Intracellular responses from CA1 pyramidal cells were recorded in current-clamp mode with an amplifier (Axoclamp-2A) equipped with an active bridge circuit for current injection, displayed on a storage oscilloscope (Gould 1604), stored in digitized format on VHS video cassettes (NeuroCorder DR-886), and also digitized with a microcomputer equipped with a data acquisition system (Axon Instruments TL-1-125) and commercial software (Axon Instruments, pClamp and Axotape). Recordings were considered acceptable if resting membrane potential (RMP) was ≥ -55 mV, action potential amplitude ≥ 60 mV, cellular input resistance (R_{in}) ≥ 10 M Ω , and if membrane potential was stable without the injection of steady hyperpolarizing current. RMP was measured after withdrawal from the cell. Bridge balance was regularly monitored and adjusted as necessary throughout the experiments. In some experiments, recordings were made with micropipettes containing 3M KCl (to reverse Cl⁻ gradient), 3M CsCl (to block K⁺ conductances), 3M LiCl (to block G-protein activation, Avissar et al. 1988, 1991), or 25mM GTP γ S in 4M K-Acetate (for irreversible activation of G-proteins, Andrade et al. 1986). When using these different electrolytes (except GTP γ S), an initial 30 min period was allowed for intracellular diffusion. This period was sufficient to cause depolarization of resting membrane potential,

widening of action potentials and reduction of afterhyperpolarizations with CsCl electrodes.

Drug applications

GABA (5mM) and the (-) enantiomer of baclofen (0.25mM CGP-11973A; (-)BAC) were applied locally by micropressure (drop diameter 50-100 μm) in stratum radiatum to dendrites of CA1 pyramidal cells. To pharmacologically isolate GABA_B responses elicited by GABA, in all experiments GABA was applied during superfusion with PO₄/SO₄-free ACSF containing GABA_A antagonists (50 μM bicuculline and 50 μM picrotoxin), NMDA and non-NMDA antagonists (100 μM AP-5 and 40 μM CNQX, respectively), and a blocker of GABA uptake (1mM nipecotic acid). A surgical cut was also placed between CA3 and CA1 fields. Baclofen responses were also obtained in PO₄/SO₄ free ACSF but always in the absence of antagonists. The pipette containing GABA or (-)BAC was lowered into the slice and advanced through the tissue in 10 μm increments until GABA or (-)BAC ejections elicited hyperpolarizing responses in the recorded pyramidal cell. In control experiments (n=6 cells), we estimated the dilution factor with similar applications of ACSF containing known concentrations of KCl. Applications of ACSF containing 10mM (n=2 cells) and 25mM (n=3 cells) KCl were without effect, whereas ACSF with 50mM (n=4 cells) and 100mM (n=2 cells) KCl depolarized cells. These results suggest a dilution factor of 5-10 for our local drug applications. The K⁺ channel blocker Ba²⁺ (1mM) and the GABA_B antagonists

CGP-35348 (1mM) and CGP-55845A (5 μ M) were applied in the bath. During bath applications of Ba²⁺, action potential duration was monitored to verify the block of K⁺ conductances and membrane potential was returned to control level by the injection of intracellular DC current. Similarly, during recordings with GTP γ S-containing electrodes, membrane potential was maintained constant with intracellular DC current injection. In other control experiments, GABA (n=10 cells) was applied with the blocker of GABA uptake and GABA_A, NMDA and non-NMDA antagonists present in the vehicle solution. GABA responses were not significantly different, in terms of amplitude, time to peak, sensitivity to Ba²⁺ and E_{rev} of Ba²⁺-resistant component, from responses without antagonists in the vehicle and data were pooled. Control baclofen responses (n=3 cells) were also evoked with antagonists in both vehicle and ACSF, and their amplitude, time course and antagonism by Ba²⁺ were not significantly different from those evoked in the absence of antagonists. Chemicals were obtained from Sigma, except for AP-5 and CNQX (RBI), and CGP-35348, CGP-55845a and CGP-11973A (Ciba-Geigy).

Measurement of equilibrium potential

The equilibrium or null potential (E_{rev}) for GABA and (-)BAC responses were obtained from series of responses elicited at successively more negative membrane potentials, using intracellular current injection and bridge balance monitoring. The amplitude of the response was measured at a fixed latency that

was determined from responses at depolarized membrane potentials. Measures of E_{rev} were obtained from a linear regression of response amplitude vs membrane potential.

Statistical analysis

Group measures were expressed as mean \pm standard error. Statistical significance of the difference between means was assessed using paired and unpaired Student *t*-test, with the level of significance set at $p < 0.05$.

Results

GABA or (-)BAC responses were examined in 87 pyramidal cells recorded with electrodes containing KAc. The mean resting membrane potential, input resistance, and action potential amplitude were $-66 \pm 0.9\text{mV}$, $35.2 \pm 1.1\text{M}\Omega$, $86.1 \pm 1.0\text{mV}$, respectively. Cells that exceptionnally did not respond to GABA or (-)BAC were not included in the study.

GABA- and (-)BAC-induced hyperpolarizations

GABA applications, in the presence of antagonists of GABA_A, NMDA and non-NMDA receptors and of GABA uptake, produced hyperpolarizations of CA1 pyramidal cells at membrane potentials near rest (Fig. 1A). GABA responses (mean amplitude -4.3mV) reached their peak rapidly (mean peak latency 2.2s), and lasted a few seconds (mean recovery 11.5s) ($n=39$, mean V_m -62.3mV ; Table 1).

(-)BAC also hyperpolarized pyramidal cells (Fig. 1C), but (-)BAC responses were smaller in amplitude (mean -3.9mV) with significantly longer mean peak latency (8.0s) and duration (mean recovery 77.5s) ($n=37$, mean V_m -60.5mV ; Table 1) than GABA responses. Both GABA and (-)BAC responses came to equilibrium near -90mV (Fig. 1). The mean E_{rev} of responses elicited by GABA (-93.6mV , $n=11$ cells) and (-)BAC (-87.3mV , $n=8$ cells) were not significantly different (Table 1). In most cells, response reversal and rectification were not observed in the range of membrane potentials examined (-55mV to -100mV).

[Insert Figure 1 about here]

Differential effects of Ba^{2+} on GABA and (-)BAC responses

GABA and (-)BAC responses showed a different sensitivity to the K^+ channel blocker Ba^{2+} . Following 30 min of bath application of 1mM Ba^{2+} , GABA responses were reduced in amplitude by approximately 50% (Fig. 2A). In 16 cells tested, the mean Ba^{2+} -resistant GABA response was $45.8 \pm 4.5\%$ of control amplitude (Fig 2C; $p<0.05$). In 8 cells that recordings were held through a wash-out period (30-60min), these Ba^{2+} effects were reversible (amplitude $75.8 \pm 8.1\%$ of control; $p>0.05$). The time course of Ba^{2+} -resistant GABA responses was not different from GABA responses in control ACSF (Table 1). In contrast, (-)BAC responses were completely abolished by similar applications of Ba^{2+} (Fig 2B). In all cells tested with Ba^{2+} ($n=15$), (-)BAC responses were totally blocked (Fig. 2C,

Table 1). In 11 cells that recordings remained stable through washout, the Ba²⁺ block of (-)BAC responses was also reversible (amplitude $53.6 \pm 6.0\%$ of control).

[Insert Fig 2 about here]

Equilibrium potential of Ba²⁺-resistant GABA responses

The equilibrium potential of the Ba²⁺-resistant GABA responses was measured in eight cells. As illustrated in Fig. 3, GABA responses were obtained first in normal ACSF and then in the presence of 1mM Ba²⁺. Ba²⁺-resistant GABA hyperpolarizations were larger in amplitude at depolarized membrane potentials, and were reduced at hyperpolarized membrane potentials (near -80mV). For the cells tested (n=8), the E_{rev} of the Ba²⁺-resistant GABA response was $-79.3 \pm 1.8\text{mV}$, which was significantly different from the E_{rev} of GABA responses in the absence of Ba²⁺ (-93.6mV , n=11, $p<0.05$; Table 1).

[Insert Fig 3 about here]

GABA responses with KCl-containing electrodes

The role of Cl⁻ and K⁺ conductances in GABA responses was examined using different recording electrolytes. KCl-filled electrodes were used to reverse the Cl⁻ gradient across the cell membrane. During recordings with KCl-containing electrodes, GABA still induced hyperpolarizing responses at membrane potentials

near rest (Fig. 4). The mean amplitude (-3.5mV) of GABA responses recorded with electrodes filled with KCl was significantly smaller, but the peak latency (3.5s) and recovery time (8.4s) were not significantly different (mean V_m -62.5mV, n=10) from those recorded with KAc (Table 1). With KCl-filled electrodes, GABA responses were largest in amplitude at depolarized membrane potentials, were reduced at more negative membrane potentials, and reached equilibrium near -90mV (Fig 4A). The mean E_{rev} of GABA responses were similar during recordings made with electrodes containing KCl (-90.8mV, n=10) and KAc (-92.0mV, n=9; Table 1).

[Insert Fig 4 about here]

Block of GABA hyperpolarizations with CsCl-filled electrodes

Micropipettes containing CsCl were used to block K^+ conductances internally. During recordings with Cs-filled electrodes, GABA responses were depolarizing at membrane potentials near rest (Fig. 5). For all cells tested with electrodes containing CsCl (mean V_m -64.0mV; n=8), the mean amplitude (+4.5mV), peak latency (0.9s), and recovery time (5.1s) of GABA responses were significantly different from those obtained with KCl electrodes (Table 1). In four cells tested, depolarizing GABA responses obtained with electrodes filled with CsCl varied with membrane potential. In three of these cells, GABA responses decreased in amplitude at more hyperpolarized membrane potentials (Fig. 5), while

in the other cell the inverse relationship was observed.

[Insert Fig. 5 about here]

Block of GABA hyperpolarizations with LiCl-filled electrodes

Micropipettes containing LiCl were used to internally block receptor-coupled G-protein activation. In recordings with LiCl-filled electrodes, GABA responses were also depolarizing (Fig. 6). For all cells tested (n=5), the mean amplitude (+3.3mV) and peak latency (1.4s) of GABA responses were significantly different from those obtained with KCl-filled electrodes (Table 1). Recovery times were not significantly different. The relationship between response amplitude and membrane potential in recordings with LiCl-containing electrodes was variable (n=5 cells). In three of these cells, GABA response amplitude increased at hyperpolarized membrane potentials (Fig 6), whereas in the other two cells the reverse relationship was found.

[Insert Fig 6 and Table 1 about here]

Reduction of GABA responses by intracellular GTP γ S

Recordings were made with micropipette containing 25mM GTP γ S dissolved in 4M K-acetate to irreversibly activate G-proteins and block further

receptor activation of G-proteins. Sixty minutes after cell impalement with GTP γ S-containing electrodes, the mean amplitude of GABA responses for all cell tested (n=4) was significantly reduced to $35.5 \pm 10.6\%$ relative to controls taken 15 minutes after impalement (Fig 7; $p < 0.05$). To determine if Ba $^{2+}$ -resistant GABA responses were sensitive to GTP γ S, the effects of Ba $^{2+}$ were tested on GABA responses recorded with electrodes containing GTP γ S (n= 4 other cells). For all cell tested, 30 minutes after cell impalement with GTP γ S-containing electrodes, the mean amplitude of GABA responses was significantly reduced to $62.7 \pm 8.1\%$ relative to controls taken 15 min after impalement (data not shown; $p < 0.05$). Bath application of Ba $^{2+}$ produced a further reduction in the mean amplitude of GABA responses for all cell tested to $-5.0 \pm 12.8\%$ of controls (Fig. 7B; $p < 0.05$).

[Insert Fig 7 about here]

Differential sensitivity of GABA and (-)BAC responses to the GABA_B antagonist CGP-35348

The pharmacological subtype of GABA receptors implicated in the GABA responses was examined with KAc-containing electrodes. During bath application of the selective GABA_B antagonist CGP-35348 (1mM; 15-60 min), GABA responses were not significantly reduced (Fig. 7A). In all cells tested (n=6), the mean amplitude of GABA responses was reduced by 17.5% in CGP-35348, as compared to control, but the difference was not statistically significant (Table 2;

$p > 0.05$). In contrast, (-)BAC responses were fully suppressed by similar applications of CGP-35348 (Fig 7b). In two cells tested, the mean amplitude of (-)BAC responses was totally reduced in CGP-35348 and partially recovered (25.5% of control) after removal of the antagonist (Table 2).

[Insert Fig. 8 about here]

Block of GABA responses by the GABA_B antagonist CGP-55845A

The GABA_B nature of the GABA responses was confirmed with the more potent GABA_B antagonist CGP-55845A. Bath application of 5 μM CGP-55845A (20-60 min) produced a reversible block of GABA responses (Fig. 8). In seven cells tested, the mean amplitude of GABA responses was completely blocked in CGP-55845A (Table 2). The block of GABA responses was partially reversed after wash of CGP-55845A ($47.8 \pm 11.5\%$ of control amplitude, $n=5$ cells; Table 2).

[Insert Fig. 9 and Table 2 about here]

Discussion

The principal findings of this study were that both (-)baclofen and GABA hyperpolarized pyramidal cells by activation of GABA_B receptors and the opening

K⁺ conductances, but that GABA may activate two distinct postsynaptic responses via GABA_B receptors coupled to G-proteins: 1) a Ba²⁺-sensitive K⁺ conductance (also activated by (-)baclofen), and 2) a Ba²⁺-insensitive K⁺ conductance (*not* activated by (-)baclofen). GABA may also have other actions resulting in pyramidal cell depolarization.

GABA and (-)baclofen activate potassium conductances

Dendritic applications of GABA, in the presence of GABA_A antagonists, produced hyperpolarizations similar to those evoked by (-)baclofen, but with a faster time course (4 to 7-fold difference). The equilibrium potential of GABA and (-)baclofen responses were both consistent with K⁺-mediated responses (~-90mV). It is possible that with our method of local drug application, agonists would also diffuse to somatic regions and activate receptors located there. However, vertical movements of the pipette by 10-50µm usually resulted in loss of GABA or (-)baclofen responses. It was thus unlikely that these agonists could activate somatic receptors located more than 100µm away. Our results concord with previous studies showing that baclofen and GABA (in the presence of GABA_A antagonists) hyperpolarized hippocampal pyramidal cells by activating K⁺ conductances (Newberry and Nicoll 1984a, 1985; Inoue et al. 1985; Gähwiler and Brown 1985; Solis and Nicoll 1992). An absence of effective uptake mechanism for baclofen may explain the longer duration of (-)baclofen responses (Janigro and Schwartzkroin 1988; Solis and Nicoll 1992), but not its slower time to peak.

Therefore additional factors may also contribute to the faster time course of GABA responses.

Differential sensitivity of GABA and (-) baclofen responses to Ba²⁺

Extracellular application of Ba²⁺ (1-2mM) effectively blocks some K⁺ conductances, including those activated by the GABA_B agonist baclofen (Gähwiler and Brown 1985; Newberry and Nicoll 1985; Thompson and Gähwiler 1992) and those mediating GABA_B IPSPs (Knowles et al. 1984; Xie and Smart 1993). In the present experiments, 1 mM Ba²⁺ blocked completely and reversibly (-)baclofen responses, but only reduced partially (~50%) GABA responses. This partial resistance of GABA responses to Ba²⁺ is consistent with previous observations that GABA responses elicited in the presence of bicuculline were not completely blocked by lower concentrations of Ba²⁺ (0.4-0.8mM; Newberry and Nicoll 1985). Our results further suggest that this Ba²⁺-resistant GABA response can be quite significant, accounting for roughly half of the GABA response elicited in the absence of any K⁺ channel blockers. Thus, Ba²⁺ may be used to dissociate between two different responses elicited by GABA (Ba²⁺-resistant and Ba²⁺-sensitive) in the presence of GABA_A antagonists. The ionic basis of the Ba²⁺-insensitive GABA response may involve more than K⁺ ions since the E_{rev} of these responses was more depolarized (~ -80mV) than the E_{rev} for K⁺ and (-)baclofen responses (~ -90mV). Thus, another ionic mechanism (perhaps in addition to a K⁺ conductance) may contribute to the Ba²⁺-resistant GABA response (see below).

Ionic mechanisms of GABA responses

Different intracellular recording electrolytes were used to examine the ionic mechanisms involved in GABA responses. During recordings with KCl-containing electrodes to alter the intracellular chloride gradient, GABA responses remained hyperpolarizing, with a similar time course and E_{rev} . These results indicate that the GABA_A antagonists bicuculline and picrotoxin effectively blocked GABA_A/Cl⁻ conductances in the present experiments and further suggest that GABA responses in GABA_A antagonists did not involve Cl⁻ conductances.

Using CsCl-filled microelectrodes to block outward K⁺ currents, GABA elicited depolarizing instead of hyperpolarizing responses. The effective block of all GABA-induced hyperpolarizations by internal Cs⁺ suggests that all GABA hyperpolarizing responses elicited in GABA_A antagonists were mediated by K⁺ conductances. This is consistent with the observed E_{rev} of these GABA responses which was close to the E_{rev} of K⁺ ions. Since GABA hyperpolarizations were completely blocked by Cs⁺, both the Ba²⁺-sensitive and Ba²⁺-resistant hyperpolarizing GABA responses may be mediated by pharmacologically different K⁺ conductances. The depolarizing responses elicited by GABA during recordings with CsCl electrodes displayed a faster time course than the hyperpolarizing responses recorded with KCl-filled electrodes. This suggests that the hyperpolarizing and depolarizing responses may be mediated by different mechanisms. These GABA depolarizations did not appear to be application artifacts since they were not observed when GABA was replaced by the vehicle

solution (PO_4/SO_4 -free ACSF; $n=2$ cells, data not shown).

GABA_B responses evoked by baclofen are coupled to G-proteins (Andrade et al. 1986). During recordings with LiCl-containing electrodes to interfere with G-protein activation (Avissar et al. 1988;1991), GABA evoked depolarizing instead of hyperpolarizing responses. This Li^+ block suggests that G-proteins may couple GABA receptors to the K^+ channels responsible for hyperpolarizing responses in GABA_A antagonists. Since GABA hyperpolarizations were completely blocked with LiCl, both Ba^{2+} -sensitive and Ba^{2+} -insensitive GABA hyperpolarizing responses may be mediated by G-proteins. The reduction of GABA responses during recordings with electrodes containing $\text{GTP}\gamma\text{S}$ also support a role of G-proteins in these responses (Andrade et al. 1986; Thalmann 1988). The block of GABA responses by Ba^{2+} during recordings with electrodes containing $\text{GTP}\gamma\text{S}$, further implies that the Ba^{2+} -resistant GABA responses were mediated by G-proteins.

The depolarizing GABA responses recorded with LiCl electrodes were similar to those observed with CsCl electrodes, and showed a faster time course than the hyperpolarizing responses observed with KCl electrodes. This consistent difference in time course provides further support for two different mechanisms involved in the depolarizing and hyperpolarizing GABA responses. The ionic mechanism responsible for the depolarizing GABA responses seen with CsCl and LiCl electrodes, remains undetermined. The sensitivity of these responses to voltage was variable with roughly half the cells showing a decrease in response

amplitude at hyperpolarized membrane potentials and the other half the inverse. Inward synaptic currents underlying 4-aminopyridine-induced GABA_B IPSCs have been previously reported during whole cell recordings with intracellular Cs⁺ in hippocampal granule cells (Jarolimek and Misgeld 1993). This inward current was ascribed to an inwardly directed K⁺ current (intracellular K⁺ replaced by Cs⁺) through channels not blocked by Cs⁺ (Jarolimek and Misgeld 1993). Our results are inconsistent with a similar interpretation in CA1 pyramidal cells, since i) the depolarizing responses did not display the appropriate response amplitude vs voltage relationship, ii) the time course of the depolarizing responses with CsCl/LiCl electrodes and of the hyperpolarizing responses with KCl electrodes were different, and iii) depolarizing responses were observed with intracellular recordings (in the absence of intracellular dialysis to remove K⁺). Additional experiments will be necessary to determine the mechanism underlying these depolarizing responses. However, the GABA depolarizations revealed with CsCl or LiCl electrodes could explain the positive shift in the E_{rev} of the Ba²⁺-insensitive non-GABA_A response. A GABA response composed of a depolarizing and two major hyperpolarizing components would be expected to display a positive shift in its E_{rev} when a significant portion of the hyperpolarizing response was removed (e.g. during Ba²⁺ block of K⁺ conductance).

GABA responses were mediated by GABA_B receptors

GABA responses elicited in GABA_A antagonists were reduced, but not

significantly, by the GABA_B receptor antagonist CGP-35348 (Olpe et al. 1990). In contrast, (-)baclofen responses were completely blocked by CGP-35348. Our results are partially consistent with previous reports that GABA responses, evoked in the presence of GABA_A antagonists and of a GABA uptake inhibitor, were less sensitive (ten-fold) to this antagonist than baclofen responses (Solis and Nicoll, 1992). However, in these experiments GABA responses were almost totally abolished by 1mM CGP-35348 (Solis and Nicoll, 1992), whereas in our experiments the effect was not significant. The difference observed in the present study in the antagonistic actions of CGP-35348 against GABA and (-)baclofen responses of similar size suggests that these responses may be mediated by heterogenous GABA_B receptors.

In contrast, the more potent GABA_B antagonist CGP-55845A (Brugger et al. 1993; Olpe et al. 1993) reversibly blocked GABA responses in the presence of GABA_A antagonists. These results confirm that GABA responses elicited in GABA_A antagonists were mediated by GABA_B receptors. Since GABA responses were totally blocked and no residual responses were seen in CGP-55845A, this suggests that all GABA responses evoked in GABA_A antagonists (Ba²⁺-sensitive and Ba²⁺-insensitive hyperpolarizing responses, and depolarizing responses) may be mediated by GABA_B receptors. Our results are consistent with previous reports that CGP55845A binds with low nanomolar affinity to GABA_B receptors (Brugger et al. 1993) and that it antagonizes both baclofen and GABA-induced K-currents in hippocampal cells (Davies et al. 1993; Jarolimek et al., 1993; Olpe et al. 1993).

The results with GABA_B antagonists further suggest that it is unlikely that the non-GABA_A responses in the present experiments were mediated by other non-GABA_A and non-GABA_B receptor subtypes. In retina, GABA opens Cl⁻ channels via GABA receptors insensitive to bicuculline and baclofen, which have been termed GABA_C (Polenzani et al. 1991; Woodward et al. 1993; Qian and Dowling 1994). However, these responses are antagonized by picrotoxin (Woodward et al. 1993; Qian and Dowling 1994). The presence of picrotoxin and the full block of the GABA responses by the GABA_B antagonist CGP-55845A in the present experiments suggest that GABA_C receptors were not involved in the non-GABA_A responses.

Multiple GABA_B responses and receptors

It has been clearly established that GABA_B receptors can be coupled to heterogenous conductances: decrease in Ca²⁺ conductance (Dunlap 1981; Robertson and Taylor 1986), and increase in inwardly rectifying, Ba²⁺- and Cs⁺-sensitive, K⁺ conductance (Gähwiler and Brown 1985; Newberry and Nicoll 1984a). More recently, several reports have suggested that GABA_B receptors may be coupled to heterogenous K⁺ conductances. GABA and baclofen activate potassium channels in cultured hippocampal neurons which show outward rectification (Premkumar et al. 1990). GABA and baclofen potentiate a transient outward A-type K⁺ current in hippocampal cells by shifting its activation and inactivation curves in the positive direction (Saint et al. 1990). Baclofen activates K⁺ channels which display outward

rectification and are insensitive to Ba^{2+} and Cs^+ in premotor respiratory neurons (Wagner and Dekin 1993). The present data further suggest that in hippocampal pyramidal cells, postsynaptic $GABA_B$ receptors may be coupled to two different Cs^+ -sensitive K^+ conductances in the same cells: a Ba^{2+} -insensitive and a Ba^{2+} -sensitive conductance. An analogous situation with heterogenous Ba^{2+} -sensitive mechanisms has also been found with presynaptic $GABA_B$ receptors in hippocampus (Thompson and Gähwiler 1992). Bath application of 1mM Ba^{2+} to slices blocked the presynaptic inhibition by baclofen of IPSPs, but not of EPSPs. Thus, presynaptic $GABA_B$ inhibitory mechanisms on GABA terminals are Ba^{2+} -sensitive but those on glutamate terminals are Ba^{2+} -insensitive. Finally, it remains to be determined with further experiments if the presence of distinct K^+ conductances coupled to postsynaptic $GABA_B$ receptors in hippocampal cells could account for the reported differences in rectification properties (Inoue et al. 1985; Ogata et al. 1987) and in sensitivity to 4-AP (Ogata et al. 1987) and cholinergic agonists (Müller and Misgeld 1989) between GABA and baclofen responses (see however Solis and Nicoll 1992).

Although it has been suspected for some time that multiple $GABA_B$ receptor subtypes may exist, no clear consensus has emerged (Bowery 1993). A classification for heterogenous $GABA_B$ receptors has recently been proposed based primarily on $GABA_B$ inhibition of transmitter release in the CNS (Bonanno and Raiteri 1993a,b). In this classification two broad subtypes of $GABA_B$ receptors have been identified: $GABA_{B1}$ which are (-)baclofen sensitive, and $GABA_{B2}$ which

are (-)baclofen insensitive. According to such classification, the present results would suggest that in the hippocampus GABA may activate two distinct postsynaptic GABA_B responses: 1) a Ba²⁺-sensitive K⁺ conductance via GABA_{B1} receptors, and 2) a Ba²⁺-insensitive K⁺ conductance via GABA_{B2} receptors. Experiments with other selective GABA_B agonists and K⁺ channel blockers will be necessary to validate further this classification.

Implications for GABA synaptic transmission

The present results fully support the view that GABA actions in the mature hippocampus are mediated solely by GABA_A and GABA_B mechanisms, and that these mechanisms are involved in the biphasic GABA synaptic responses in pyramidal cells (Solis and Nicoll 1992). Also, since the present results indicate that GABA may activate two types of K⁺ conductances coupled to GABA_B receptors, GABA_B synaptic responses may be composed of heterogenous mechanisms in hippocampal cells. Although it is well established that late GABA_B IPSPs are sensitive to Ba²⁺ (Knowles et al 1984; Xie and Smart 1993), bath application of 1-2mM Ba²⁺ has been reported to significantly reduce, but not completely block, GABA_B IPSPs in hippocampal pyramidal cells (Alger 1984). Thus some component of GABA_B IPSPs may be Ba²⁺-insensitive. The finding that local glutamate stimulation of inhibitory cells in stratum lacunosum-moleculare elicited Ba²⁺-insensitive GABA_B IPSPs in hippocampal CA1 pyramidal cells (Williams and Lacaille 1990, 1992) also supports the notion that distinct Ba²⁺-insensitive and

Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances, coupled to GABA_B receptors, may be involved in GABA synaptic transmission in the hippocampus. The inhibitory cells responsible for the Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances remain to be identified, however GABA_B IPSPs have been elicited in pyramidal cells from glutamate stimulation of inhibitory cells in stratum oriens (Samulack and Lacaille 1993), raising the possibility that different subsets of inhibitory cells may generate the Ba²⁺-sensitive IPSPs.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada to J.-C. Lacaille. J.-C. Lacaille is a Senior Scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), a member of the Research Group on the Central Nervous System (Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche [FCAR]), and a member of a FCAR-Équipe de Recherche. T.M. Pham was supported by a studentship from the Savoy Foundation. The authors wish to thank Ms I. Jutras for assistance with the illustrations, and Ciba-Geigy for the generous gift of CGP-35348, CGP-55845A and CGP-11973A [(-)baclofen].

References

- Alger, B.E. Characteristics of a slow hyperpolarizing synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Neurophysiol.* 52:892-910, 1984.
- Alger, B.E., and Nicoll, R.A. GABA-mediated biphasic inhibitory responses in hippocampus. *Nature* 281:315-317, 1979.
- Alger, B.E., and Nicoll, R.A. Feedforward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 328:105-123, 1982a.
- Alger, B.E., and Nicoll, R.A. Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptors on rat hippocampal cells studied in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 328:125-141, 1982b.
- Andersen, P., Dingledine, R., Gjerstad, L., Langmoen, I.A., and Mosfeldt Laursen, A. Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. *J. Physiol. (Lond.)* 305:279-296, 1980.
- Andersen, P., Eccles, J.C., and Løyning, Y. Location of postsynaptic inhibitory synapses on hippocampal pyramids. *J. Neurophysiol.* 27:592-607, 1964.
- Andrade, R., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. A G-protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234:1261-1265, 1986.
- Avissar, S., Schreiber, G., Danon, A., and Belmaker, R.H. Lithium inhibits adrenergic and cholinergic increases in GTP binding in rat cortex. *Nature* 331: 440-442, 1988.

- Avissar, S., Murphy, D.L., and Schreiber, G. Magnesium reversal of lithium inhibition of β -adrenergic and muscarinic receptor coupling to G proteins. *Biochem. Pharmacol.* 41: 171-175, 1991.
- Ben-Ari, Y., Krnjevic, K., Reiffenstein, R.J., and Reinhardt, W. Inhibitory conductance changes and action of gamma-aminobutyrate in rat hippocampus. *Neuroscience* 12:2445-2463, 1981.
- Bonanno, G. and Raiteri, M. Multiple GABA_B receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 14:259-261, 1993a.
- Bonanno, G. and Raiteri, M. γ -Aminobutyric acid (GABA) autoreceptors in rat cerebral cortex and spinal cord represent pharmacologically distinct subtypes of the GABA_B receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265:765-770, 1993b.
- Bowery, N.G. GABA_B receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33:109-147, 1993.
- Brugger, F., Wicki, U., Olpe, H.-R., Froestl, W., and Mickel, S. The action of new potent GABA_B receptor antagonists in the hemisected spinal cord preparation of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 235:153-155, 1993.
- Curtis, D.R., Felix, D. and McLennan, H., GABA and the hippocampal inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 40:881-883, 1970.
- Davies, C.H., Pozza, M.F., and Collingridge, G.L. CGP 55845A: A potent antagonist of GABA_B receptors in the CA1 region of rat hippocampus.

Neuropharmacol. 32:1071-1073, 1993.

Dunlap, K. Two types of γ -aminobutyric acid receptor on embryonic sensory neurones. *Br. J. Pharmacol.* 74:579-585, 1981.

Dutar, P. and Nicoll, R. A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. *Nature* 332:156-158, 1988.

Gähwiler, B.H. and Brown, D.A. GABA_B-receptor-activated K⁺ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1558-1562, 1985.

Inoue, M., Matsuo, T., and Ogata, N. Possible involvement of K⁺ conductance in the action of γ -aminobutyric acid in the guinea-pig hippocampus, *Br. J. Pharmacol.* 85:515-524, 1985.

Janigro, D., and Schwartzkroin, P.A. Effects of GABA and baclofen on pyramidal cells in the developing rabbit hippocampus: an in vitro study. *Dev. Brain Res.* 41:171-184, 1988

Jarolimek, W., Demmelhuber, J., Bijak, M., and Misgeld, U. CGP-55845A blocks baclofen, γ -aminobutyric acid and inhibitory postsynaptic potassium currents in guinea pig CA3 neurons. *Neurosci. Lett.* 154:31-34, 1993.

Jarolimek, W., and Misgeld, U. 4-Aminopyridine-induced synaptic GABA_B currents in granule cells of the guinea-pig hippocampus. *Pflügers Arch.* 425:491-498, 1993.

Kaila, K., Pasternack, M., Saarikoski, J., and Voipo, J. Influence of GABA-gated

bicarbonate conductance on potential, current and intracellular chloride in crayfish muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 416:161-181, 1989.

Kandel, E.R., Spencer, W.A. and Brinley, F.J. Electrophysiology of hippocampal neurons. I. Sequential invasion and synaptic organization. *J. Neurophysiol.* 24:225-242, 1961.

Knowles, W.D., Schneidermann, J.H., Wheal, H.V., Stafstrom, C.E. and Schwartzkroin, P.A. Hyperpolarizing potentials in guinea-pig hippocampal CA3 neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 4:207-230, 1984.

Lacaille, J.-C., Kunkel, D.D., and Schwartzkroin, P.A. Electrophysiological and morphological characterization of hippocampal interneurons. In: *The Hippocampus-New Vistas*, edited by V. Chan-Palay and C. Köhler, New York:Liss, 1989, p. 287-305.

Lacaille, J.-C. and Williams, S. Membrane properties of interneurons in stratum oriens/alveus of the CA1 region of rat hippocampus. *Neuroscience* 36:349-359, 1990.

Misgeld, U., Deisz, R.A., Dodt, H.U., and Lux, H.D. The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. *Science* 232:1413-1415, 1986.

Müller, W., Misgeld, U, and Lux, H.. Carbachol reduces $I_{K,Baclofen}$ but not $I_{K,GABA}$ in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 102:229-234, 1989.

Newberry, N.R. and Nicoll, R.A. Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature* 308:450-452, 1984a.

- Newberry, N.R. and Nicoll, R.A. A bicuculline-resistant inhibitory post-synaptic potential in rat hippocampal cells in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 348:239-254, 1984b.
- Newberry, N.R. and Nicoll, R.A. Comparison of the action of baclofen with γ -aminobutyric acid on rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 360: 161-165, 1985.
- Nicoll, R.A., Malenka, R.M., and Kauer, J.A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 70:513-565, 1990.
- Ogata, N., Inoue, M., and Matsuo, T. Contrasting properties of K^+ conductances induced by Baclofen and γ -aminobutyric acid in slices of the guinea pig hippocampus. *Synapse* 1:62-69, 1987.
- Olpe, H.-R., Karlsson, G., Pozza, M.F., Brugger, F., Steinmann, M., Riezen, H.V., Fagg, G., Hall, R.G., Froestl, W. and Bittiger, H. CGP-35348: a centrally active blocker of GABA_B receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 187:27-38, 1990.
- Olpe, H.-R., Steinmann, M., Ferrat, T., Pozza, M.F., Greiner, K., Brugger, F., Froestl, W., Mickel, S.J. and Bittiger, H. The actions of orally active GABA_B receptor antagonists on GABAergic transmission in vivo and invitro. *Eur. J. Pharmacol.* 233:179-186, 1993.
- Pham, T.M. and Lacaille, J.-C. GABA activates two distinct GABA_B postsynaptic responses in CA1 pyramidal cells of rat hippocampal slices. *Soc. Neurosci.*

Abstr. 20:1725, 1994a.

Pham, T.M. and Lacaille, J.-C. GABA hyperpolarizes CA1 pyramidal cells by two distinct GABA_B and K⁺-mediated mechanisms in rat hippocampal slices.

Physiol. Can. 25:128, 1994b.

Polenzani, L., Woodward, R.M. and Miledi, R. Expression of mammalian γ -aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4318-4322, 1991.

Premkumar, L.S., Chung, S.-H. and Gage, P.W. GABA-induced potassium channels in cultured neurons. *Proc. R. Soc. Lond.* B241:153-158, 1990.

Qian, H. and Dowling, J.E. Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina. *J. Neurosci.* 14:4299-4307, 1994.

Robertson, B. and Taylor, W.R. Effects of γ -aminobutyric acid and (-)baclofen on calcium and potassium currents in cat dorsal root ganglion neurones in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 89:661-672, 1986.

Saint, D.A., Thomas, T. and Gage, P.W. GABA_B agonists modulate a transient potassium current in cultured mammalian hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 118:9-13, 1990.

Samulack, D.D. and Lacaille, J.C. Hyperpolarizing synaptic potentials evoked in CA1 pyramidal cells by glutamate stimulation of interneurons from the oriens/alveus border of rat hippocampal slices. II. Sensitivity to GABA

- antagonists. *Hippocampus* 3:345-358, 1993.
- Samulack, D.D., Williams, S., and Lacaille, J.C. Hyperpolarizing synaptic potentials evoked in CA1 pyramidal cells by glutamate stimulation of interneurons from the oriens/alveus border of rat hippocampal slices. I. Electrophysiological response properties. *Hippocampus* 3:331-344, 1993.
- Schwartzkroin, P.A., and Prince, D.A. Changes in excitatory and inhibitory synaptic potentials leading to epileptogenic activity. *Brain Res.* 183:61-76, 1980.
- Sivilotti, L., and Nistri, A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 36:35-92, 1991.
- Solis, J.M. and Nicoll, R.A. Pharmacological characterization of GABA_B-mediated responses in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *J. Neurosci.* 12:3466-3472, 1992.
- Thalmann, R.H. Evidence that guanosine triphosphate (GTP)-binding proteins control a synaptic response in brain: effect of pertussis toxin and GTP γ S on the late inhibitory postsynaptic potential of hippocampal CA3 neurons. *J. Neurosci.* 8: 4589-4602, 1988.
- Thompson, S.M. Modulation of inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 42:575-609, 1994.
- Thompson, S.M., and Gähwiler, B.H. Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.*

- (*Lond.*) 451:329-345, 1992.
- Traub, R.D., Miles, R., and Wong, R.K.S. Models of synchronized hippocampal bursts in the presence of inhibition. I. Single population events. *J. Neurophysiol.* 58:739-751, 1987.
- Wagner, P.G. and Dekin, M.S. GABA_B receptors are coupled to a barium-insensitive outward rectifying potassium conductance in premotor respiratory neurons. *J. Neurophysiol.* 69:286-289, 1993.
- Williams, S. and Lacaille, J.-C. Bicuculline- and phaclofen-resistant hyperpolarizations evoked by glutamate applications to stratum lacunosum-moleculare in CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* 2:993-1003, 1990.
- Williams, S. and Lacaille, J.-C. GABA_B receptor-mediated inhibitory postsynaptic potentials evoked by electrical stimulation and by glutamate stimulation of interneurons in *stratum lacunosum-moleculare* in hippocampal CA1 pyramidal cells *in vitro*. *Synapse* 11:249-258, 1992.
- Woodward, R.M., Polenzani, L. and Miledi, R. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (ρ -like) γ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of γ -aminobutyric acid_A and γ -aminobutyric acid_B receptor agonists and antagonists. *Mol. Pharmacol.* 43:609-625, 1993.
- Xie, X. and Smart, T.G. Giant GABA_B-mediated synaptic potentials induced by

zinc in the rat hippocampus: Paradoxical effects of zinc on the GABA_B receptor. *Eur. J. Neurosci.* 5:430-436, 1993.

Table 1. Summary of properties of GABA and (-)BAC responses (mean \pm sem) elicited by local application to CA1 pyramidal cells, using different recording electrolytes.

Condition	Amplitude (mV)	Latency (s)	Recovery (s)	V_m (mV)	E_{rev} (mV) (n)
Control	-4.4 ± 0.1	2.2 ± 0.3	11.5 ± 0.8	-62.3 ± 1.4	-93.6 ± 3.5 (11)
in Ba ²⁺	* -2.1 ± 0.2	3.0 ± 0.5	13.3 ± 1.7	-63.1 ± 2.0	* -79.3 ± 1.8 (8)
in Ba ²⁺	* -3.9 ± 0.2	* 8.0 ± 0.5	* 77.5 ± 6.0	-60.5 ± 1.1	-87.3 ± 2.4 (8)
in Ba ²⁺	0	-	-	-62.0 ± 1.1	-
in Ba ²⁺	* -3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.5	8.4 ± 1.1	-62.5 ± 2.4	-90.8 ± 2.6 (10)
in Ba ²⁺	@ 4.5 ± 0.4	@ 0.9 ± 0.2	@ 5.1 ± 0.7	-64.0 ± 3.1	-
in Ba ²⁺	@ 3.3 ± 0.4	@ 1.4 ± 0.4	5.8 ± 0.5	-63.6 ± 1.6	-

*statistically different from GABA (KAc); $p < 0.05$

@statistically different from GABA (KCl); $p < 0.05$

Summary of effects of GABA_B antagonists on GABA and (-)BAC responses (mean amplitude \pm sem).

List	GABA responses (n)			(-)BAC responses (n)		
	Control	Antagonist	Wash	Control	Antagonist	Wash
1348	-4.0 \pm 0.4 mV (6)	-3.3 \pm 0.8 mV (6)	-	-4.7 \pm 0.3 mV (2)	0 mV (2)	-1.2 \pm 0.5 mV (2)
1845A	-3.8 \pm 0.4 mV (7)	0 mV (7)	-2.0 \pm 0.5 mV (5)	-	-	-

Figure 1. Pharmacologically isolated non-GABA_A responses and (-)BAC responses. *A:* Non-GABA_A responses were pharmacologically isolated in the presence of antagonists of GABA_A (50μM BIC and 50μM PIC), NMDA (100μM AP-5), and non-NMDA (40μM CNQX) receptors, and of a **blocker of GABA uptake** (1mM NIP). GABA application (arrow) hyperpolarized pyramidal cells. *B:* GABA responses, in a different cell, were largest at depolarized membrane potentials (-60mV) and became progressively smaller in amplitude when applications were repeated at more hyperpolarized membrane potentials (-60 to -97mV). *C:* (-)BAC application (arrow; different cell) in the absence of antagonists hyperpolarized the cell, but the time course of the responses was slower than for GABA responses (note different time calibrations for GABA (A,B) vs (-)BAC (C,D) traces). *D:* (-)BAC responses were also larger in amplitude at depolarized membrane potential (-60mV) and became null at hyperpolarized potentials (-77 to -87mV). Different cell from C. *E:* Graph of GABA and (-)BAC response amplitude vs membrane potential for the cells displayed in *B* and *D*, showing the similar E_{rev} and voltage sensitivity of these responses.

Figure 2. Differential sensitivity of GABA and (-)BAC responses to the K⁺ channel blocker Ba²⁺. *A:* In control ACSF (top trace) GABA produced a hyperpolarization. During bath application of 1mM Ba²⁺ (middle trace), the GABA response was reduced by about 50% of control amplitude. After wash-out of Ba²⁺ (bottom trace), the GABA response amplitude recovered. All traces obtained at V_m indicated on top trace (-53mV). *B:* In a different cell, (-)BAC responses were completely blocked by similar application of Ba²⁺ (middle trace). Ba²⁺ effects on (-)BAC responses were reversible by wash-out (bottom trace). All traces obtained at V_m indicated on top trace (-61mV). *C:* Summary histogram of mean amplitude of residual GABA (filled bar) and (-)BAC (open bar) responses in 1mM Ba²⁺, for all cells tested (number of cells in parentheses). (-)BAC responses were totally blocked, while GABA responses were only partially reduced to 45.8 ± 4.5% of control amplitude.

Figure 3. E_{rev} of Ba^{2+} -resistant GABA responses. *A:* GABA hyperpolarizations were reduced in 1mM Ba^{2+} . *B:* In 1mM Ba^{2+} , GABA applications were repeated at different membrane potentials. Ba^{2+} -resistant GABA responses were largest in amplitude at depolarized membrane potentials (-61mV), and were reduced at hyperpolarized membrane potentials (-71 to -81mV). *C:* Graph of the amplitude of Ba^{2+} -resistant GABA responses vs membrane potential obtained from another cell. E_{rev} of Ba^{2+} -resistant GABA responses was -83mV in this cell.

Figure 4. GABA responses with KCl-filled electrodes. During recordings with KCl-containing electrodes, GABA applications evoked large hyperpolarizing responses near resting membrane potential (-65mV). GABA responses were reduced at more negative membrane potentials, reaching equilibrium at -97mV for this cell.

Figure 5. GABA responses with electrodes containing the K^+ channel blocker Cs^+ . With electrodes containing CsCl, GABA evoked depolarizing responses at depolarized membrane potentials (-55mV). These depolarizing GABA responses displayed a faster peak latency and recovery time, than responses obtained with KCl-filled electrodes. In this cell, GABA depolarizations were reduced in amplitude at more hyperpolarized membrane potentials (-69 to -89mV).

Figure 6. GABA responses during recordings with electrodes containing LiCl. GABA applications evoked depolarizing responses at all membrane potential tested (-70 to -125mV) with LiCl-filled electrodes. These responses were generally similar to those observed with electrodes containing CsCl. In this cell, GABA response amplitude was smallest at depolarized membrane potential (-70mV) and increased at more hyperpolarized potentials (-81 to -125mV).

Figure 7. GABA responses recorded with electrodes containing GTP γ S. *A:* GABA-induced

hyperpolarizations recorded 60 minutes after impalement with an electrode containing GTP γ S (bottom trace) were reduced in comparison to responses evoked in the same cell 15 min after impalement (top trace). Traces are averages of 4 individual responses. *B*: Summary histograms for all cells tested with GTP γ S (number of cells in parentheses). In the left histogram, the mean amplitude of GABA responses 60 min after impalement with GTP γ S-containing electrodes (filled bar) was significantly decreased relative to responses obtained 15 min after impalement (shaded bar). In the right histogram, the mean amplitude of GABA responses obtained 30 min after perfusion with 1 mM Ba $^{2+}$ (i.e. 50 min after impalement with GTP γ S-containing electrodes; filled bar) were also significantly reduced in comparison to GABA responses obtained prior to Ba $^{2+}$ application (i.e. 15 min after cell impalement; shaded bar).

Figure 8. Differential sensitivity of GABA and (-)BAC responses to the GABA $_B$ antagonist CGP-35348. *A*: In the cell shown, GABA responses obtained in control ACSF (top trace) were not different from responses elicited during bath application of 1mM CGP-35348 (30 min; bottom trace). Traces obtained at V_m indicated on top trace (-76mV). *B*: In contrast, (-)BAC responses were fully suppressed during similar applications of CGP-35348 (middle vs top traces). (-)BAC responses partially recovered after washout of the antagonist (bottom trace). All traces obtained at V_m indicated on top trace (-61mV).

Figure 9. Block of GABA responses by the more potent GABA $_B$ antagonist CGP-55845A. GABA responses were completely blocked by bath application of 5 μ M CGP55845A (30 min; middle trace). GABA responses partially recovered after removal of CGP-55845A (bottom trace). All traces obtained at V_m indicated on top trace .

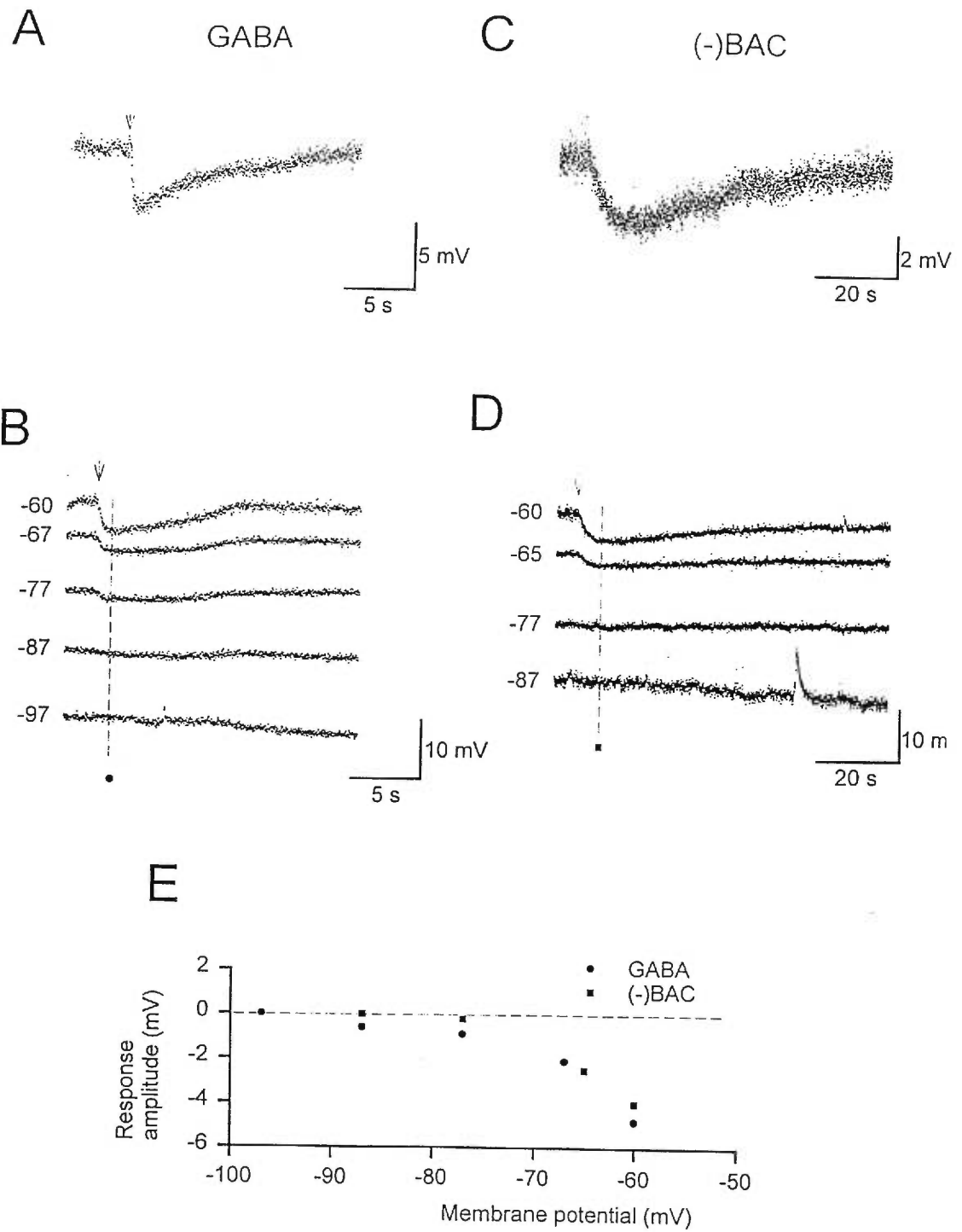


Figure 1

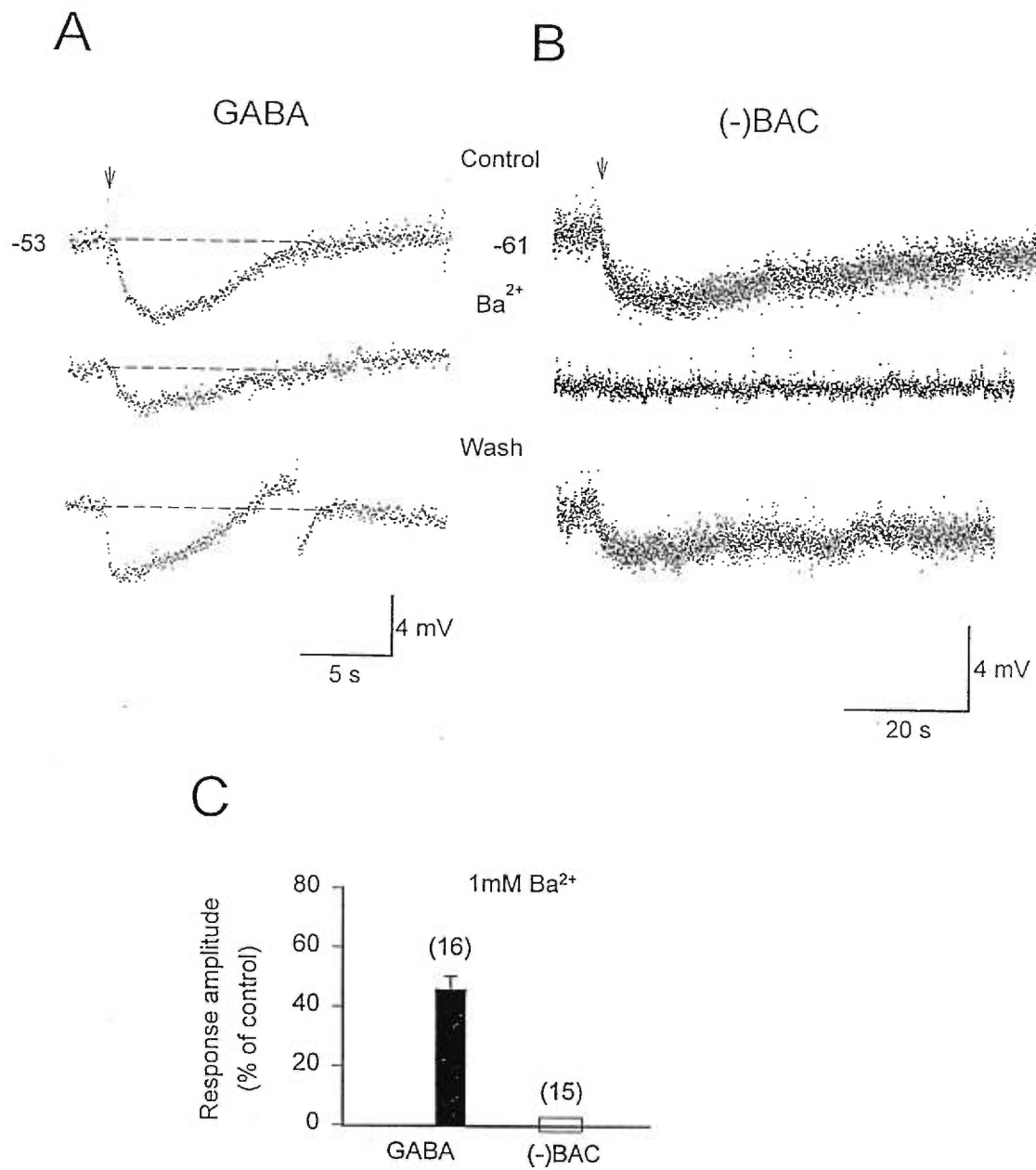


Figure 2

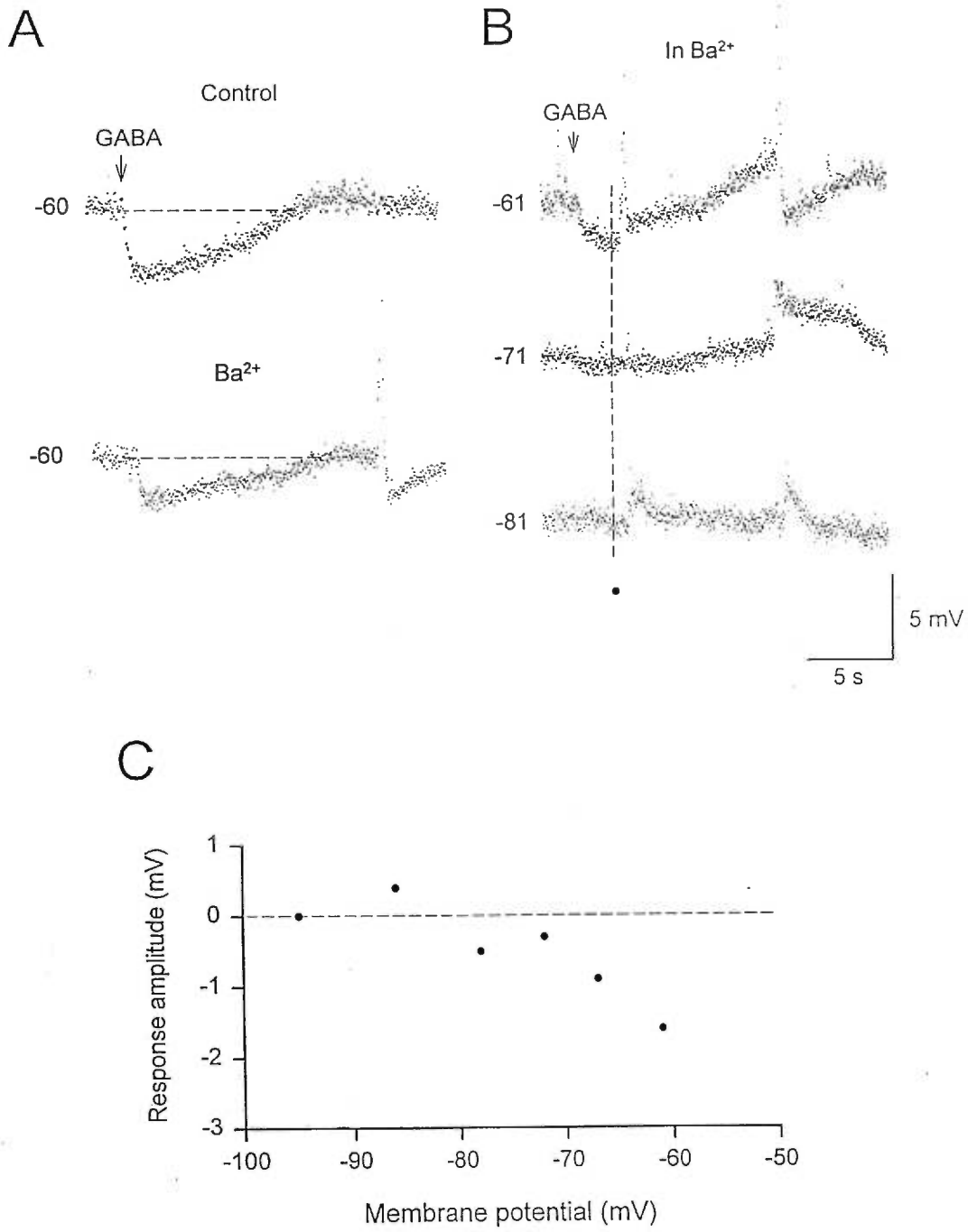


Figure 3

KCl

81

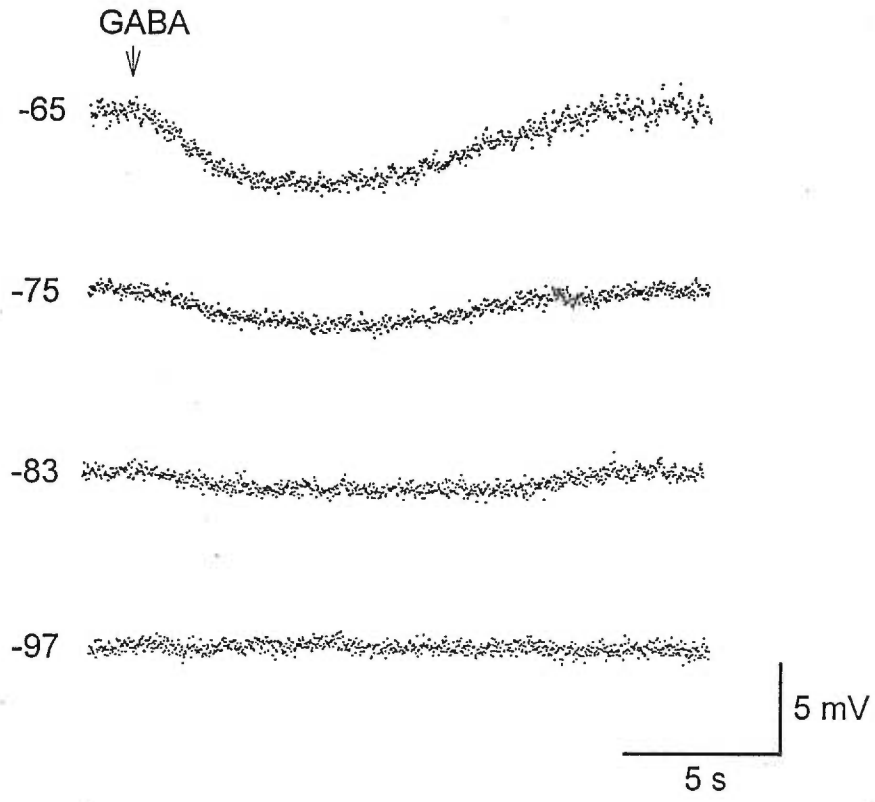


Figure 4

CsCl

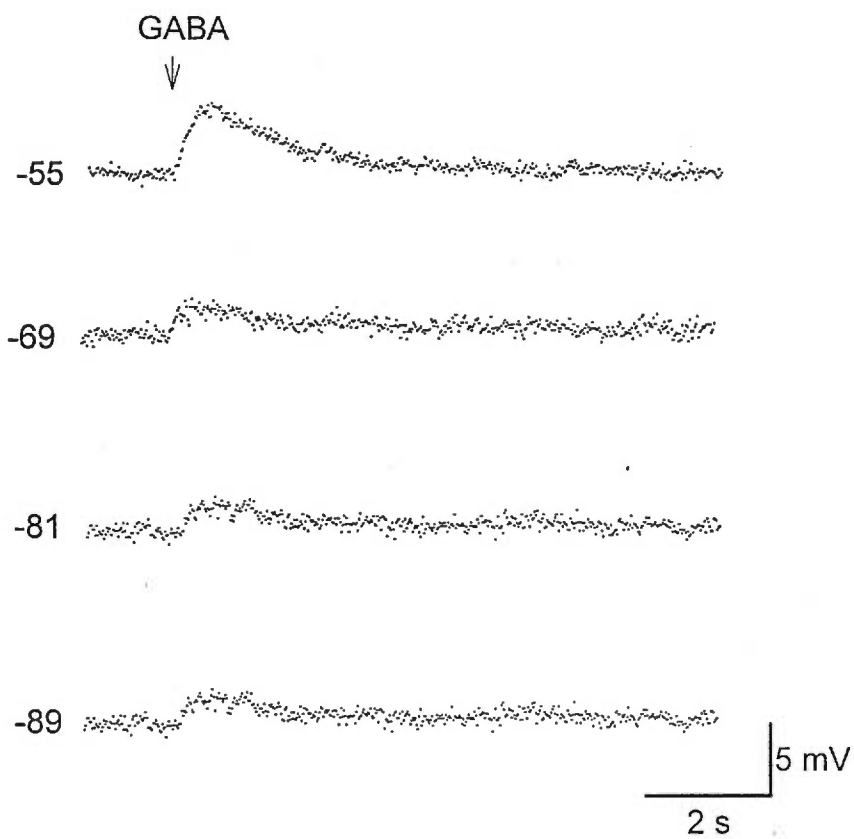


Figure 5

LiCl

83

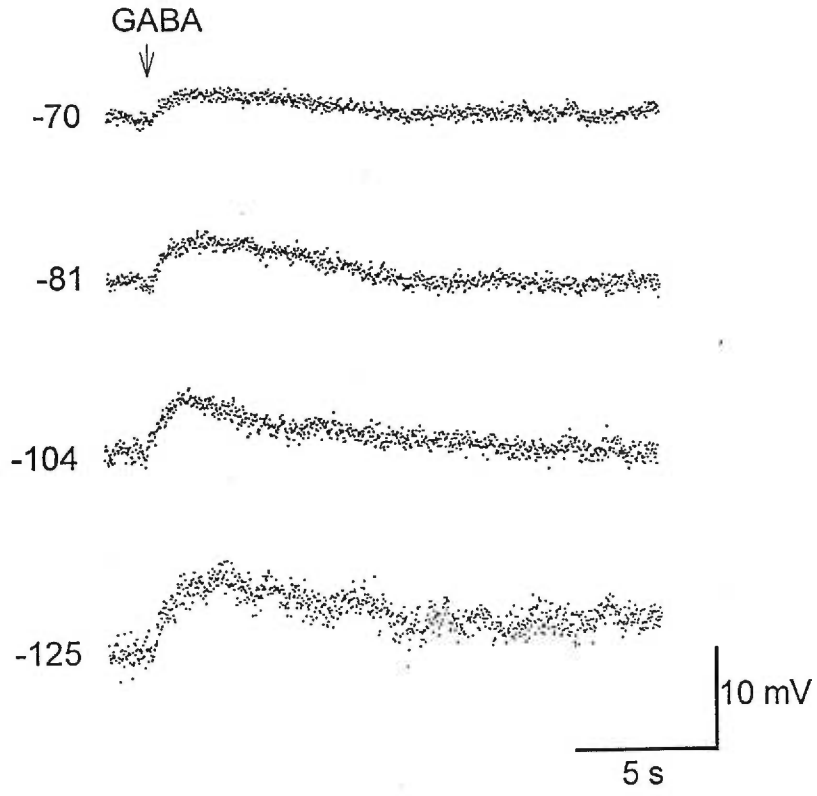
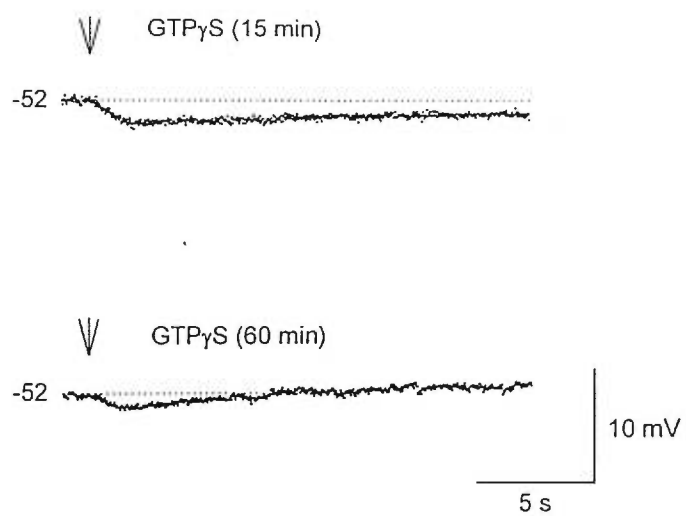


Figure 6

A



B

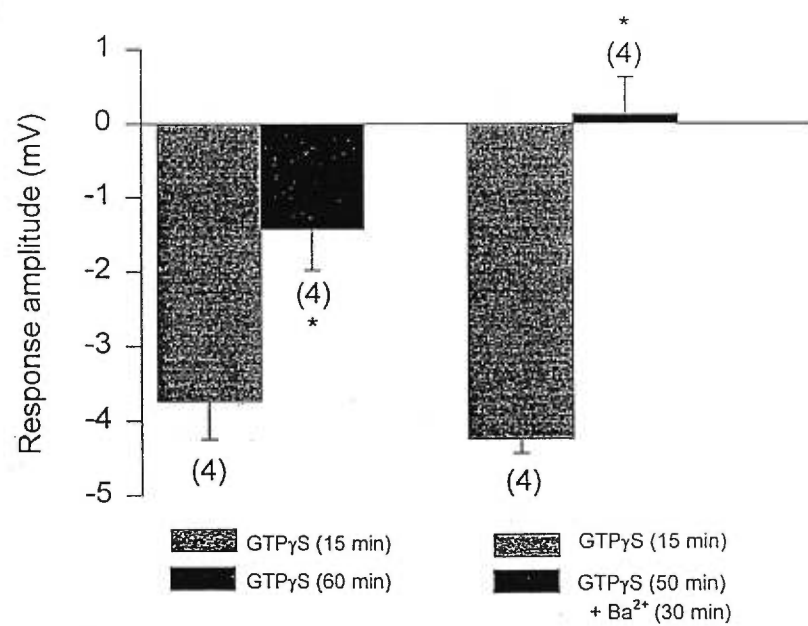


Figure 7

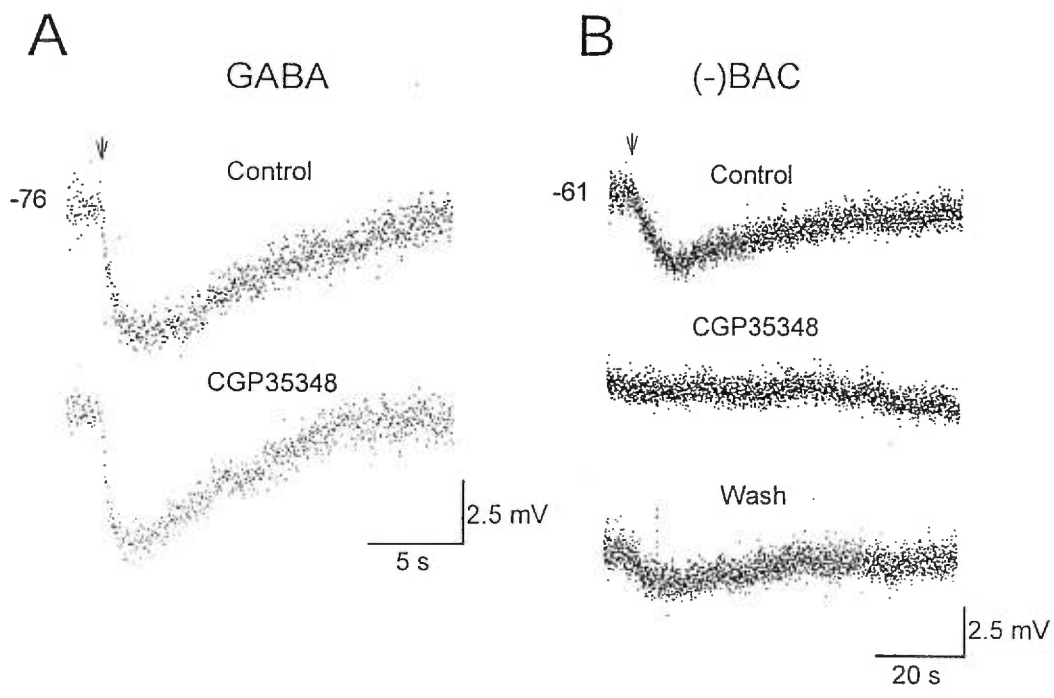


Figure 8

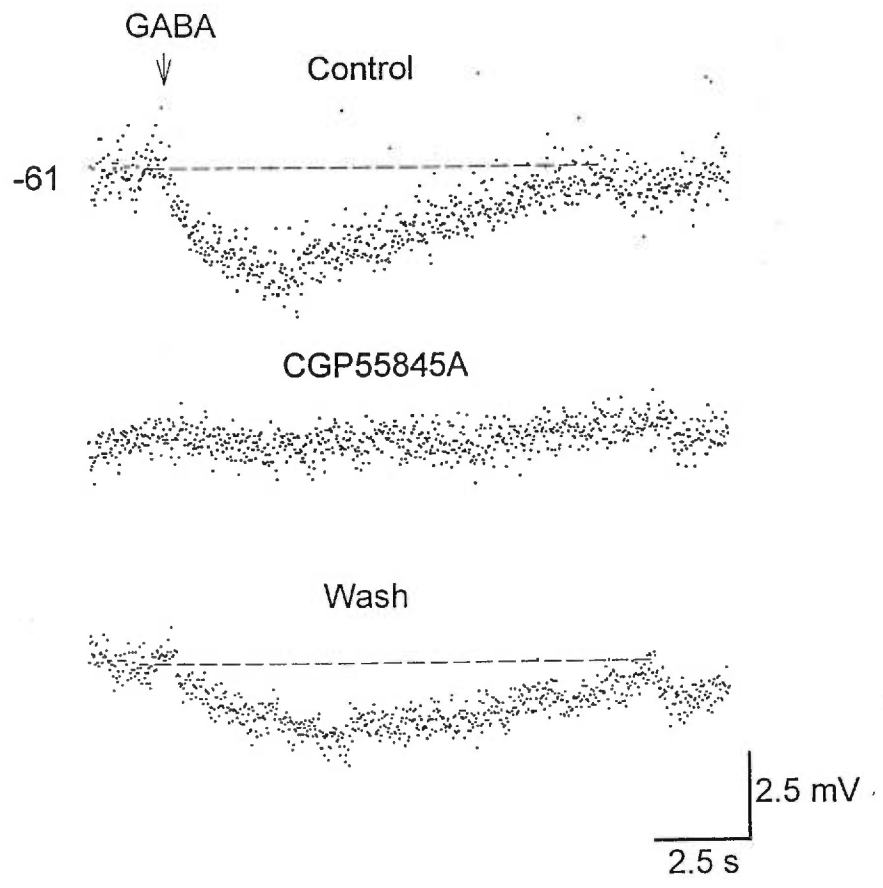


Figure 9

TROISIÈME CHAPITRE

DEUXIÈME ARTICLE:

**"Distinct GABA_B Actions via Synaptic and Extrasynaptic Receptors
in Rat Hippocampus In Vitro"**

**Publié dans:
Journal of Neurophysiology 80: 297-308, 1998**

**DISTINCT GABA_B ACTIONS VIA SYNAPTIC
AND EXTRA-SYNAPTIC RECEPTORS IN RAT HIPPOCAMPUS IN
VITRO**

Tri M. PHAM, Suzanne NURSE and Jean-Claude LACAILLE

Centre de recherche en sciences neurologiques, Département de physiologie,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Running Title: Synaptic and extra-synaptic GABA_B actions

Words in abstract = 400

Text pages = 34

Figures = 10

Tables = 0

Address for correspondence: Dr. J.-C. Lacaille

Département de physiologie

Faculté de médecine, Université de Montréal

P.O. Box 6128, Station Centre-Ville

Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7

Tel: (514) 343-5794

Fax: (514) 343-2111

Email: lacailj@ere.umontreal.ca

Abstract

Intracellular recordings were obtained from pyramidal cells to examine GABA_B-mediated synaptic mechanisms in the CA1 region of rat hippocampal slices. To investigate if heterogeneous ionic mechanisms linked to GABA_B receptors originate from distinct sets of inhibitory fibers, GABA_B-mediated monosynaptic late inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) were elicited in the presence of antagonists of ionotropic glutamate and GABA_A receptors and of an inhibitor of GABA uptake, and were compared after direct stimulation of inhibitory fibers in three different CA1 layers: stratum oriens, radiatum, and lacunosum-moleculare. No significant differences were found in mean amplitude, risetime, or time to decay to half-amplitude of IPSPs evoked from the three layers. Mean equilibrium potential (E_{rev}) of late IPSPs was similar for all groups and close to the equilibrium potential of K⁺. Bath application of the GABA_B antagonist CGP55845A blocked all monosynaptic late IPSPs. During recordings with micropipettes containing guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP γ S), the mean amplitude of all GABA_B IPSPs was gradually reduced. Bath application of Ba²⁺ completely eliminated monosynaptic late IPSPs evoked from any of the stimulation sites. Late IPSPs were completely blocked during Ba²⁺ applications that reduced only by ~50% the GABA_B-mediated hyperpolarizations elicited by local application of exogenous GABA. These results indicate that heterogeneous K⁺ conductances activated by GABA_B receptors do not originate from separate sets of inhibitory fibers in these layers. To examine if synchronous release of GABA from a larger number of inhibitory fibers could activate heterogeneous GABA_B mechanisms,

giant GABA_B IPSPs were induced by 4-aminopyridine (4-AP) in the presence of antagonists of ionotropic glutamate and GABA_A receptors. The amplitude and time course 4-AP-induced late IPSPs were approximately double that of evoked monosynaptic late IPSPs, but their voltage-sensitivity, E_{rev} , and antagonism by the GABA_B antagonist CGP55845A and intracellular GTP γ S were similar. Ba²⁺ completely abolished 4-AP-induced late IPSPs, while responses elicited by exogenous GABA were only reduced by about 50% in the same cells. These results indicate that synchronous activation of large numbers of inhibitory fibers, as induced by 4-AP, may not activate heterogenous GABA_B-mediated conductances. Similarly, Ba²⁺ blocked almost completely late inhibitory postsynaptic currents evoked by stimulus trains. Overall, our results show that exogenous GABA can activate heterogenous K⁺ conductances via GABA_B receptors, but that GABA released synaptically, either by electrical stimulation or 4-AP application, can only activate K⁺ conductances homogeneously sensitive to Ba²⁺. Thus, GABA_B receptors located at synaptic and extra-synaptic sites on hippocampal pyramidal cells may be linked to distinct K⁺ conductances.

Introduction

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the most prevalent inhibitory neurotransmitter in the brain (Nicoll et al. 1990; Sivilotti and Nistri 1991). In the hippocampus, GABA is released primarily from interneurons and interacts with two receptor subtypes on pyramidal cells: GABA_A and GABA_B (Thompson 1994). GABA_A receptors are ionotropic receptors that are antagonized by bicuculline and picrotoxin, and insensitive to baclofen. They mediate a well-characterized postsynaptic inhibition via an increase in Cl⁻ conductance and provide most of the fast inhibitory signalling in the central nervous system (Nicoll et al. 1990; Sivilotti and Nistri 1991). GABA_B receptors are metabotropic receptors at which baclofen is an agonist, but which are not antagonized by bicuculline (Bowery 1993; Kaupmann et al. 1997). GABA_B receptors mediate a slow type of postsynaptic inhibition via G-protein activation and an increase in K⁺ conductance (Dutar and Nicoll 1988a,b; Nicoll et al. 1990). GABA_B receptors are also located presynaptically on GABA and glutamate fibers where they mediate inhibition of transmitter release (Nicoll et al. 1990; Thompson 1994). These presynaptic actions appear to involve both a negative modulation of Ca²⁺ currents (Dunlap 1981; Wu and Saggau 1997) and activation of K⁺ currents (Thompson and Gähwiler 1992). Overall, activation of GABA_B receptors may result in either a decrease or an increase in pyramidal cell excitability depending on which receptors are being activated (i.e. postsynaptic vs presynaptic on GABA or glutamate fibers).

Although baclofen and GABA similarly increase an inwardly rectifying K^+ conductance which is blocked by Ba^{2+} and Cs^+ , several lines of evidence suggest the existence of some heterogeneity in $GABA_B$ receptor subtypes and their associated conductances in hippocampal neurons (Misgeld et al. 1995). Firstly, $GABA_B$ receptor antagonists such as CGP35348, phaclofen and 2-OH-saclofen antagonize less effectively postsynaptic responses to GABA than to baclofen, suggesting the presence of two subtypes of postsynaptic $GABA_B$ receptors (Solis and Nicoll 1992; Jarolimek et al. 1994; Pham and Lacaille 1996a). Secondly, K^+ conductances mediating $GABA_B$ IPSPs induced by 4-aminopyridine (4-AP) are not sensitive to Cs^+ , in contrast to those activated by baclofen (Jarolimek et al. 1994). Also, $GABA_B$ IPSPs evoked by glutamate activation of interneurons in stratum lacunosum-moleculare were not antagonized by Ba^{2+} , in contrast to $GABA_B$ -mediated late IPSPs evoked by electrical stimulation (Williams and Lacaille 1992). In addition, exogenous GABA has been shown to activate Ba^{2+} -sensitive and Ba^{2+} -insensitive K^+ conductances, whereas baclofen only activated Ba^{2+} -sensitive conductances (Pham and Lacaille 1996a). Finally, baclofen and GABA have been reported to open K^+ channels which display outward rectification in cultured hippocampal neurons (Premkumar et al. 1990). Baclofen- and GABA-activated K^+ conductances have also been found to be differentially modulated by muscarinic agonists (Müller and Misgeld 1989) and 4-aminopyridine (Inoue et al. 1985; Ogata et al. 1987), but these effects are controversial (Solis and Nicoll 1992). Heterogeneity of $GABA_B$ receptors or their associated K^+ conductances has also

been observed in other CNS neurons. In thalamocortical neurons, two different types of GABA_B receptors, with low and high affinities for baclofen, mediate inhibition of Ca²⁺ currents (Guyon and Leresche 1995). Also, in cultured premotor neurons, baclofen activates outwardly rectifying K⁺ channels that are insensitive to Ba²⁺ and Cs⁺ (Wagner and Dekin 1993). Finally, the recent cloning of GABA_B receptors has revealed two alternatively spliced variants of GABA_B receptors in the central nervous system (Kaupmann et al. 1997).

Since Ba²⁺ was shown to be an effective tool to discriminate between heterogeneous K⁺ conductances activated by exogenous GABA in CA1 pyramidal cells (Pham and Lacaille 1996a), the aim of the present work was to examine if synaptically-released GABA could activate multiple K⁺ conductances in the CA1 region of the hippocampus. We also examined if specific sets of inhibitory fibers could activate such distinct K⁺ conductances by comparing the properties of GABA_B IPSPs evoked by stimulation of distinct hippocampal layers: stratum oriens (OR), radiatum (RAD) and lacunosum-moleculare (L-M). Finally, we examined if synchronous release of GABA from a large number of inhibitory fibers was capable of activating these multiple K⁺ conductances by studying the properties of giant GABA_B IPSPs induced by 4-AP, as well as late inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) evoked by stimulus trains. Our results indicate that synaptically released GABA only activates Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances whereas exogenous GABA can activate both Ba²⁺-sensitive and -insensitive K⁺ conductances. These results imply that synaptic and extra-synaptic GABA_B receptors may be coupled to

different K⁺ conductances. Preliminary reports of this work have been presented in abstract form (Pham and Lacaille 1995, 1996b; Lacaille and Pham 1996).

Methods

Conventional hippocampal slices (400-450 μm thick) were obtained as described previously (Lacaille and Williams 1990; Samulack et al. 1993; Pham and Lacaille 1996a). Briefly, male Sprague-Dawley rats (125-250g) were anesthetized with ether and decapitated. The brain was quickly removed from the skull and placed in ice-cold, artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM) 124 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃ and 10 dextrose, saturated with 95% O₂-5% CO₂. The hippocampus was dissected out and transverse slices were cut using a McIlwain tissue chopper. Slices were placed in a gas/fluid interface chamber where their upper surface was exposed to a warm, humidified gas mixture (95% O₂-5% CO₂) and were maintained at 32 \pm 0.5^o C. They were perfused initially with normal ACSF, and subsequently with PO₄/SO₄-free ACSF (NaH₂PO₄ and MgSO₄ replaced with MgCl₂) containing antagonists of GABA_A receptors (50 μM bicuculline [BIC] and 50 μM picrotoxin [PIC]), of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (100 μM 2-amino-5-phosphonopentanoic acid, AP-5) and non-NMDA receptors (40 μM 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione, CNQX) for the duration of the experiments. A surgical cut was placed between CA3 and CA1 fields to synaptically disconnect the two regions.

Intracellular recordings were obtained from CA1 pyramidal cells.

Intracellular responses were recorded with an Axoclamp-2A amplifier (Axon Instruments) using glass microelectrodes filled with 4M potassium acetate (KAc) and 0.01M KCl (70-110 M Ω). Signals were stored in digitized format on a VHS video cassette recording system (Neurocorder DR-886) and displayed on a digital oscilloscope (Gould 1604). Signals of interest were further digitized using a microcomputer equipped with a data acquisition board (Axon Instruments TL-1-125) and the commercial software pClamp or Axotape (Axon Instruments). Recordings were considered acceptable if resting membrane potential (V_m) was > -55 mV, action potential amplitude was >60 mV, cellular input resistance was > 10 M Ω , and if V_m was stable without the injection of a steady hyperpolarizing current. Bridge balance was continuously monitored throughout the experiment and adjusted as necessary. In some experiments, recordings were made with microelectrodes containing 25mM guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP γ S; RBI) dissolved in 4M KAc. Resting membrane potential was measured after withdrawal from the cell.

GABA $_B$ -mediated monosynaptic late IPSPs were evoked in the presence of the GABA uptake blocker nipecotic acid (NIP, 1 mM, Sigma) by direct electrical stimulation (0.05 ms, 10-300 μ A) of inhibitory cells with a monopolar tungsten microelectrode placed in one of three dendritic layers: stratum oriens (OR), radiatum (RAD) or lacunosum-moleculare (L-M). The optimal stimulus strength was determined after a series of graded stimulations to obtain maximal IPSP amplitude and IPSPs were characterized at V_m just below threshold. Spontaneous

late IPSPs were induced by bath application of 100 μ M 4-aminopyridine (4-AP) in the presence of GABA_A, NMDA and non-NMDA antagonists. The amplitude of late IPSPs was measured at their peak. Equilibrium potential (E_{rev}) of IPSPs was obtained from a series of IPSPs with the membrane potential (V_m) set at different levels using intracellular current injection. Values for E_{rev} were calculated from the linear regression of response amplitude vs membrane potential.

Whole cell recordings were obtained as described previously (Ouardouz and Lacaille 1997). Hippocampal slices (300 μ m) were cut in cold (4° C) ACSF using a vibratome (Campden Instruments Ltd.). Slices were transferred to a submerged holding chamber and maintained in ACSF at room temperature for at least 1 hr. Prior to recording, a cut was made between CA1 and CA3 subfields and a slice was placed in a recording chamber on an upright microscope (Zeiss Axioskop). The slice was maintained submerged and perfused at a rate of 3 ml/min with ACSF at room temperature. Patch pipettes (3.5 – 6 M Ω) were filled with (in mM) : 140 K-gluconate, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 ATP-tris, 0.4 GTP-tris, pH adjusted to 7.2 – 7.3 with KOH. Whole-cell voltage clamp recordings were obtained using an Axopatch 1D amplifier (Axon Instruments) with low pass filtering at 10KHz (-3dB), from CA1 pyramidal cells visually identified using differential interference contrast and infrared video microscopy (Cohu 6500). Mean resting membrane potential was -59.5 ± 1.8 mV and mean series resistance was 13.0 ± 2.5 M Ω (n=6). GABA_B currents were isolated by perfusing the slices with PO₄/SO₄-free ACSF containing 50 μ M bicuculline, 50 μ M picrotoxin, 40 μ M

CNQX and 100 μ M AP-5. To evoke monosynaptic late GABA_B IPSCs, trains of stimuli (20 pulses, 100 Hz) were delivered to stratum radiatum using ultra-small concentric bipolar microelectrodes (Frederick Haer Co. 16-75-3). Late IPSCs were further lowpass filtered at 1KHz using an 8 pole Bessel filter (Frequency Devices 900L).

GABA (5 mM) was diluted in ACSF containing GABA_A, NMDA and non-NMDA antagonists and applied locally in stratum radiatum to dendrites of CA1 pyramidal cells by micropressure (drop diameter 50-100 μ m). The K⁺ channel blocker Ba²⁺ (1mM) and the GABA_B receptor antagonist CGP55845A (1 μ M, Ciba-Geigy) were bath applied. Action potential duration was routinely monitored during Ba²⁺ application to verify antagonist effects on K⁺ channels. Chemicals were obtained from Sigma unless otherwise noted.

For statistical analyses, a one-way analysis of variance (ANOVA) was used to test for differences between means of three groups (differences between stimulation sites). A one-way ANOVA for repeated measures was performed for assessing drug effects on three groups. A paired Student's *t*-test was used to compare means of single groups before and after treatment. Significance level was set at $P < 0.05$. Data are expressed as mean \pm sem.

Results

Monosynaptic and 4-AP-induced late IPSPs were examined in 84 pyramidal cells. For these cells, the mean resting V_m was -61.0 ± 0.6 mV, input resistance

was $36.9 \pm 1 \text{ M}\Omega$ and action potential amplitude was $87.1 \pm 0.7 \text{ mV}$.

Properties of monosynaptic late IPSPs

To isolate monosynaptic GABA_B-mediated IPSPs, electrical stimulation of inhibitory cells was applied in the presence of antagonists of GABA_A, NMDA and non-NMDA receptors, and an inhibitor of GABA uptake (Davies et al. 1990; Isaacson et al. 1993). To examine if postsynaptic GABA_B responses originating from different populations of inhibitory cells were similar, we compared the properties of monosynaptic late IPSPs evoked from three different strata: oriens, radiatum and lacunosum-moleculare. We found that responses evoked from these three sites were generally similar and no significant differences were found in either amplitude or time course between each group (Fig 1). The overall mean amplitude, risetime, and time to decay to half-amplitude of monosynaptic late IPSPs were $-4.5 \pm 0.2 \text{ mV}$, $99.6 \pm 7.1 \text{ ms}$ and $210.3 \pm 21.3 \text{ ms}$ respectively (n=38). Monosynaptic late IPSPs from each stimulation site appeared to result from outward K⁺ currents. There were no significant differences between the E_{rev} of monosynaptic late IPSPs evoked from each site (Fig 1) and the overall mean equilibrium potential was $-92.3 \pm 2.6 \text{ mV}$ (n=27). Response reversal was usually not seen for these monosynaptic late IPSPs in the range of membrane potentials tested (up to -100mV).

[Insert Fig 1 about here]

To verify that monosynaptic late IPSPs evoked from the three dendritic sites were mediated by GABA_B receptors, the GABA_B antagonist CGP55845A (1 μM) was bath applied (Davies et al. 1993). All monosynaptic late IPSPs were antagonized by CGP55845A within 10 minutes of application. The mean IPSP amplitude was reduced by 105.5% for IPSPs evoked from str. oriens (n=5 cells), by 107.1% for IPSPs evoked from str. radiatum (n=5 cells), and by 106.9% for IPSPs evoked from str. lacunosum-moleculare (n=4 cells) (Fig 2). The effects of CGP55845A were not reversible and IPSP amplitude did not recover after 30-90 minutes of washout of the antagonist.

[Insert Fig 2 about here]

To examine the involvement of G proteins in monosynaptic late IPSPs, recordings were made with microelectrodes containing 25mM GTPγS to irreversibly activate G-proteins and block their subsequent activation by GABA_B receptors (Andrade et al. 1986; Thalmann 1988). Gradual membrane potential hyperpolarization, presumably due to GTPγS activation of K⁺ conductances, was compensated by positive current injection. During recordings with microelectrodes containing GTPγS, the amplitude of monosynaptic late IPSPs evoked by stimulation of any of the three sites became smaller with time (Figure 3). IPSP amplitude, compared at 15 and 60 min after cell impalement, was reduced by 92.6% for IPSPs evoked from str. oriens (n=3), by 91.7% for IPSPs evoked from

str. radiatum (n=3), and by 95.5% for IPSPs evoked from str. lacunosum-moleculare (n=3) (Fig 3). In control experiments, without GTP γ S in the recording pipettes, monosynaptic late IPSP amplitude remained stable throughout similar recording periods (Fig 3, n=2).

[Insert Fig 3 about here]

Effects of Ba²⁺ on monosynaptic late IPSPs and GABA responses

To test if heterogeneous K⁺ conductances contributed to monosynaptic late IPSPs, the effects of Ba²⁺ (1 mM) were examined. Complete elimination of monosynaptic late IPSPs was observed within 15-25 minutes of Ba²⁺ perfusion (Figure 4). Monosynaptic late IPSPs, evoked by stimulation in any of the three layers, were similarly blocked, indicating that they were generated by potassium conductances that were uniformly sensitive to Ba²⁺ (n=19). The only Ba²⁺-resistant component of synaptic responses consisted of a depolarizing component with faster risetime and decay (e.g. Fig 4A) than monosynaptic late IPSPs. The nature of this depolarizing component was not characterized further.

Since no Ba²⁺-resistant component was found in monosynaptic late IPSPs, GABA was applied locally to verify that Ba²⁺-resistant GABA responses were present in these cells. As previously shown (Pham and Lacaille 1996a), local application of GABA to CA1 pyramidal cells elicited GABA_B hyperpolarizing responses that were reduced in amplitude by approximately 50% in Ba²⁺ (Figure

4C). In the same cells ($n=7$), while GABA_B responses were only partially blocked after 25 min of perfusion with Ba²⁺, monosynaptic late IPSPs were completely blocked (Figure 4D). Therefore, whereas monosynaptic late IPSPs were mediated by Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances, GABA_B responses, in the same cells, consisted of Ba²⁺-sensitive and Ba²⁺-insensitive components (Pham and Lacaille 1996a).

[Insert Fig 4 about here]

To verify that Ba²⁺ effects on monosynaptic late IPSPs did not arise from presynaptic effects on transmitter release, control experiments were conducted on biphasic GABA_A and GABA_B monosynaptic IPSPs in the absence of the GABA_A antagonists bicuculline and picrotoxin. Under these conditions, electrical stimulation of inhibitory cells and fibers (in the presence of AP-5 and CNQX) gave rise to biphasic IPSPs, consisting of an early GABA_A and a late GABA_B component (Fig 5A). Bath application of 1mM Ba²⁺ suppressed only the late GABA_B component of monosynaptic IPSPs while the early GABA_A component remained intact (Fig 5, $n=2$ cells). These results indicate that Ba²⁺ effects on monosynaptic late IPSPs did not result from effects on presynaptic Ca²⁺ processes that could have led to diminished GABA release.

[Insert Fig 5 about here]

Properties of 4-AP-induced late IPSPs

Since electrical stimulation of discrete CA1 layers did not elicit Ba²⁺-resistant monosynaptic late IPSPs, we next examined if a greater presynaptic release of GABA would activate Ba²⁺-resistant K⁺ conductances. 4-Aminopyridine is a blocker of voltage-activated K⁺ channels which causes rhythmic and synchronized bursting activity in GABAergic interneurons (Michelson and Wong 1994), increases GABA release from axon terminals (Buckle and Haas 1982), and induces giant spontaneous GABA IPSPs in hippocampal neurons (Segal 1987; Perreault and Avoli 1989; Müller and Misgeld 1991; Jarolimek and Misgeld 1993; Michelson and Wong 1994; Jarolimek et al. 1994). Thus, 4-AP (100 μ M) was bath-applied in the presence of GABA_A, NMDA and non-NMDA antagonists, to induce giant spontaneous GABA_B IPSPs. Within 5 minutes of application of 4-AP, spontaneously occurring slow IPSPs of large amplitude were recorded in all pyramidal cells (Fig 6). These 4-AP-induced IPSPs appeared at an average frequency of 1.5 ± 0.2 events per min (0.025 ± 0.004 Hz; n=20 cells). The mean amplitude, risetime and time to decay to half amplitude of 4-AP-induced IPSPs were -7.9 ± 0.4 mV, 233.7 ± 17.9 ms and 588.6 ± 48.4 ms respectively (n=22 cells). 4-AP-induced IPSPs were reduced in amplitude at hyperpolarized membrane potentials (Fig 6). The mean E_{rev} of 4-AP-induced late IPSPs was -103.8 ± 3.7 mV (n=8 cells). Response reversal was usually not seen for 4-AP-induced late IPSPs in the range of membrane potentials tested (up to -110 mV).

[Insert Fig 6 about here]

To verify that 4-AP-induced late IPSPs were mediated by GABA_B receptors, the GABA_B antagonist CGP55845A (1 μM) was bath applied. 4-AP-induced late IPSPs diminished in amplitude usually within 15 minutes of application of CGP55845A and gradually disappeared. (Fig 7, n=3 cells). The block of IPSPs by CGP55845A was not reversible with 45-60 minutes of washout (n=3 cells). These data demonstrate that the 4-AP-induced late IPSPs in our recording conditions were GABA_B receptor-mediated.

[Insert Fig 7 about here]

To confirm the involvement of G-proteins in the 4-AP-induced late IPSPs, recordings were made with electrodes containing 25mM GTPγS. Irreversible activation of G-proteins by the non-hydrolyzable GTP analog produced a gradual decrease in the amplitude of 4-AP-induced late IPSPs. IPSP amplitude was compared at 15, 30 and 60 minutes after cell impalement. After 30 minutes of recording, the mean amplitude of 4-AP-induced late IPSPs was reduced to $35.4 \pm 5.9\%$ compared to responses at 15 minutes. After 60 minutes of recording, the mean amplitude of IPSPs was further reduced to $6.9 \pm 3.8\%$ of initial responses (Fig 8, n=5 cells). In contrast, in control recordings with KAc-filled electrodes, 4-AP-induced late IPSPs showed no such reduction in amplitude after 60 minutes of

recording (Fig 8, n=3 cells).

[Insert Fig 8 about here]

Effects of Ba²⁺ on 4-AP-induced late IPSPs and on GABA responses

To examine if K⁺ conductances underlying 4-AP-induced late IPSPs were heterogeneous in terms of Ba²⁺-sensitivity, 1mM Ba²⁺ was bath applied. In the presence of Ba²⁺, 4-AP-induced late IPSPs gradually diminished in amplitude to a mean of $60.3 \pm 11.0\%$ of control after 15 minutes (Fig 9, n=9 cells). After 25 minutes in Ba²⁺, 4-AP-induced late IPSPs were completely blocked (Fig 9, n=8 cells). Mean amplitude of 4-AP-induced late IPSPs recovered to $67.1 \pm 4.1\%$ of control after 60 minutes of wash (Fig 9, n=8 cells). These data indicate that 4-AP-induced late IPSPs were mediated only by Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances.

In order to verify that Ba²⁺-resistant GABA_B conductances were present in cells showing no Ba²⁺-resistant 4-AP-induced late IPSPs, the effects of Ba²⁺ were tested at the same time on GABA_B responses elicited by GABA and on 4-AP-induced late IPSPs in the same cells. After 15 min in Ba²⁺, GABA responses were depressed to $62.1 \pm 8.6\%$ of control amplitude, whereas 4-AP-induced late IPSPs were reduced to $31.2 \pm 4.7\%$ of control amplitude (Fig 9, n=3 cells). After 30 minutes in Ba²⁺, GABA responses were further reduced to $43.1 \pm 6.9\%$ of control amplitude (Fig 9), while 4-AP-induced late IPSPs completely disappeared. The 4-AP-induced late IPSPs recovered to $79.7 \pm 3.1\%$ of control amplitude after 60

minutes of washout, while GABA responses recovered to $56.9 \pm 13.8\%$ of control amplitude (n=3 cells). These results demonstrate that Ba^{2+} -resistant $GABA_B$ responses were elicited by GABA in cells showing no Ba^{2+} -resistant component in 4-AP-induced late IPSPs.

[Insert Fig 9 about here]

Effects of Ba^{2+} on monosynaptic late IPSCs evoked by repetitive stimulation

To examine if Ba^{2+} -resistant K^+ conductances could be activated in conditions when GABA release was increased such that GABA could spill-over to extra-synaptic sites (Isaacson et al. 1993), we tested the effects of Ba^{2+} on monosynaptic late IPSCs evoked by stimulus trains. Monosynaptic late IPSCs were evoked during whole-cell voltage-clamp recordings of CA1 pyramidal cells by repetitive stimulation (20 pulses at 100 Hz), in ACSF containing CNQX, AP-5, BIC, and PIC. Late IPSCs were recorded as outward currents at holding potentials of -40 mV (Fig 10) and were blocked by CGP55845A (data not shown). Bath application of 1mM Ba^{2+} blocked these monosynaptic late IPSCs by about 90% (Fig 10, n=6 cells). These effects of Ba^{2+} were partially reversible upon wash-out (n=4 cells). These results suggest that synaptically-released GABA does not activate $GABA_B$ receptors linked to Ba^{2+} -resistant K^+ conductances even when GABA release is increased by such stimulus trains.

[Insert Fig 10 about here]

Discussion

The major findings of the present study were that electrical stimulation of inhibitory fibers in various dendritic layers of CA1 pyramidal cells, or 4-aminopyridine induced synchronous release of GABA from multiple inhibitory fibers, produced GABA_B-mediated hyperpolarizations involving K⁺ conductances that were homogeneously sensitive to Ba²⁺. In contrast, exogenous GABA hyperpolarized CA1 pyramidal cells via the activation of GABA_B receptors linked to heterogeneous K⁺ conductances differentially sensitive to Ba²⁺. These differences in responses evoked by exogenous and synaptically-released GABA suggest the presence of GABA_B receptors located at synaptic and extra-synaptic sites which are coupled to distinct K⁺ conductances in hippocampal CA1 pyramidal cells.

Monosynaptic activation of GABA_B-mediated K⁺ conductances by electrical stimulation.

Local application of GABA activates GABA_B receptors linked to two types of K⁺ conductances that can be distinguished on the basis of their sensitivity to Ba²⁺ in CA1 pyramidal cells (Pham and Lacaille 1996a). In contrast, local application of baclofen was found to open K⁺ conductances homogeneously sensitive to Ba²⁺

(Gähwiler and Brown 1985; Newberry and Nicoll 1985; Pham and Lacaille 1996a). Thus, exogenous GABA may activate two types of GABA_B receptors linked to two types of K⁺ conductances (Pham and Lacaille 1996a). These results were consistent with previous findings that selective activation of interneurons in stratum lacunosum-moleculare by local injection of glutamate produced GABA_B-mediated hyperpolarizations in CA1 pyramidal cells that were resistant to Ba²⁺, while, in the same cells, the polysynaptic late GABA_B-mediated IPSPs were antagonized (Williams and Lacaille 1992). Thus, release of endogenous GABA may be coupled to both Ba²⁺-sensitive and -insensitive K⁺ conductances and specific inhibitory fibers may be involved in the activation of these distinct K⁺ conductances.

The present results showed that similar GABA_B-mediated monosynaptic late IPSPs were elicited by stimulation of inhibitory fibers in any dendritic layers of CA1 pyramidal cells: stratum oriens, radiatum, or lacunosum-moleculare (Andrade et al. 1986; Dutar and Nicoll 1988a,b; Thalmann 1988; Pham and Lacaille 1996a; Jarolimek et al. 1993). In addition, these monosynaptic late IPSPs were completely blocked by Ba²⁺. Thus, synaptic release of endogenous GABA arising from single electrical stimulation of inhibitory fibers in any dendritic layer of the CA1 region activated GABA_B receptors coupled only to Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances. The absence of a Ba²⁺-resistant component in monosynaptic late IPSPs was not due to an absence of Ba²⁺-resistant K⁺ conductances, since the latter were elicited by exogenous GABA in the same cells. The block of monosynaptic late IPSPs could not be attributed to presynaptic actions of Ba²⁺ on GABA release, since Ba²⁺

selectively suppressed the late component of biphasic monosynaptic IPSPs without blocking the early component (Knowles et al. 1984; Lambert et al. 1991; Williams and Lacaille 1992). Other presynaptic actions of Ba^{2+} that could have influenced GABA release were its blocking actions on K^+ conductances, however these would have led to increases in transmitter release. Previous studies of Ba^{2+} effects on $GABA_B$ -mediated IPSPs reported variable effects, with partial to complete block of polysynaptic late IPSPs by bath application of 1-2mM Ba^{2+} (Alger 1984; Knowles et al. 1984). However, monosynaptic late IPSPs in CA3 pyramidal cells evoked by statum lucidum stimulation were completely blocked by bath application of 300 μ M Ba^{2+} (Xie and Smart 1993).

Giant synchronous $GABA_B$ IPSPs induced by 4-AP

The complete block of single-pulse evoked monosynaptic late IPSPs by Ba^{2+} suggested that perhaps more GABA needed to be released in order to activate $GABA_B$ receptors coupled to Ba^{2+} -insensitive K^+ conductances. Low concentrations of 4-AP are known to enhance transmitter release at excitatory and inhibitory synapses (Thesleff 1980; Buckle and Haas 1982; Perreault and Avoli 1989), to induce a synchronization of hippocampal inhibitory interneurons (Segal 1987; Michelson and Wong 1994), and to produce giant synchronous $GABA_B$ IPSPs (Segal 1987; Perreault and Avoli 1989; Jarolimek and Misgeld 1993). Bath application of 4-AP generated spontaneous late IPSPs with an amplitude and time course double that of monosynaptic late IPSPs, indicating that more GABA was

being released (Perreault and Avoli 1989; Misgeld et al. 1992; Jarolimek and Misgeld 1993; Jarolimek et al. 1993, 1994). The equilibrium potential of 4-AP-induced late IPSPs was close to E_K , but more hyperpolarized (~ -100 mV) than that of monosynaptic late IPSPs (~ -90 mV). Other investigators have observed similar E_{rev} of 4-AP-induced late IPSPs (Misgeld et al. 1992; Jarolimek et al. 1993, 1994) and attributed them to the blocking actions of 4-AP on K^+ conductances (Misgeld et al. 1992). However, in some of the present experiments, a depolarizing response was found to partially overlap with monosynaptic late IPSPs (Figure 4A in Ba^{2+}) and this component may have resulted in a shift of the E_{rev} of monosynaptic IPSPs in a more depolarized direction. Despite the enhanced GABA release, 4-AP-induced late IPSPs were completely and reversibly blocked by Ba^{2+} . Similarly, when synaptic release of GABA was increased by using 20 pulses stimulus trains (Isaacson et al. 1993), late IPSCs were almost completely blocked by Ba^{2+} . Thus, even under conditions of increased release induced either by 4-AP or by repetitive stimulation, synaptically released GABA activated only $GABA_B$ receptors coupled to Ba^{2+} -sensitive K^+ conductances.

Synaptic and extra-synaptic $GABA_B$ receptors

The absence of coupling of synaptically released GABA to Ba^{2+} -insensitive K^+ conductances is in contrast to the responses of pyramidal cells to exogenous GABA which are coupled to both Ba^{2+} -sensitive and -insensitive K^+ conductances (Pham and Lacaille 1996a). Overall, these results argue for the presence of $GABA_B$

receptors localized at synaptic and extra-synaptic sites, and for a coupling of synaptic and extra-synaptic GABA_B receptors to different K⁺ conductances. Thus, synaptic GABA_B receptors, activated by synaptically released GABA, appear to be homogeneously coupled to Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances, whereas extra-synaptic GABA_B receptors, activated by exogenous GABA, may be linked to Ba²⁺-insensitive K⁺ conductances. Extra-synaptic GABA_B receptors could also be coupled to Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances. Estimates of single channel conductance of K⁺ channels activated by synaptically released GABA and by exogenous agonists are also consistent with such a presence of synaptic and extra-synaptic GABA_B receptors coupled to distinct K⁺ channels in hippocampal neurons. Using non-stationary variance analysis, synaptically-released GABA has been reported to activate small conductance channels (~8 pS) (De Koninck and Mody 1997), whereas during single channel recordings exogenous GABA has been found to open large conductance K⁺ channels (~65pS) (Premkumar and Gage 1994). Thus, GABA_B receptors or K⁺ channels activated by synaptically released GABA may be distinct from those stimulated by exogenous agonists (De Koninck and Mody 1997). Similarly, in hippocampal CA3 pyramidal neurons, synaptic and extra-synaptic GABA_B receptors coupled to different K⁺ channels have been proposed to account for the different sensitivity of baclofen responses and of 4-AP-induced late IPSPs to the K⁺ channels blocker Cs⁺ (Jarolimek et al. 1994).

The present results appear to be inconsistent with reports of GABA_B-mediated IPSPs elicited by glutamate stimulation of interneurons which were not

blocked by Ba^{2+} (Williams and Lacaille 1992), i.e. synaptically-activated Ba^{2+} -insensitive K^+ conductances. Multiple factors may account for this apparent discrepancy. First, the differences in Ba^{2+} effects in the two studies may be due to the different methods of application of Ba^{2+} . In the present study, bath application of Ba^{2+} insured a homogeneous application to the slice, whereas in the previous study, local drop application was used. Thus, in the latter case, the preferential block of electrically-evoked, and not of glutamate-evoked, late IPSPs (Williams and Lacaille 1992) could have been due to a restricted regional block of K^+ conductances. However, this possibility is difficult to reconcile with the observation of similar blocking effects by local drop application of a $GABA_B$ antagonist (2-OH-saclofen) on both electrically- and glutamate-evoked late IPSPs in the same study (Williams and Lacaille 1992). Alternatively, these differences may be due to the different modes of stimulation. In the present study, single and 20 pulses of presynaptic stimulation, as well as 4-AP-induced synchronous activation, were used to elicit release of GABA, whereas glutamate stimulation of interneurons, which probably involved a more sustained presynaptic activation of inhibitory cells (Samulack et al. 1993), was used in the previous study (Williams and Lacaille 1992). Such sustained activation of interneurons with glutamate may have resulted in more GABA release than in the present study, and possibly more spillover of transmitter to extra-synaptic sites. However, the almost complete block by Ba^{2+} of train-evoked late IPSCs would suggest that GABA release needs to exceed that evoked by 20 pulses stimulation for spill-over to reach extra-synaptic

GABA_B receptors.

GABA_B receptor heterogeneity

Bonnano and Raiteri (1993a,b) have proposed a classification for heterogeneous GABA_B receptors, based primarily on GABA_B inhibition of transmitter release in the CNS. In this classification, two main subtypes of GABA_B receptors have been differentiated: GABA_{B1} receptors which are baclofen-sensitive, and GABA_{B2} receptors which are baclofen-insensitive. We have previously shown that Ba²⁺-sensitive and -insensitive K⁺ conductances appear to be coupled to different GABA_B receptors, since the former are activated by baclofen and GABA but the latter only by GABA (Pham and Lacaille 1996a). Thus, according to the classification of Bonnano and Raiteri (1993a,b), Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances may be coupled to GABA_{B1} receptors and Ba²⁺-insensitive K⁺ conductances to GABA_{B2} receptors (Pham and Lacaille 1996a). The present results suggest that Ba²⁺-sensitive K⁺ conductances may be linked to synaptic GABA_{B1} receptors, whereas Ba²⁺-insensitive K⁺ conductances may be coupled to extra-synaptic GABA_{B2} receptors. The correspondence of this classification to the structurally different types of GABA_B receptors identified recently (Kaupmann et al. 1997) remains to be determined.

Physiological implications

The presence of GABA_B receptors localized at synaptic and extra-synaptic

sites suggests that their activation may be differentially regulated. Receptors at synaptic sites may be readily activated by GABA released during single activation of inhibitory fibers (Dutar and Nicoll 1988a). In contrast, extra-synaptic receptors may only be activated when sufficient GABA is released to spill over to more remote sites. Activation of GABA_B receptors by spill-over of synaptically released GABA has been shown to occur in heterosynaptic depression of excitatory synaptic transmission induced by repetitive stimulation in the hippocampus (Isaacson et al. 1993). Although in this case, the spill-over of GABA is to presynaptic receptors, a similar phenomenon could also take place at postsynaptic receptors. The situation may be analogous, in part, to the activation of metabotropic receptors at glutamate synapses where these receptors have been localized at perisynaptic membrane sites (Baude et al. 1993). Single-pulse stimulus, or low frequency stimuli, may not release enough neurotransmitter to reach these perisynaptic receptors and may only activate receptors located at synaptic sites. In contrast, agonist application, or sustained higher frequency stimuli that release more transmitter, could activate these extra-synaptic receptors. Such a stimulus-dependent activation of extra-synaptic GABA_B receptors would likely play a role during periods of intense presynaptic stimulation and may thus become relevant during conditions of hyperexcitability such as during epileptiform activity. Our results indicate, however, that these conditions would need to exceed those encountered during 4-AP-induced hyperactivity or after short trains of repetitive stimulation.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (to J.-C.L.). J.-C.L. was a Senior Scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), a member of the Research Group on the Central Nervous System (Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche [FCAR]), and a member of a FCAR-Équipe de Recherche. T.M.P. was supported by a studentship from the Savoy Foundation, and S.N. by a postdoctoral fellowship from the FRSQ. The authors wish to thank Ciba-Geigy for the generous gift of CGP-55845A.

References

- Alger, B.E. Characteristics of a slow hyperpolarizing synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Neurophysiol.* 52: 892-910, 1984.
- Andrade, R., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. A G-protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234: 1261-1265, 1986.
- Baude, A., Nusser, Z., Roberts, J.D.B., Mulvihill, E., McIlhinney, R.A.J. and Somogyi, P. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11: 771-787, 1993.
- Bonanno, G. and Raiteri, M. Multiple GABA_B receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 259-261, 1993a.
- Bonanno, G. and Raiteri, M. γ -Aminobutyric acid (GABA) autoreceptors in rat cerebral cortex and spinal cord represent pharmacologically distinct subtypes of the GABA_B receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 765-770, 1993b.
- Bowery, N.G. GABA_B receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 109-147, 1993.
- Buckle, P.J. and Haas, H.L. Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 326: 109-122, 1982.
- Davies, C.H., Pozza, M.F., and Collingridge, G.L. CGP 55845A: A potent

- antagonist of GABA_B receptors in the CA1 region of rat hippocampus. *Neuropharmacol.* 32: 1071-1073, 1993.
- Davies, C.H., Davies, S.N., and Collingridge, G.L. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 424: 513-531, 1990.
- De Koninck, Y., and Mody, I. Endogenous GABA activates small conductance K⁺ channels underlying slow IPSCs in rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 77: 2202-2208, 1997.
- Dunlap, K. Two types of γ -aminobutyric acid receptor on embryonic sensory neurones. *Br. J. Pharmacol.* 74: 579-585, 1981.
- Dutar, P., and Nicoll, R. A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. *Nature* 332: 156-158, 1988a.
- Dutar, P., and Nicoll, R. Pre- and postsynaptic GABA_B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1: 585-591, 1988b.
- Gähwiler, B.H., and Brown, D.A. GABA_B-receptor-activated K⁺ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1558-1562, 1985.
- Guyon, A., and Leresche, N. Modulation by different GABA_B receptor types of voltage-activated calcium currents in rat thalamocortical neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 485: 29-42, 1995.
- Inoue, M., Matsuo, T., and Ogata, N. Possible involvement of K⁺ conductance in the action of γ -aminobutyric acid in the guinea-pig hippocampus. *Br. J.*

Pharmacol. 85: 515-524, 1985.

Isaacson, J.S., Solis, J.M., and Nicoll, R.A. Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10: 165-175, 1993.

Jarolimek, W., Bijak, M., and Misgeld, U. Differences in the Cs block of baclofen and 4-aminopyridine induced potassium currents of guinea pig CA3 neurons in vitro. *Synapse* 18: 169-177, 1994.

Jarolimek, W., Demmelhuber, J., Bijak, M., and Misgeld, U. CGP-55845A blocks baclofen, γ -aminobutyric acid and inhibitory postsynaptic potassium currents in guinea pig CA3 neurons. *Neurosci. Lett.* 154: 31-34, 1993.

Jarolimek, W., and Misgeld, U. 4-Aminopyridine-induced synaptic GABA_B currents in granule cells of the guinea-pig hippocampus. *Pflügers Arch.* 425: 491-498, 1993.

Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., and Bettler, B. Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386: 239-246, 1997.

Knowles, W.D., Schneidermann, J.H., Wheal, H.V., Stafstrom, C.E., and Schwartzkroin, P.A. Hyperpolarizing potentials in guinea-pig hippocampal CA3 neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 4: 207-230, 1984.

Lacaille, J.-C., and Pham, T.M. Multiple postsynaptic GABA_B actions in rat hippocampus: Evidence for synaptic and extra-synaptic receptors. *Pharmacol. Rev. Comm.* 8 :177-180, 1996.

- Lacaille, J.-C., and Williams, S. Membrane properties of interneurons in stratum oriens/alveus of the CA1 region of rat hippocampus. *Neuroscience* 36: 349-359, 1990.
- Lambert, N.A., Harrison, N.L., and Teyler, T.J. Baclofen-induced disinhibition in area CA1 of rat hippocampus is resistant to extracellular Ba^{2+} . *Brain Res.* 547: 349-352, 1991.
- Michelson, H.B., and Wong, R.K.S. Synchronization of inhibitory neurones in the guinea pig hippocampus in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 477: 35-45, 1994.
- Misgeld, U., Bijak, M., Brunner, H., and Dembowsky, K. K-dependent inhibition in the dentate-CA3 network of guinea pig hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 68: 1548-1557, 1992.
- Misgeld, U., Bijak, M., and Jarolimek, W. A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 46: 423-462, 1995.
- Müller, W., and Misgeld, U. Carbachol reduces $I_{K,Baclofen}$ but not $I_{K,GABA}$ in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 102: 229-234, 1989.
- Müller, W., and Misgeld, U. Picrotoxin- and 4-aminopyridine-induced activity in hilar neurons in the guinea pig hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* 65 : 141-147, 1991.
- Newberry, N.R., and Nicoll, R.A. Comparison of the action of baclofen with γ -aminobutyric acid on rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 360: 161-165, 1985.

- Nicoll, R.A., Malenka, R.M., and Kauer, J.A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 70: 513-565, 1990.
- Ogata, N., Inoue, M., and Matsuo, T. Contrasting properties of K⁺ conductances induced by Baclofen and γ -aminobutyric acid in slices of the guinea pig hippocampus. *Synapse* 1: 62-69, 1987.
- Ouardouz, M., and Lacaille, J.-C. Properties of unitary IPSCs in hippocampal pyramidal cells originating from different types of interneurons in young rats. *J. Neurophysiol.* 77: 1939-1949, 1997.
- Perreault, P., and Avoli, M. Effects of low concentrations of 4-aminopyridine on CA1 pyramidal cells of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 61: 953-970, 1989.
- Pham, T.M., and Lacaille, J.-C. Ba²⁺ sensitivity of monosynaptic and 4-AP-induced GABA_B IPSPs of rat hippocampal slices. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 2047, 1995.
- Pham, T.M., and Lacaille, J.-C. Multiple postsynaptic actions of GABA via GABA_B receptors on CA1 pyramidal cells of rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 76: 69-80, 1996a.
- Pham, T.M., and Lacaille, J.-C. Multiple postsynaptic GABA_B actions in rat hippocampus: evidence for synaptic and extra-synaptic receptors. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22: 1294, 1996b.
- Premkumar, L.S., Chung, S.-H., and Gage, P.W. GABA-induced potassium channels in cultured neurons. *Proc. R. Soc. Lond.* B241: 153-158, 1990.
- Premkumar, L.S., and Gage, P.W. Potassium channels activated by GABA_B agonists

and serotonin in cultured hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 71: 2570-2575, 1994.

Samulack, D.D., Williams, S., and Lacaille, J.-C. Hyperpolarizing synaptic potentials evoked in CA1 pyramidal cells by glutamate stimulation of interneurons from the oriens/alveus border of rat hippocampal slices. I. Electrophysiological response properties. *Hippocampus* 3: 331-344, 1993.

Segal, M. Repetitive inhibitory postsynaptic potentials evoked by 4-aminopyridine in hippocampal neurons in vitro. *Brain Res.* 414: 285-293, 1987.

Sivilotti, L., and Nistri, A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 36: 35-92, 1991.

Solis, J.M., and Nicoll, R.A. Pharmacological characterization of GABA_B-mediated responses in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *J. Neurosci.* 12: 3466-3472, 1992.

Thalmann, R.H. Evidence that guanosine triphosphate (GTP)-binding proteins control a synaptic response in brain: effect of pertussis toxin and GTP γ S on the late inhibitory postsynaptic potential of hippocampal CA3 neurons. *J. Neurosci.* 8: 4589-4602, 1988.

Thesleff, S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5:1413-1419, 1980.

Thompson, S.M. Modulation of inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 42: 575-609, 1994.

Thompson, S.M., and Gähwiler, B.H. Comparison of the actions of baclofen at pre-

and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 451: 329-345, 1992.

Wagner, P.G., and DeKain, M.S. GABA_B receptors are coupled to a barium-insensitive outward rectifying potassium conductance in premotor respiratory neurons. *J. Neurophysiol.* 69: 286-289, 1993.

Williams, S., and Lacaille, J.-C. GABA_B receptor-mediated inhibitory postsynaptic potentials evoked by electrical stimulation and by glutamate stimulation of interneurons in *stratum lacunosum-moleculare* in hippocampal CA1 pyramidal cells *in vitro*. *Synapse* 11: 249-258, 1992.

Wu, L.-G., and Saggau, P. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 20: 204-212, 1997.

Xie, X., and Smart, T.G. Giant GABA_B-mediated synaptic potentials induced by zinc in the rat hippocampus: Paradoxical effects of zinc on the GABA_B receptor. *Eur. J. Neurosci.* 5: 430-436, 1993.

Figure 1. Monosynaptic late IPSPs evoked by stimulation of different dendritic layers: stratum oriens, radiatum, or lacunosum-moleculare. A: Intracellular recordings from 3 representative CA1 pyramidal cells showing monosynaptic late IPSPs obtained in the presence of 50 μ M bicuculline (BIC), 50 μ M picrotoxin (PIC), 100 μ M AP-5, 40 μ M CNQX, and 1mM nipecotic acid (NIP). IPSPs evoked from the three different sites had similar amplitude, risetime and recovery time. B:

In another representative cell, the peak amplitude (filled circle) of monosynaptic late IPSPs (str. oriens stimulation) decreased at hyperpolarized membrane potentials and became null near -94 mV. C: Summary histograms for all cells tested. The mean amplitude, risetime, time to decay to half-amplitude, and equilibrium potential were not significantly different between IPSPs evoked from the three layers.

Figure 2. Effects of a GABA_B antagonist on monosynaptic late IPSPs. A: Representative example of monosynaptic late IPSPs evoked by stratum radiatum stimulation in control condition (top), and after 10 min in 1 μ M CGP55845A (middle). Superimposed traces (bottom) show the complete block of IPSPs by CGP55845A. B: Summary histogram for all cells tested (n=14), showing similar antagonistic effects of CGP55845A on the amplitude of monosynaptic late IPSPs evoked by stimulation of stratum oriens (or), radiatum (rad) or lacunosum-moleculare (l-m).

Figure 3. Effects of GTP γ S on monosynaptic late IPSPs. A: Representative monosynaptic late IPSPs evoked by stratum oriens stimulation recorded at 15 (top) and 60 (middle) minutes after cell impalement with an electrode containing 25mM GTP γ S. Superimposed traces (bottom) show that after 60 minutes of recording with the GTP γ S-containing electrode, IPSP amplitude was blocked in this cell. B: In control recordings with electrodes containing KAc, monosynaptic late IPSPs did not show such reduction in amplitude. C: Summary histogram for all cells tested (n=11) illustrating that monosynaptic late IPSPs evoked by stimulation of stratum oriens (or), radiatum (rad), and lacunosum moleculare (l-m) were similarly antagonized by intracellular GTP γ S, but were not reduced during recordings with KAc-containing electrodes.

Figure 4. Differential effects of Ba $^{2+}$ on monosynaptic late IPSPs and GABA $_B$ responses. A: Representative monosynaptic late IPSPs evoked by stratum lacunosum-moleculare stimulation in control (top), after 15 min in the presence of 1mM Ba $^{2+}$ (middle), and following a 60 min washout period (bottom). The monosynaptic IPSP (filled circle) was blocked completely and reversibly by Ba $^{2+}$. The only residual response in Ba $^{2+}$ was a depolarizing response (double arrows) with faster onset, risetime and decay than the late IPSP (filled circle). B: Summary histogram for all cells tested (n=19), illustrating that monosynaptic late IPSPs evoked by stimulation of stratum oriens (or), radiatum (rad) and lacunosum-moleculare (l-m) were all antagonized by Ba $^{2+}$ (* indicates significant difference

from control). The effects of Ba^{2+} were reversible for all these stimulation sites (** indicates significant recovery from Ba^{2+}). C: Sample traces of GABA-induced hyperpolarizations in another cell. After 25 min of bath application of Ba^{2+} (1mM), the amplitude of $GABA_B$ responses were reduced to 60% of control (middle). The response at the end of the GABA response in Ba^{2+} is a rebound action potential which is truncated. GABA-induced hyperpolarizations (bottom) partially recovered after washout of Ba^{2+} . D: Summary histograms for all cells tested (n=7), illustrating that, in the same cells, monosynaptic late IPSPs were completely blocked by Ba^{2+} , while GABA-induced hyperpolarizations were only partially, but significantly, reduced during the same period of application (* indicates significantly different from control). Ba^{2+} effects on monosynaptic late IPSPs and $GABA_B$ responses were partially reversible (** indicates significantly different from Ba^{2+}).

Figure 5. Effects of Ba^{2+} on monosynaptic early and late IPSPs. A. Sample trace of early (filled circle) and late (filled triangle) monosynaptic IPSPs, evoked by stimulation of stratum lacunosum-moleculare, in the presence of non-NMDA and NMDA antagonists. B. Bath application of 1mM Ba^{2+} for 15 minutes suppressed the late but not the early component of monosynaptic IPSPs. Since Ba^{2+} did not block the early component of monosynaptic IPSPs, the disappearance of the late IPSP was not likely due to reduced GABA release.

Figure 6. Properties of 4-AP-induced late IPSPs. A: Representative example of 4-AP-induced late IPSPs (asterisks) recorded at resting membrane potential in the presence of 50 μ M BIC, 50 μ M PIC, 100 μ M AP-5, 40 μ M CNQX. B: Example of 4-AP-induced late IPSPs recorded at different membrane potentials (indicated at left) in the same cell. The top trace corresponds to the event marked 1 in A. IPSPs were reduced at hyperpolarized membrane potentials and became null near -86 mV for this cell. C: Graph of peak response amplitude *versus* membrane potential for traces shown in B. The linear regression gave an E_{rev} of -87 mV for this cell.

Figure 7. Effects of GABA_B receptor antagonist on 4-AP-induced late IPSPs. A: Traces showing two consecutive 4-AP-induced late IPSPs (left) in control. Asterisks indicate the onset of IPSPs. Bar shows the portion of the trace with an IPSP, which is enlarged in the right panel. B: In the same cell, after 7 min of bath application of 1 μ M CGP55845A, 4-AP-induced late IPSPs were still present but their amplitude was diminished. C: After 15 min of CGP55845A perfusion, the 4-AP-induced late IPSPs completely disappeared. D: Summary histogram of all cells tested (n=3), showing the gradual block by CGP55845A of 4-AP-induced late IPSPs. IPSP amplitude was significantly reduced after 7 min (asterisk) and completely blocked after 15 min.

Figure 8. Effects of intracellular GTP γ S on 4-AP-induced late IPSPs. A-D: Representative examples of 4-AP-induced late IPSPs recorded at 15, 30 and 60 min

after cell impalement with an electrode containing 25mM GTP γ S (A-B) or with 4M KAc only (C-D). 4-AP-induced late IPSPs diminished in amplitude during recording with GTP γ S-containing electrodes (A), but not during recordings with KAc-containing electrodes (C). Superimposed traces in B and D are enlarged portions of traces indicated by bars in A and C showing the gradual block of IPSPs by GTP γ S (B) but not in control recordings (D). E: Summary histogram for all cells tested, showing the significant decrease in amplitude of 4-AP-induced late IPSPs at 30 and 60 min after cell impalement relative to initial responses (at 15 min; n=5 cells). No significant change in IPSP amplitude was seen during control recordings of similar duration with KAc (n= 3 cells).

Figure 9. Differential effects of Ba²⁺ on 4-AP-induced late IPSPs and on GABA_B responses elicited by GABA. A: In control conditions (top), large 4-AP-induced late IPSPs were present (asterisks). Bath application of 1 mM Ba²⁺ gradually blocked these IPSPs (middle traces). After 15 min in Ba²⁺, 4-AP-induced late IPSPs were reduced in amplitude and after 25 min they were absent. 4-AP-induced late IPSPs reappeared after washout of Ba²⁺ (bottom trace). B: Summary histogram of all cells tested (n=9). Mean amplitude of 4-AP-induced late IPSPs was significantly reduced (asterisk) after 15 min in Ba²⁺, and completely blocked after 25 min. Mean IPSP amplitude partially recovered after Ba²⁺ wash. C: In another cell, focal application of GABA to stratum radiatum elicited GABA_B responses (control). Fifteen and 30 min after 1mM Ba²⁺ application, GABA_B responses were

only partially blocked and a residual response remained. C: Summary histograms of all cells ($n=3$) showing the partial block by Ba^{2+} of $GABA_B$ responses elicited by GABA and the full block of 4-AP-induced late IPSPs in the same cells (* indicates significant difference from control).

Figure 10. Effects of Ba^{2+} on monosynaptic late IPSCs evoked by stimulus trains.

A: Representative examples of monosynaptic late IPSCs evoked by repetitive electrical stimulation (20 pulses at 100 Hz at time indicate by bar; stimulation artefacts have been truncated) during whole-cell voltage-clamp recordings at a holding potential of -40 mV in ACSF containing CNQX, AP-5, BIC, and PIC (top trace, control). After the addition of 1 mM Ba^{2+} , train-evoked late IPSCs were reduced to 11% of control amplitude in this cell (middle trace). IPSCs recovered partially to 43% of control amplitude after wash-out of Ba^{2+} (bottom trace). B: Summary histogram for all cells tested ($n=6$), showing the near complete, and partially reversible, block by Ba^{2+} (filled bar) of monosynaptic late IPSCs evoked by stimulus trains (* indicates that mean amplitude is significantly different from control at $P<0.05$ two-tailed test, and ** indicates significantly different from Ba^{2+} at $P<0.05$ one-tailed test).

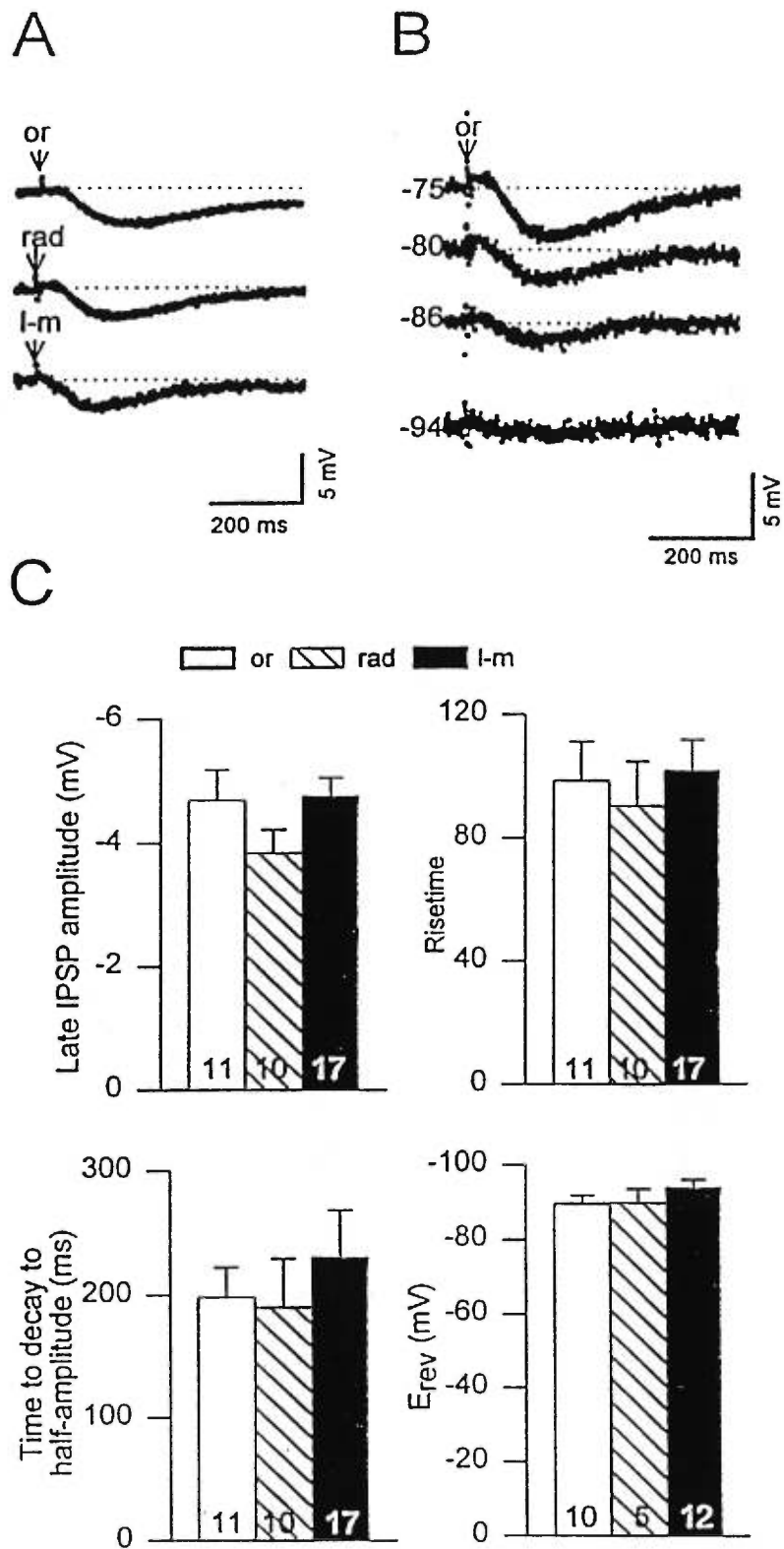
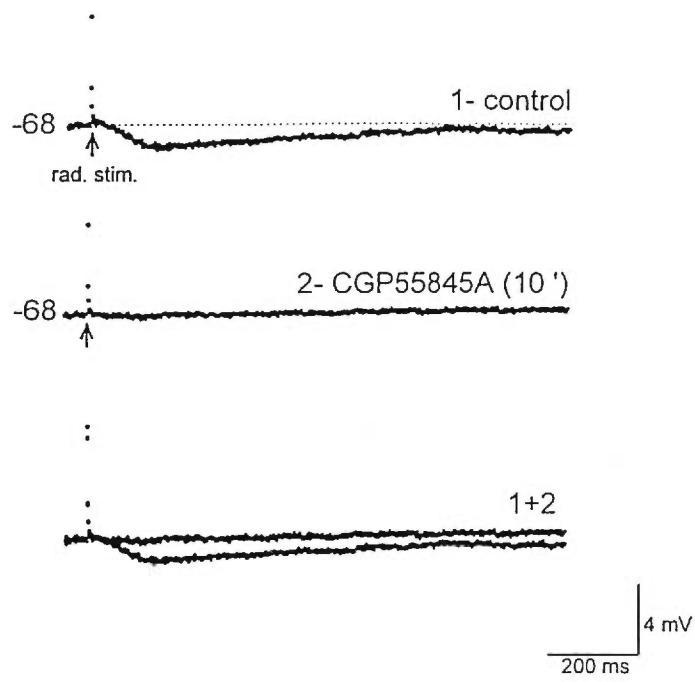


Figure 1

A

Monosynaptic late IPSPs



B

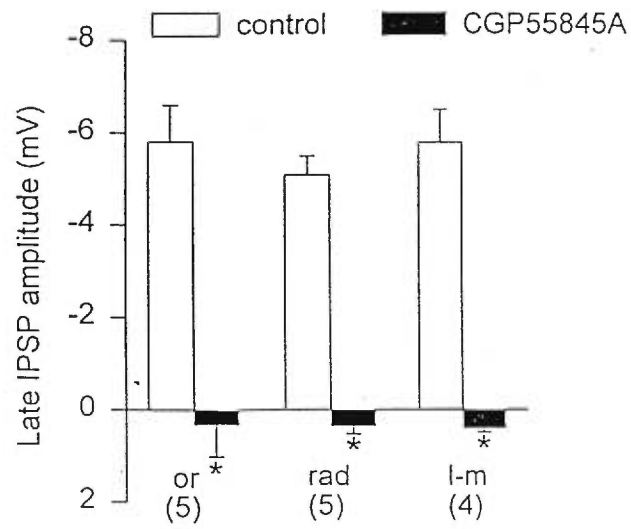


Figure 2

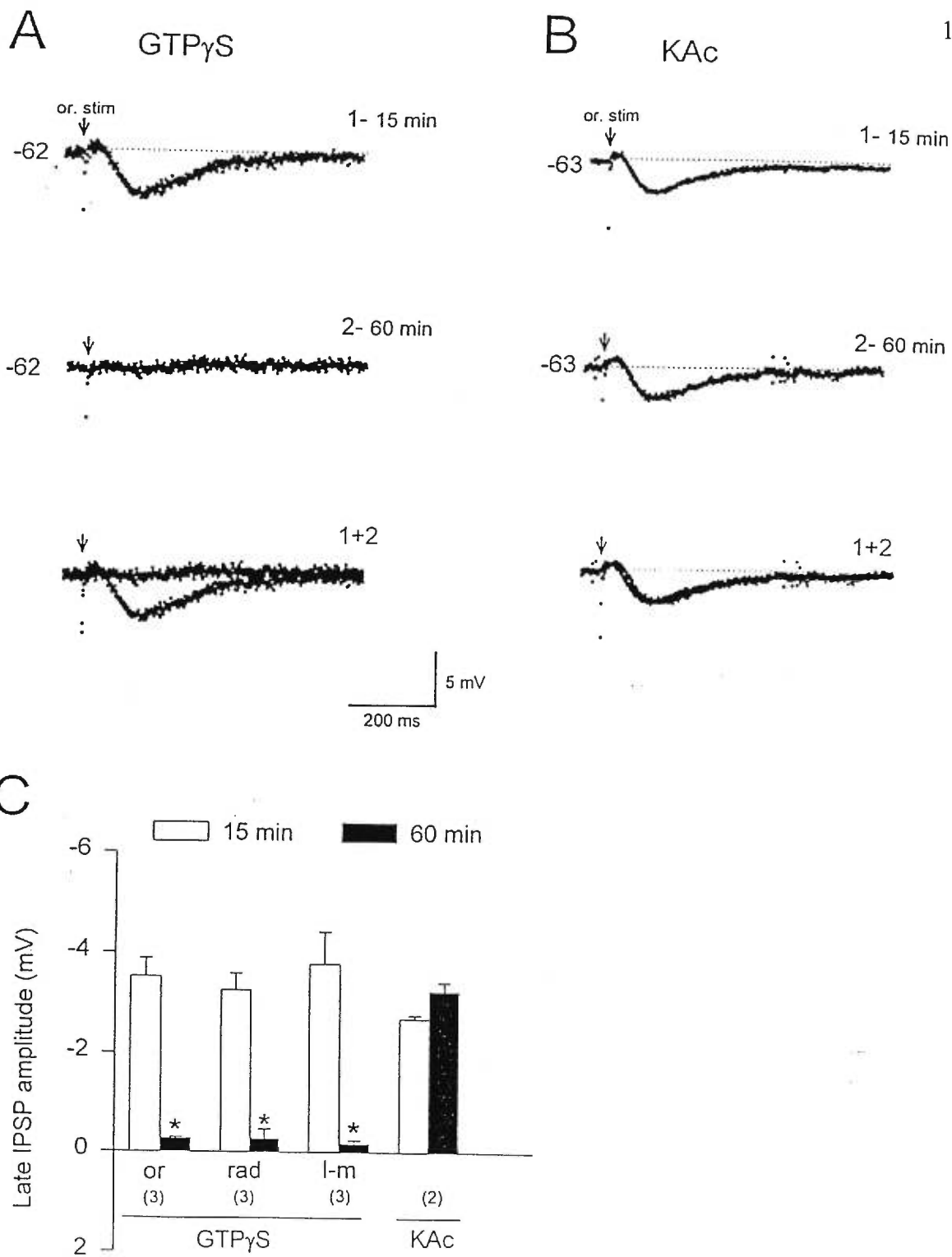


Figure 3

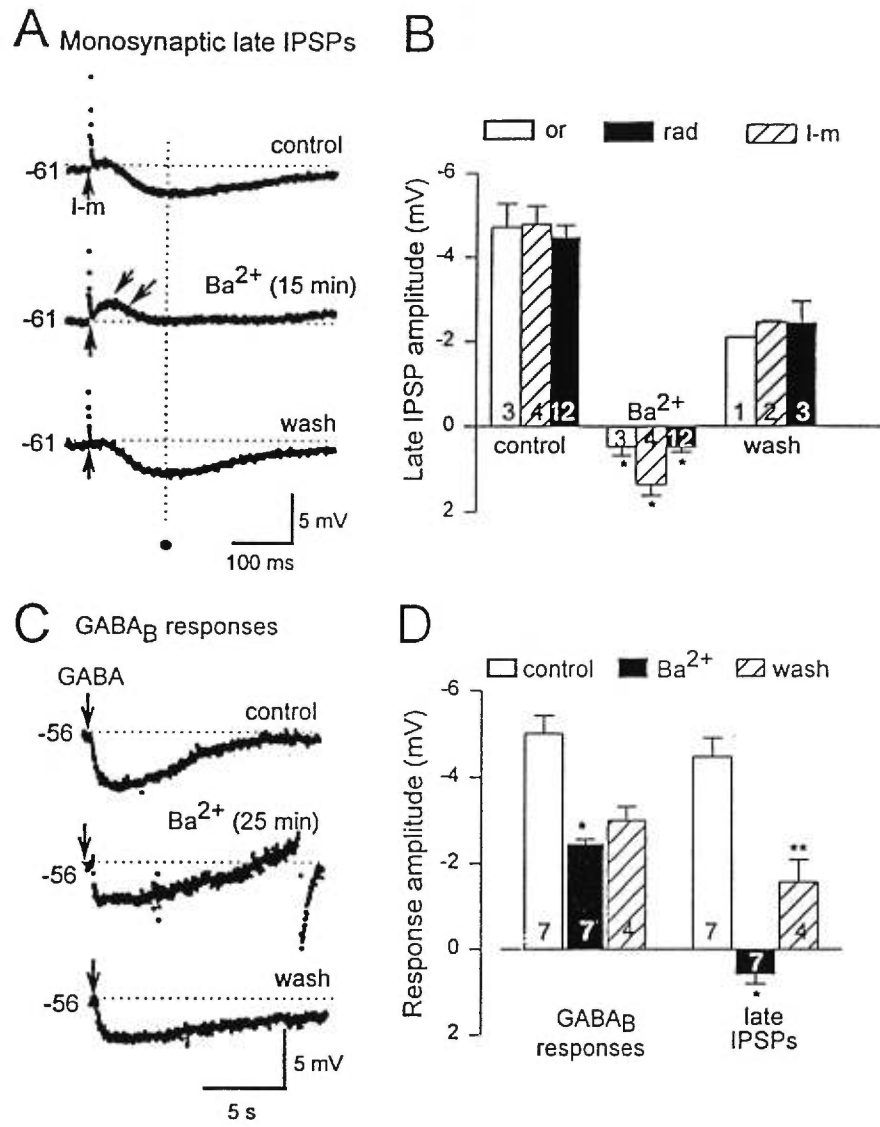


Figure 4

A Monosynaptic early and late IPSPs

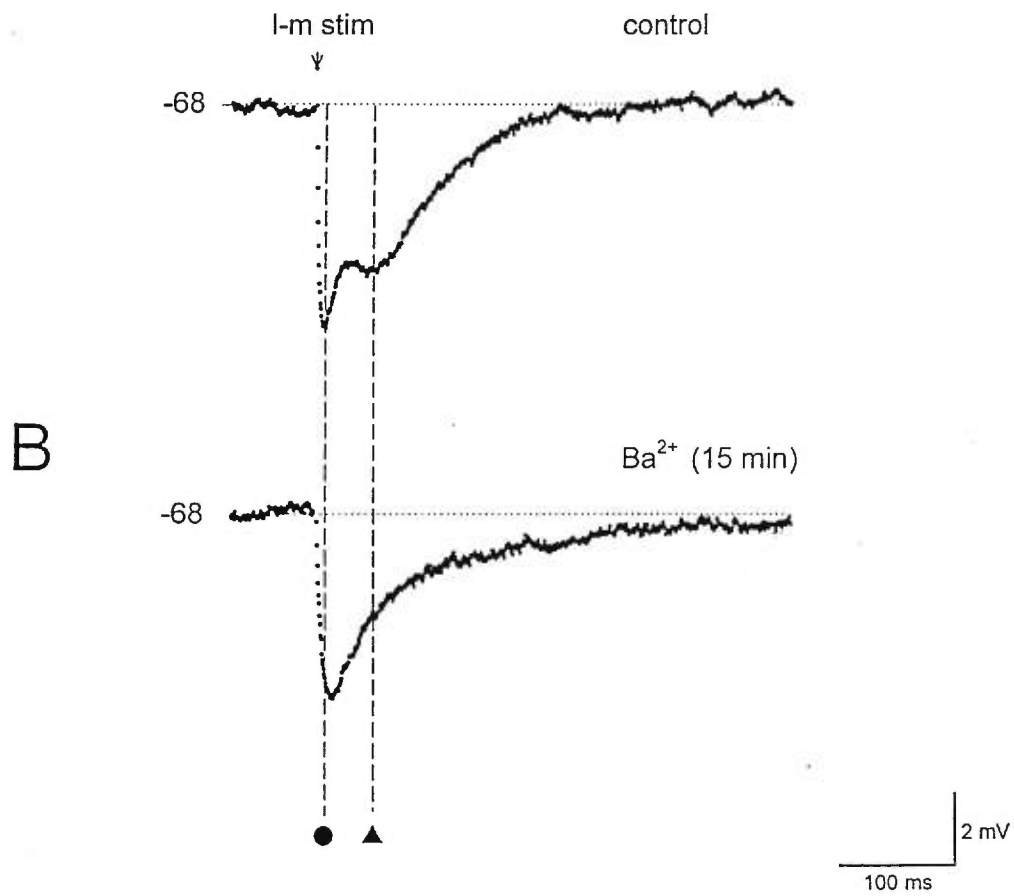


Figure 5

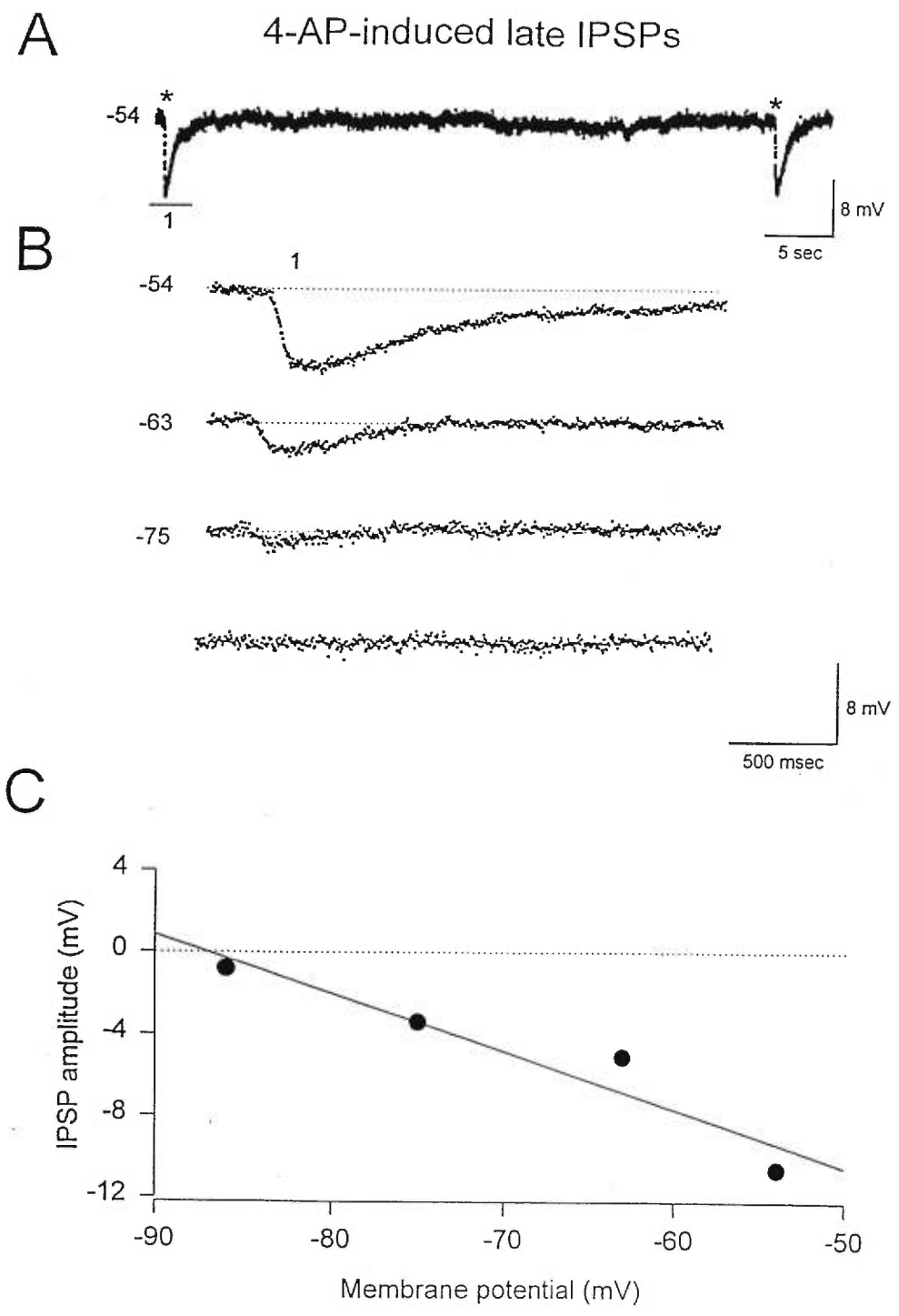


Figure 6

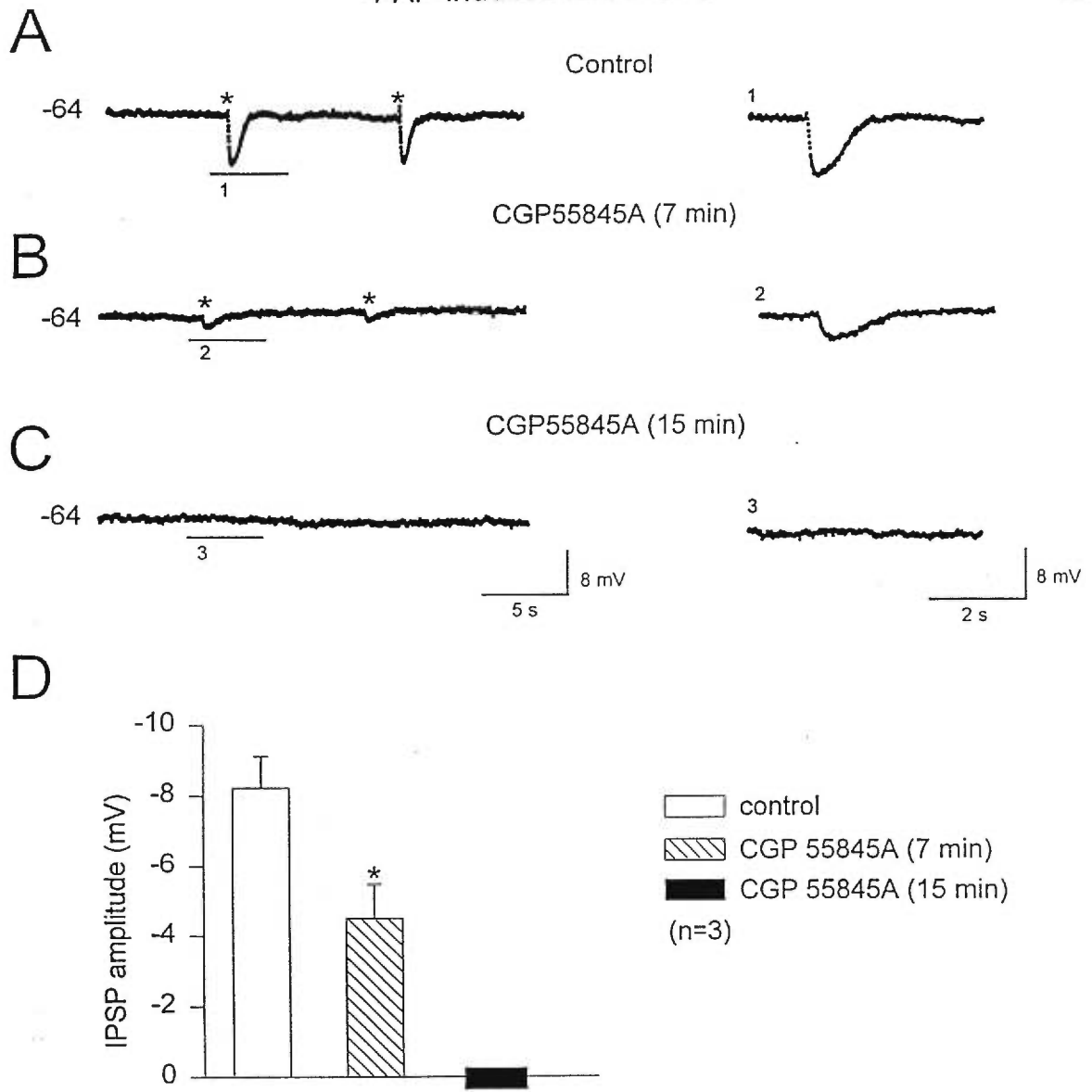


Figure 7

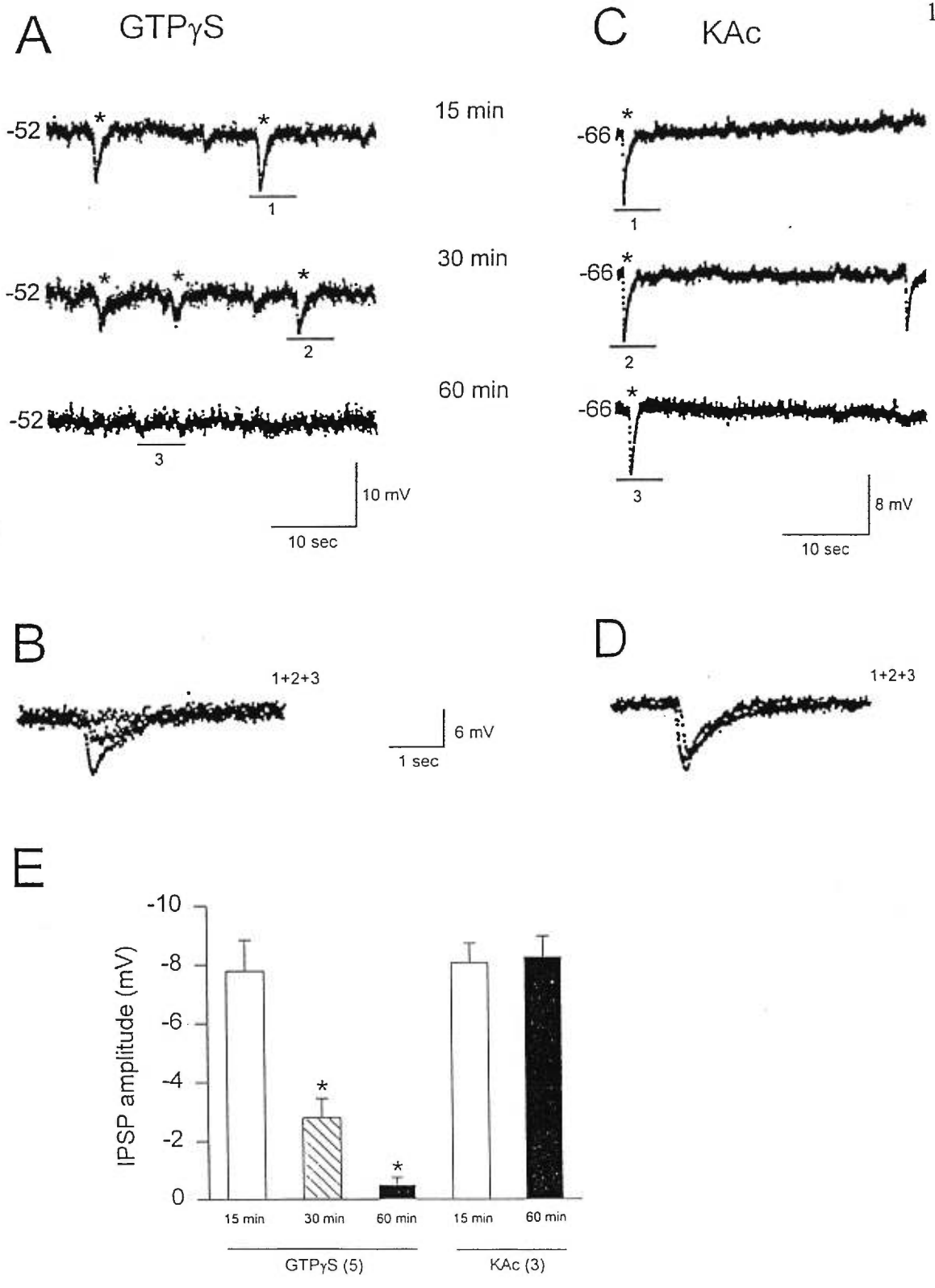


Figure 8

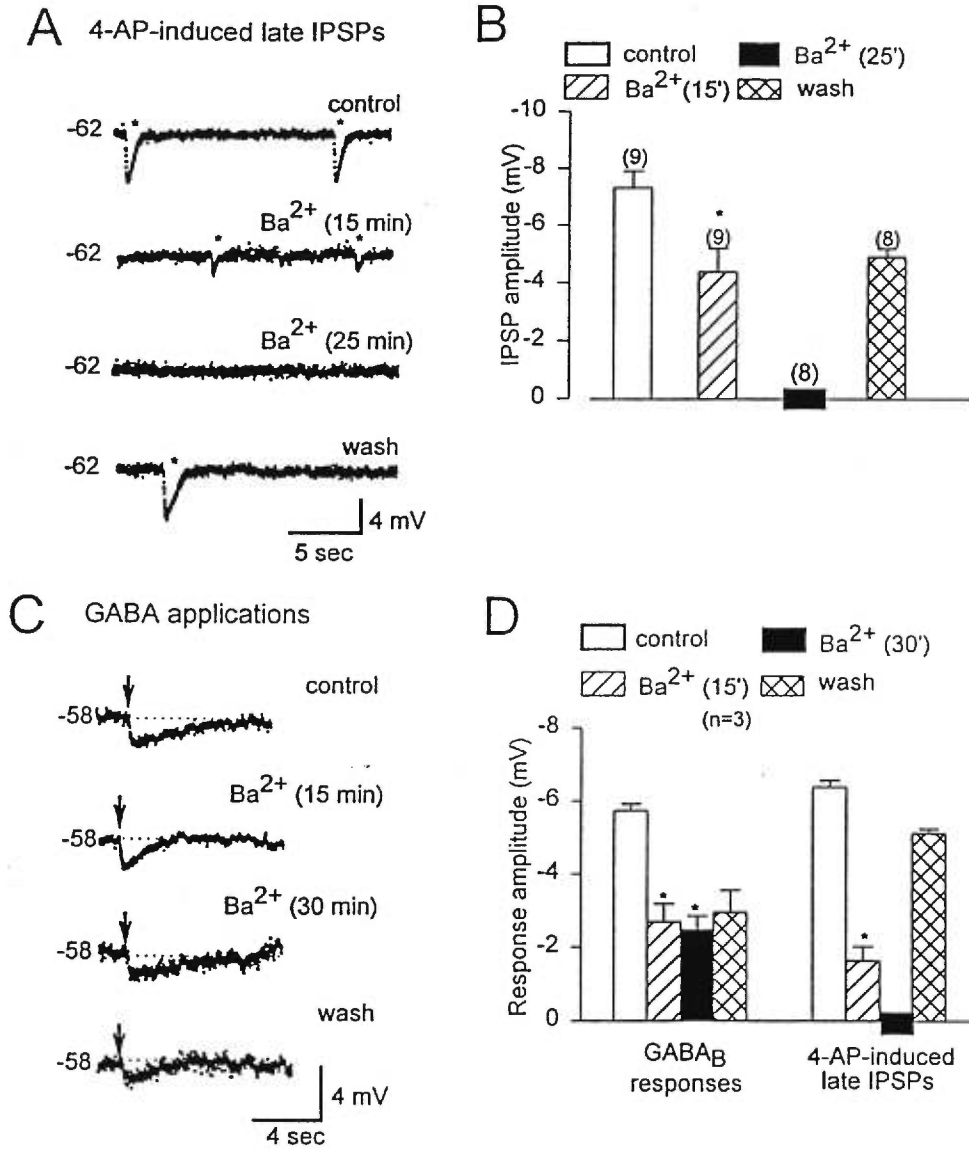


Figure 9

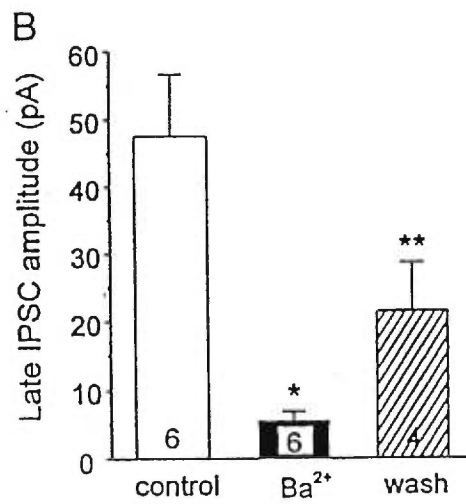
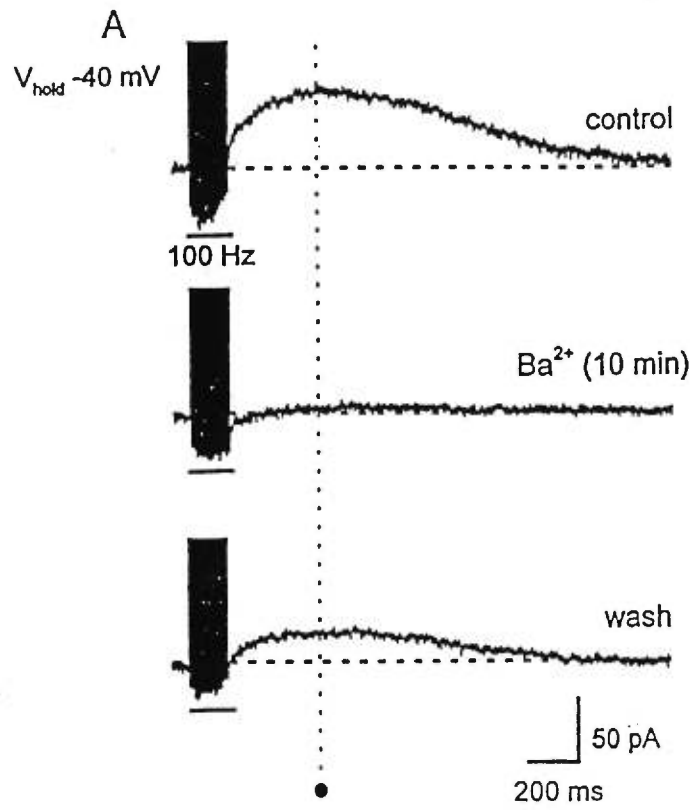


Figure 10

QUATRIÈME CHAPITRE

DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 Inhibition des cellules pyramidales médiée par les récepteurs GABA_B

Bien qu'il soit établi que les récepteurs GABA_B jouent un rôle important dans l'inhibition GABAergique des cellules pyramidales (Dutar et Nicoll, 1988a), les mécanismes d'action du GABA sur les récepteurs GABA_B ne sont pas encore complètement élucidés. Nos résultats obtenus lors d'enregistrements intracellulaires dans des tranches d'hippocampe, prélevés chez le rat, ont permis de comprendre plus en détail les mécanismes d'inhibition médiés par les récepteurs GABA_B dans les cellules pyramidales du CA1.

Dans un premier temps, nous avons examiné les réponses induites par l'application dendritique du GABA en présence d'antagonistes de récepteurs GABA_A. Nous avons comparé les conductances et récepteurs activés par le GABA exogène à ceux activés par une application similaire de baclofen. Nous avons trouvé que le GABA et le baclofen produisent similairement une hyperpolarisation membranaire résultant de l'activation de récepteurs GABA_B, de protéines G et de conductances K⁺. Cependant, l'action du baclofen diffère de celle du GABA. Alors que le baclofen a activé seulement des conductances K⁺ sensibles au Ba²⁺, le GABA a activé en plus des conductances K⁺ distinctes insensibles au Ba²⁺. De plus, le GABA a semblé activer des récepteurs GABA_B distincts de ceux activés par le baclofen. Finalement, le GABA a produit en plus une dépolarisation des cellules pyramidales.

Ayant démontré que le GABA exogène active deux conductances K⁺ distinctes dans les mêmes cellules pyramidales, nous avons vérifié l'action du

GABA endogène sur les récepteurs GABA_B. Les résultats ont montré que le GABA libéré, par stimulation électrique des fibres inhibitrices ou sous l'effet de la 4-aminopyridine (4-AP), a hyperpolarisé les cellules pyramidales par l'activation de récepteurs GABA_B, de protéines G et de conductances K⁺. Cependant, la libération de GABA endogène n'a activé que des conductances K⁺ sensibles au Ba²⁺. Par contre, le GABA exogène a toujours activé les deux types de conductances K⁺ dans la même cellule.

L'action différentielle du GABA endogène et exogène via les récepteurs GABA_B suggère l'existence des récepteurs GABA_B distincts localisés intra- et extra-synaptiquement qui sont couplés à différentes conductances K⁺.

4.1.1 Conductances K⁺ activées par le GABA et le baclofen

Nous avons trouvé que le baclofen et le GABA (en présence d'antagonistes GABA_A) hyperpolarisent similairement les cellules pyramidales via l'activation de récepteurs GABA_B, de protéines G et de conductances K⁺. Ces résultats corroborent les données antérieures (Newberry et Nicoll, 1985; Gähwiler et Brown, 1985; Inoue et al., 1985b). Cependant, les réponses au baclofen se distinguent par leur plus longue durée comparativement à celle induite par le GABA (Newberry et Nicoll, 1985; Misgeld, Bijak et Jarolimek, 1995; Janigro et Schwartzkroin, 1988). Le temps de décroissance plus lent de la réponse au baclofen a été attribué au mécanisme de recapture qui lie à haute affinité le GABA et non le baclofen (Solis et Nicoll, 1992a; Janigro et Schwartzkroin, 1988).

Les réponses générées par le GABA et le baclofen dans nos travaux ont affiché une relation amplitude-voltage linéaire pour des potentiels membranaires entre -60 à -100mV, suggérant que les conductances K^+ activées par ces agonistes ne démontrent pas de rectification à ces potentiels.

4.1.2 Effets différentiels du Ba^{2+} sur les réponses au GABA et au baclofen

Le blocage total des réponses au baclofen par le Ba^{2+} est compatible avec les résultats de plusieurs auteurs (Gähwiler et Brown, 1985; Thompson et Gähwiler, 1992). Par contre, le blocage partiel des réponses au GABA par le Ba^{2+} est nouveau. Le blocage partiel de la réponse au GABA n'a pas été dû à une dilution locale du Ba^{2+} (le milieu véhicule pour le GABA ne contenant pas de Ba^{2+}) puisque les hyperpolarisations induites par une application similaire de baclofen a été complètement bloquée. Ces résultats indiquent que l'application du GABA active deux types de conductances distinctes: 1- des conductances K^+ sensibles au Ba^{2+} (activées également par le baclofen), et 2- d'autres conductances résistantes au Ba^{2+} .

Nos résultats concordent partiellement avec ceux de Newberry et Nicoll (1985). Ces chercheurs ont rapporté que le Ba^{2+} (300 μ M à 3mM) réduisait mais ne bloquait pas totalement les hyperpolarisations produites par le baclofen ou le GABA, en présence de la bicuculline, dans les cellules pyramidales de tranches d'hippocampe. L'antagonisme incomplet de la réponse au baclofen par le Ba^{2+} pourrait s'expliquer par une plus courte période de perfusion de Ba^{2+} (15min) (Newberry et Nicoll, 1985). Par ailleurs, Gähwiler et Brown (1985) ont rapporté

que le Ba^{2+} (1mM) bloquait les courants I_{bac} et I_{GABA} (en présence d'antagoniste de récepteurs $GABA_A$) dans les cellules pyramidales du CA3, en culture. Ces résultats suggèrent que les conductances K^+ liées aux récepteurs $GABA_B$ qui sont insensibles au Ba^{2+} pourraient avoir un développement plus tardif et ne pas être exprimées par les cellules en culture.

4.1.3 Mécanismes ioniques de réponse non- $GABA_A$ induite par le GABA

Pour identifier les conductances impliquées dans les réponses $GABA_B$ induites par le GABA, nous avons enregistré ces réponses avec des électrodes contenant soit du Cl^- pour inverser le gradient Cl^- , du Cs^+ pour bloquer les conductances K^+ intracellulairement, du Li^+ pour bloquer l'activation des protéines G ou du $GTP\gamma S$ pour activer irréversiblement les protéines G.

Malgré l'inversion de gradient Cl^- , le GABA exogène a induit des réponses hyperpolarisantes ayant des caractéristiques électrophysiologiques semblables aux réponses contrôles. Ces résultats confirment donc que les récepteurs $GABA_A$ étaient efficacement bloqués et que les conductances Cl^- ne contribuent pas à l'hyperpolarisation. Par contre, les hyperpolarisations induites par le GABA ont été bloquées par le Cs^+ intracellulaire et remplacées par des dépolarisations. Ces résultats indiquent que les hyperpolarisations $GABA_B$, sensibles et insensibles au Ba^{2+} , sont médiées par des conductances K^+ sensibles au Cs^+ . Les hyperpolarisations $GABA_B$ induites par le GABA ont été bloquées par le Li^+ et remplacées aussi par des dépolarisations. Ces données suggèrent que l'activation

des conductances K^+ s'effectue par l'intermédiaire de protéines G. Le couplage des conductances K^+ aux protéines G a été confirmé, par la diminution des hyperpolarisations $GABA_B$ induites par le GABA, lors d'enregistrement avec électrodes contenant du $GTP\gamma S$. Puisque l'addition du Ba^{2+} supprimait complètement les hyperpolarisations résiduelles enregistrées en présence du $GTP\gamma S$, les conductances K^+ (sensibles et insensibles au Ba^{2+}) responsables de l'hyperpolarisation $GABA_B$ résultent de l'activation de protéines G (Andrade et al., 1986; Thalmann, 1988).

4.1.3.1 Réponse dépolarisante $GABA_B$ induite par le GABA

Les données obtenues en présence de Cs^+ , bloqueur de conductances K^+ , et de Li^+ , bloqueur de l'activation de protéines G, ont mis en évidence une composante dépolarisante de la réponse $GABA_B$ induite par le GABA. Cette réponse dépolarisante ne dépend pas de l'activation des protéines G puisqu'elle a été démasquée par le Li^+ ainsi que par le Ba^{2+} lors d'enregistrement avec des électrodes contenant du $GTP\gamma S$. Les réponses au GABA résistantes au Ba^{2+} résultent donc de l'activation conjointe de conductances K^+ et de conductances dépolarisantes. Ces réponses mixtes pourraient expliquer le potentiel d'équilibre plus positif de la réponse $GABA_B$, en présence de Ba^{2+} , comparativement à E_K . La conductance ionique responsable de la réponse dépolarisante demeure indéterminée puisque l'amplitude des réponses dépolarisantes a varié de façon irrégulière avec le potentiel membranaire de nos études.

4.1.4 Le GABA et le baclofen n'activent pas les mêmes récepteurs GABA_B

Nous avons vérifié que les réponses induites par le GABA et le baclofen impliquent des récepteurs GABA_B en utilisant deux antagonistes sélectifs aux récepteurs GABA_B, le CGP35348, un antagoniste de faible affinité (Olpe et al., 1990), et le CGP55845A (Davies et al., 1993), un antagoniste de haute affinité. Nos résultats ont montré que le CGP35348 bloque complètement et réversiblement les réponses au baclofen alors qu'il affecte peu les réponses au GABA. Cet antagonisme différentiel par le CGP35348 suggère l'implication de différents types de récepteurs GABA_B dans les réponses au baclofen et au GABA. Ainsi, le baclofen et le GABA pourraient activer des récepteurs GABA_B distincts couplés à différentes conductances K⁺.

Nos résultats concordent en partie avec ceux de Solis et Nicoll (1992) qui ont montré que le CGP35348 antagonise totalement les réponses au baclofen, mais réduit de 80% les réponses GABA_B induites par le GABA. Même en présence d'un bloqueur de la recapture de GABA, la concentration minimale de CGP35348 nécessaire pour antagoniser les réponses au baclofen a été plus faible (3-10 fois) que celle requise pour diminuer les réponses au GABA (Solis et Nicoll, 1992), suggérant que le baclofen et le GABA agissent sur différents récepteurs GABA_B.

Les réponses induites par le GABA en présence d'antagonistes GABA_A sont médiées par les récepteurs GABA_B puisque le CGP55845A les a bloquées complètement . Ces résultats suggèrent que les trois composantes des réponses GABA_B induites par le GABA, à savoir, les deux composantes hyperpolarisantes

(sensibles et insensibles au Ba^{2+}) et la composante dépolarisante, sont donc médiées par des récepteurs $GABA_B$. Nos données sont en accord avec celles de Jarolimek et al., (1993) et de Davies et al., (1993), qui ont montré que le CGP55845A supprime les hyperpolarisations $GABA_B$ générées par le baclofen et le GABA dans les cellules pyramidales de l'hippocampe.

4.1.5 Hétérogénéité des récepteurs $GABA_B$ postsynaptiques

Une hétérogénéité des récepteurs $GABA_B$ a été mise en évidence lors d'études sur l'inhibition de la libération de neurotransmetteur dans le SNC (Bonnano et Raiteri, 1993). Une classification avec deux sous-types majeurs de récepteurs $GABA_B$ a été proposée: les récepteurs $GABA_{B1}$ sensibles au baclofen et $GABA_{B2}$ qui sont insensibles au baclofen (Bonnano et Raiteri, 1993).

Nos données électrophysiologiques et pharmacologiques semblent être compatibles avec cette classification. Les réponses au baclofen, impliquant des conductances K^+ sensibles au Ba^{2+} et complètement bloquées par le CGP35348 et le CGP55845A, seraient donc médiées par les récepteurs $GABA_{B1}$. La composante de des réponses $GABA_B$ induite par le GABA qui est sensible au Ba^{2+} serait aussi médiée par les récepteurs $GABA_{B1}$. Cette classification est compatible avec le blocage partiel des réponses $GABA_B$ du GABA par le CGP35348. Par ailleurs, les réponses $GABA_B$ induites par le GABA, impliquant les conductances résistantes au Ba^{2+} seraient médiées par les récepteurs $GABA_{B2}$. Puisque ces récepteurs ne peuvent être activés par le baclofen, cet agoniste n'active pas les conductances K^+

insensibles au Ba^{2+} . En accord avec cette classification, les réponses insensibles au Ba^{2+} médiées par les récepteurs $GABA_{B2}$ sont peu sensibles au CGP35348, mais bloquées par le CGP55845A.

4.2 Mécanismes $GABA_B$ activés par le GABA endogène

Nos résultats ont clairement indiqué que même si le GABA exogène activait deux types de conductances K^+ , le GABA endogène, libéré au niveau des synapses n'activait qu'un seul type de conductance K^+ via des récepteurs $GABA_B$.

4.2.1 Propriétés des PPSIs lents évoqués par stimulation électrique simple

Pour déterminer si des populations différentes de fibres inhibitrices activent différents récepteurs $GABA_B$ et conductances K^+ , nous avons examiné les PPSIs monosynaptiques tardifs induits par stimulation des fibres inhibitrices/interneurones localisées dans trois différentes couches dendritiques: oriens, radiatum et lacunosum-moleculare. Nous avons trouvé que ces PPSIs avaient des propriétés uniformes et qu'ils étaient complètement bloqués par le Ba^{2+} , malgré l'existence de conductances K^+ insensibles au Ba^{2+} activés par le GABA exogène dans la même cellule. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes qui ont montré que les PPSIs tardifs étaient bloqués (Deisz et al., 1997; Knowles et al., 1984) ou réduits (Alger, 1984; Williams et Lacaille, 1992) par le Ba^{2+} .

Le blocage des PPSIs par le Ba^{2+} n'a pas été dû à une réduction de libération de GABA, puisque le Ba^{2+} a supprimé la composante tardive et non la composante

précoce des PPSIs monosynaptiques biphasiques (Williams et Lacaille, 1992).

4.2.2 Propriétés des PPSIs lents induits par le 4-AP

Nos résultats ont aussi démontré que l'activation de récepteurs GABA_B couplés aux conductances K⁺ insensibles au Ba²⁺ ne dépendait pas d'une libération plus abondante de GABA au niveau des terminaisons présynaptiques puisque les PPSIs géants induits par la 4-AP et résultant d'une libération accrue de GABA (Buckle et Haas, 1982; Perreault et Avoli, 1989; Michelson et Wong, 1994; Segal, 1987) ont été complètement et réversiblement supprimés par le Ba²⁺. Puisque les hyperpolarisations générées par le GABA, dans les mêmes cellules, avaient une composante insensible au Ba²⁺, nos résultats suggèrent que la quantité de GABA libérée par l'activation synchrone d'interneurones est encore insuffisante pour activer les récepteurs GABA_B couplés aux conductances K⁺ insensibles au Ba²⁺.

4.2.3 Propriétés des PPSIs lents évoqués par stimulation électrique répétée

Nos résultats ont aussi démontré que même une libération plus abondante de GABA comme celle induite par une stimulation répétitive à haute fréquence selon un protocole qui produit une diffusion du GABA vers les sites extrasynaptiques (i.e. les récepteurs GABA_B des terminaisons glutamatergiques, Isaacson et al., 1993) a produit des CPSIs presque complètement bloqués de façon réversible par le Ba²⁺. Ainsi, même cette libération accrue de GABA apparaît insuffisante pour activer les récepteurs GABA_B couplés aux conductances K⁺

insensibles au Ba^{2+} .

4.2.4 Récepteurs $GABA_B$ synaptiques et extrasynaptiques

L'activation de conductances K^+ sensibles et insensibles au Ba^{2+} par le GABA exogène mais non par le GABA endogène suggère l'existence des récepteurs $GABA_B$ à des sites intra- et extra-synaptiques. Ainsi, le GABA libéré synaptiquement par trois protocoles utilisés (stimulation simple, répétitive et induit par la 4-AP) n'aurait activé que des conductances K^+ sensibles au Ba^{2+} via des récepteurs $GABA_B$ localisés à des sites intra-synaptiques. Par contre, le GABA exogène aurait activé, en plus, des conductances K^+ insensibles au Ba^{2+} via des récepteurs $GABA_B$ à des sites extrasynaptiques. Il est aussi probable que les récepteurs $GABA_B$ à des sites extrasynaptiques soient aussi couplés à des conductances K^+ sensibles au Ba^{2+} .

L'hypothèse de l'activation de conductances K^+ distinctes couplées à des récepteurs intra- et extra-synaptiques est compatible avec les résultats d'autres chercheurs qui ont rapporté que la conductance élémentaire des canaux K^+ couplés aux récepteurs $GABA_B$ et activés par le GABA endogène (activation synaptique) est 7 fois plus petite que celle des canaux couplés aux récepteurs activés par le GABA exogène (DeKoninck et Mody, 1997; Premkumar et Gage, 1994).

De plus, l'existence des récepteurs $GABA_B$ extrasynaptiques a été proposée par Jarolimek et al., (1994) dans les cellules pyramidales du CA3, pour expliquer que les courants K^+ induits par la 4-AP et sous-jacents aux CPSIs tardifs, étaient

bloqués par le Cs^+ intracellulaire. Par contre, seulement les courants entrants K^+ activés par le baclofen sont insensibles au Cs^+ intracellulaire tandis que les courants K^+ activés par le baclofen étaient insensibles au Cs^+ . Dans ce cas, les conductances K^+ activées par le baclofen seraient couplées à des récepteurs GABA_B extrasynaptiques alors que celles activées par le GABA endogène seraient couplées à des récepteurs GABA_B synaptiques.

Par contre, nos résultats apparaissent contradictoires aux observations précédentes de Williams et Lacaille (1992) suggérant que des récepteurs GABA_B synaptiques seraient couplés à des conductances K^+ insensibles au Ba^{2+} dans la génération de glut-PPSIs, activés par la stimulation d'interneurones par le glutamate. Dans ces expériences, des PPSIs GABA_B (insensibles à la bicuculline et bloqués par le 2-OH-saclofen) induits par la stimulation au glutamate, n'étaient pas affectés par l'application locale de Ba^{2+} , tandis que les PPSIs tardifs, produits dans les mêmes cellules, étaient réduits (Williams et Lacaille, 1992). Cette apparente contradiction pourrait être due à plusieurs facteurs. Premièrement, l'effet différent du Ba^{2+} sur les PPSIs monosynaptiques tardifs et les glut-PPSIs pourrait être dû à la méthode d'application du Ba^{2+} . L'inclusion de Ba^{2+} dans le milieu de perfusion dans les études présentes a assuré une application homogène et complète au niveau de la tranche d'hippocampe, alors que l'application locale dans l'étude de Williams et Lacaille (1992) aurait pu mener à un bloc incomplet dans certaines régions de la tranche. Les effets du Ba^{2+} auraient pu aussi être causés par des protocoles de stimulation différents dans les deux études. La stimulation d'interneurones par le

glutamate pourrait activer les interneurons de façon soutenue (Samulack et al., 1993) et induire une libération plus abondante de GABA que par la stimulation électrique ou par la 4-AP. Ainsi, les glut-PPSIs pourraient provenir en partie d'un débordement de GABA libéré synaptiquement vers des récepteurs GABA_B à des sites extrasynaptiques qui seraient couplés à des conductances K⁺ insensibles au Ba²⁺.

4.3 Implications physiologiques

L'inhibition des cellules pyramidales varie en fonction du niveau d'activité des interneurons inhibiteurs. Lorsque les interneurons sont inactifs, il existe une inhibition synaptique tonique des cellules pyramidales qui se manifeste par des CPSIs miniatures non-dépendants des potentiels d'action (Collingridge et al., 1994). A un niveau d'activité plus élevé, les interneurons génèrent des événements synaptiques unitaires spontanés et phasiques. Ces deux formes d'inhibition tonique et phasique n'impliquent que l'activation de récepteurs GABA_A. A un niveau d'activation plus global, une stimulation électrique de faible intensité active plusieurs interneurons et génèrent des PPSIs, médiés par des récepteurs GABA_A, dans les cellules pyramidales. Cette forme d'inhibition est rapide. A un niveau plus élevé, une stimulation électrique de plus forte intensité recrute plusieurs fibres/interneurons GABAergiques et produit une inhibition des cellules pyramidales via des récepteurs GABA_A et GABA_B. Cette forme d'inhibition pourrait nécessiter une libération plus abondante de GABA (Newberry et Nicoll,

1984b) et être de plus longue durée (Connors et al., 1988; Misgeld et al., 1989) et plus efficace puisqu'elle combine les deux mécanismes d'inhibition différents GABA_A et GABA_B. Finalement, une stimulation électrique à haute fréquence peut induire une libération plus grande de GABA et un débordement à des récepteurs extrasynaptiques (Isaacson et al., 1993). Dans ce cas, la libération de GABA activerait non seulement les récepteurs GABA_A et GABA_B synaptiques mais aussi des récepteurs GABA_B extrasynaptiques. Les systèmes inhibiteurs de l'hippocampe apparaissent donc très versatiles et le niveau d'activité dans ces réseaux inhibiteurs peut réguler différents types d'inhibition dans les cellules pyramidales. Dans ce contexte, l'activation combinée de différents récepteurs GABA_A et GABA_B synaptiques et extrasynaptiques pourrait activer de façon maximale les divers mécanismes inhibiteurs dans les cellules pyramidales et jouer un rôle critique lors des décharges neuronales intenses tel que durant l'activité épileptique.

Il est intéressant de noter que le débordement de GABA d'origine synaptique peut causer une dépression hétérosynaptique de la transmission au glutamate (Isaacson et al., 1993). Ces chercheurs ont démontré qu'une libération de GABA par stimulation à haute fréquence des fibres GABAergiques causent une activation d'hétérorécepteurs GABA_B sur les terminaisons glutamatergiques dans l'hippocampe. Une dépression hétérosynaptique analogue a été observée dans les cellules Purkinje du cervelet (Dittman et Regher, 1997).

L'activation de récepteurs extra-synaptiques par le GABA pourrait aussi être analogue au débordement du glutamate d'origine synaptique démontré par

Batchelor et al., (1994) suite à une stimulation répétée des fibres parallèles dans le cervelet. Dans ce système, une réponse dépolarisante postsynaptique est générée suite à l'activation des récepteurs mGluR qui sont localisés à des sites extrasynaptiques dans les cellules Purkinje (Baude et al., 1993).

4.4 Perspectives d'avenir

Suite à nos travaux, il serait intéressant de poursuivre la caractérisation des divers mécanismes liés aux récepteurs GABA_B. Premièrement, il serait important d'identifier le mécanisme ionique sous-jacent à la réponse dépolarisante induite par le GABA. De plus, la nature de l'ion impliqué dans cette dépolarisation pourrait être identifié en manipulant la composition ionique du milieu extracellulaire ou en utilisant des bloqueurs de canaux. L'enregistrement patch-clamp en mode whole-cell et en voltage imposé serait avantageux dans l'étude des courants $I_{\text{GABA(B)}}$. Il importe de mesurer les changements de conductances pour vérifier si cette dépolarisation est associée avec une ouverture ou une fermeture de canaux ioniques. Selon les changements de conductance observées, on pourrait varier la concentration des ions Ca^{2+} , Na^+ , K^+ ou Cl^- . Il serait aussi intéressant, dépendant du succès de l'identification de la conductance impliquée dans la réponse dépolarisante, de caractériser en détail les réponses liées aux récepteurs GABA_{B2} postsynaptiques. Ainsi, on devrait éliminer la composante dépolarisante générée par le GABA, et ensuite, isoler la réponse GABA résistante au Ba^{2+} en appliquant le GABA en présence du Ba^{2+} et des antagonistes GABA_A. On pourrait caractériser les

propriétés du courant $I_{\text{GABA(B2)}}$ (potentiel d'équilibre etc..) et son profil pharmacologique (sensibilité aux antagonistes phaclofen et au CGP35348). Selon la classification de Bonnano et Raiteri (1993), la réponse GABA_{B2} devrait être sensible au CGP35348 et insensible au phaclofen.

Il serait important de vérifier si les conductances K^+ insensibles au Ba^{2+} démontrent de la rectification entrante (Ogata et al., 1987) et sont sensibles à la 4-aminopyridine (Ogata et al., 1987) ou au Cs^+ extracellulaire (Jarolimek et al., , 1994).

Il est connu que les canaux K^+ couplés aux récepteurs GABA_{B} sont aussi activés par d'autres récepteurs (e.g. sérotonine) via les protéines G (Andrade et al., 1986). Il serait intéressant d'examiner si les réponses GABA_{B} sensibles et insensibles au Ba^{2+} sont modulées postsynaptiquement et de façon différentielle par la sérotonine (Oleskevich et Lacaille, 1992), l'agoniste muscarinique carbachol (Müller et Misgeld, 1989) ou la noradrénaline (Bijak et al., 1991).

Finalement, il serait important de vérifier si les interneurones GABA_{B} ergiques de l'hippocampe possèdent aussi des récepteurs GABA_{B} distincts couplés à différentes conductances K^+ sensibles ou insensibles au Ba^{2+} .

La composante dépolarisante du PPSI monosynaptique tardif, insensible au Ba^{2+} , apparaît similaire à la composante dépolarisante des réponses GABA_{B} induites par le GABA. Il est concevable que ces deux réponses dépolarisantes, de cinétique rapide, proviennent de l'activation des conductances similaires couplées aux récepteurs GABA_{B} . Suite à la caractérisation de la réponse dépolarisante

induite par le GABA, il serait intéressant d'utiliser des protocoles similaires pour vérifier que ces réponses ont des mécanismes similaires

Il serait aussi possible que la composante dépolarisante soit médiée par un courant synaptique NMDA incomplètement bloqué par l'AP-5. Dans ce cas, l'amplitude de cette réponse dépolarisante devrait augmenter avec les dépolarisations et diminuer avec les hyperpolarisations membranaires.

Notre hypothèse de l'existence des récepteurs GABA_B extrasynaptiques est basée sur l'incapacité du GABA d'origine synaptique d'activer les conductances K⁺ insensibles au Ba²⁺, alors que l'application de GABA exogène active ces conductances. Puisque dans d'autres systèmes, une stimulation répétitive à plus basse fréquence (4 pulses à 15 Hz) induit un débordement extrasynaptique de dopamine dans les cellules du striatum (Gonon, 1997) et du noyau accumbens (Garris et al., 1994), il serait intéressant d'essayer de provoquer une libération accrue de GABA d'origine synaptique par d'autres protocoles de stimulation et de vérifier la sensibilité de ces réponses au Ba²⁺. On pourrait donc appliquer une stimulation électrique répétée à haute fréquence (100Hz) mais en présence d'un inhibiteur de la recapture du GABA, le SKF89976A (Solis et Nicoll, 1992) ou la tiagabine (Thompson et Gähwiler, 1992b). Alternativement, on pourrait augmenter la fréquence et/ou le nombre de pulses de stimulation. Finalement, il serait souhaitable de répéter les expériences de PPSIs induits par la stimulation d'interneurones par le glutamate, en incluant le Ba²⁺ dans le milieu de superfusion et en se servant du baclofen comme contrôle. Ainsi, une suppression des réponses

au baclofen et une réduction partielle des glut-PPSIs par le Ba^{2+} constituerait une évidence convaincante de l'activation des récepteurs $GABA_B$ couplés à des conductances K^+ insensibles au Ba^{2+} par le GABA d'origine synaptique.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- Alger, B.E. Characteristics of a slow hyperpolarizing synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Neurophysiol.* 52: 892-910, 1984.
- Alger, B.E., Nicoll, R.A. Spontaneous inhibitory postsynaptic potentials in hippocampus: mechanism for tonic inhibition. *Brain Res.* 200: 195-200, 1980a.
- Alger, B.E., Nicoll, R.A. Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J. Physiol. (London)* 328: 105-123, 1982a.
- Alger, B.E., Nicoll, R.A. Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptor on rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J. Physiol. (London)*. 328: 125-141, 1982b.
- Andersen, P. Organization of hippocampal neurons and their interconnections. In *The Hippocampus*, R.L. Isaacson, K.H. Pribram (eds);, Vol.1. New York: Plenum Press, pp. 155-175, 1975.
- Andersen, P. Some properties of synapses near to and far from the soma of hippocampal pyramids. *Exp. Brain Res.* 1(Suppl.):202-206, 1976.
- Andersen, P., Blackstad, T.W., Lomo, T. Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp. Brain Res.* 1: 236-248, 1966a.
- Andersen, P., Dingledine, R., Gjerstad, L., Langmoen, I.A., Laursen, A.M. Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-aminobutyric acid. *J. Physiol. (London)* 305: 279-296, 1980.
- Andersen, P., Eccles, J.C., Loyning, Y. Pathway of postsynaptic inhibition in the

- hippocampus. *J. Neurophysiol.* 27: 608-619, 1964a.
- Andersen, P., Eccles, J.C., Loyning, Y. Location of postsynaptic inhibitory synapses on hippocampal pyramids. *J. Neurophysiol.* 27: 608-619, 1964b.
- Andersen, P., Gross, G.N., Lomo, T., Sveen, O. Participation of inhibitory and excitatory interneurons in the control of hippocampal cortical output. In: *The Interneuron* edited by Brazier, M.A.B., Los Angeles, University of California Press, pp 415-466, 1969.
- Andersen, P., Holmqvist, B., Voorhoeve, P.E. Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol. Scand.* 66: 448-460, 1966b.
- Andrade, R. Blockade of neurotransmitter-activated K⁺ conductance by QX-314 in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 259-262, 1991.
- Andrade, R., Malenka, R.C., Nicoll, R.A. A G-protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus. *Science Wash. D.C.* 234: 1261-1265, 1986.
- Andreasen, M., Lambert, J.D.C., Jensen, M.S. Effects of new non-N-methyl-D-Aspartate antagonists on synaptic transmission in the in vitro rat hippocampus. *J. Physiol. (London)* 414: 317-336, 1989.
- Avoli, M., Perreault, P., Olivier, A., Villemure, J.G. 4-aminopyridine induces along lasting depolarizing GABAergic potential in human neocortical and hippocampal neurons maintained in vitro. *Neurosci. Lett.* 94: 327-332, 1988.
- Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R., Seale, B. Free γ -aminobutyric acid in brain.

- J. Biol. Chem.* 187: 35-39, 1950.
- Balasz, R., Machiyama, Y., Hammond, B.J., Julian, J., Richter, P. The operation of γ -aminobutyrate and bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro. *Biochem. J.* 116: 445-461, 1970.
- Batchelor, A.M., Madge, D.J., Garthwaite, J. Synaptic activation of metabotropic glutamate receptors in the parallel fiber-Purkinje cell pathway in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 63: 911-915, 1994.
- Baude, A., Nusser, Z., Roberts, J.D.B., Mulvihill, E., McIlhiney, R.A.J., Somogyi, P. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11: 771-787, 1993.
- Bazemore, A.W., Elliott, K.A.C., Florey, E. Isolation of factor I. *J. Neurochem.* 1: 334-339, 1957.
- Ben-Ari, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14: 175-403, 1985.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., Gaiarsa, J.L. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol.* 416: 303-325, 1989.
- Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O., Gaiarsa, J.L. GABA_A, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated ménage à trois. *Trends Neurosci.* 20: 523-529, 1997.
- Ben-Ari, Y., Krnjevic, K., Reiffenstein, R.J., Reinhardt, W. Hippocampal seizures

- and failure of inhibition. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 57: 1462-1466, 1979.
- Ben-Ari, Y., Tseeb, V., Ragozino, D., Khazipov, R., Gaiarsa, J.L. γ -aminobutyric acid: a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog. Brain Res.* 102: 261-272, 1994.
- Bergles, D.E., Doze, V.A., Madison, D.V., Smith, S.J. Excitatory actions of norepinephrine on multiple classes of hippocampal CA1 interneurons. *J. Neurosci.* 16(2): 572-585, 1996.
- Bijak, M., Misgeld, U., Müller, W. Interaction of noradrenergic and cholinergic agonists with ligands increasing K-conductance of guinea pig hippocampal neurons, in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 3: 473-479, 1991.
- Biscoe, T.J., Straughan, D.W. Micro-electrophoretic studies of neurons in the cat hippocampus. *J. Physiol. (London)* 183: 341-359, 1966.
- Bonnano, G., Raiteri, M. Multiple GABA_B receptors. *Trends in Pharmacol. Sci.* 14: 259-261, 1993.
- Bormann, J., Hamill, O.P., Sakmann, B. Mechanisms of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons. *J. Physiol. (London)* 285: 243-286, 1987.
- Bowery, N.G. GABA_B receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 109-147, 1993.
- Bowery, N.G., Doble, A., Hill, D.R., Hudson, A.L., Shaw, J.S., Turnbull, M.J., Warrington, R. (-) Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral

- autonomic nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.* 71: 53-70, 1981.
- Bowery, N.G., Hill, D.R., Hudson, A.L., Doble, A., Middlemiss, D.N., Shaw, J., Turnbull, M. (-) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, 283: 92-94, 1980.
- Brown, T.H., Wong, R.K.S., Prince, D.A. Spontaneous miniature synaptic potentials in hippocampal neurons. *Brain Res.* 177: 194-199, 1979.
- Buckle, P.J., Haas, H.L. Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J. Physiol. (London)* 326: 109-122, 1982.
- Buzsaki, G. Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurobiol.* 22: 131-153, 1984.
- Calabresi, P., Mercuri, N.B., De Murtas, M., Bernardi, G. Endogenous GABA mediates presynaptic inhibition of spontaneous and evoked excitatory synaptic potentials in the rat neostriatum. *Neurosci. Lett.* 118: 99-102, 1990.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J.I., Ben-Ari, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* 14: 515-519, 1991.
- Collingridge, G.L., Gage, P.W., Robertson, B. Inhibitory postsynaptic currents in rat hippocampal CA1 neurones. *J. Physiol. (London)* 356: 551-564, 1984.
- Collingridge, G.L., Herron, C.E., Lester, R.A.J. Synaptic activation of N-methyl-D-Aspartate receptors in Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampus. *J. Physiol. (London)* 399: 283-300, 1988.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., McLennan, H. The antagonism of amino acid-

induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro. *J. Physiol. (London)* 334: 19-31, 1983.

Colmers, W.F., Pittman, Q.J. Presynaptic inhibition by neuropeptide Y and baclofen in hippocampus: insensitivity to pertussis toxin. *Brain Res.* 498: 99-104, 1989.

Connors, B.W., Malenka, R.C., Silva, L.R. Two inhibitory postsynaptic potentials and GABA_A and GABA_B receptor-mediated responses in neocortex of rat and cat. *J. Physiol. (London)* 406: 443-468, 1988.

Crossman, A.R., Walker, R.J., Woodruff, G.N. Picrotoxin antagonism of gamma-aminobutyric acid inhibitory responses and synaptic inhibition in the rat substantia nigra. *Br. J. Pharmacol.* 49(4): 696-698, 1973.

Crunelli, V., Leresche, N. A role for GABA_B receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. *TINS* 14: 16-21, 1991.

Curtis, D.R., Duggan, A.W., Felix, D., Johnston, G.A.R. Bicuculline and central GABA receptors. *Nature* 228: 676-677, 1970.

Curtis, D.R., Duggan, A.W., Felix, D., Johnston, G.A.R. Bicuculline an antagonist of GABA and synaptic inhibition in the spinal cord. *Brain Res.* 2: 69-96, 1971.

Curtis, D.R., Duggan, A.W., Johnston, G.A.R. Glycine, strychnine, picrotoxin and spinal inhibition. *Brain Res.* 14(3): 759-762, 1969.

Curtis, D.R., Felix, D., McLennan, H. GABA and the hippocampal inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 40: 881-883, 1970.

Cutting, G.R., Curristin, S., Zoghbi, H., O'Hara, B., Seldin, M.F., Uhl, G.R.

Identification of a putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor subunits ρ_2 cDNA and colocalization of the genes encoding ρ_2 (GABARR2) and ρ_1 (GABARR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics* 12: 801-806, 1992.

Cutting, G.R., Lu, L., O'Hara, B.F., Kasch, L.M., Montrose-Rafizadeh, C.,

Donovan, D., Shimada, S., Antonarakis, S.E., Guggino, W.B., Uhl, G.R., Kazazian, H.H. Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) ρ_1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2673-2677, 1991.

Davies, C.H., Collingridge, G.L. The physiological regulation of synaptic inhibition by GABA_B autoreceptors in rat hippocampus. *J. Physiol. (London)* 472: 245-265, 1993a.

Davies, C.H., Davies, S.N., Collingridge, G.L. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *J. Physiol. (London)* 424: 513-531, 1990.

Davies, C.H., Pozza, M.F., Collingridge, G.L. CGP55845A: A potent antagonist of GABA_B receptors in the CA1 region of rat hippocampus. *Neuropharmacology* 32(10): 1071-1073, 1993b.

Davies, C.H., Starkey, S.J., Pozza, M.F., Collingridge, G.L. GABA_B autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature* 349: 609-611, 1991

Deisz, R.A., Billard, J.M., Zieglgänsberger, W. Presynaptic and postsynaptic

- GABA_B receptors of neocortical neurones of the rat in vitro: differences in pharmacology and ionic mechanisms. *Synapse* 25: 62-72, 1997.
- Deisz, R.A., Prince, D.A. Frequency-dependent depression of inhibition in guinea-pig neocortex in vitro by GABA_B receptor feed-back on GABA release. *J. Physiol. (London)* 412: 513-541, 1989.
- DeKoninck, Y., Mody, I. Endogenous GABA activates small conductance K⁺ channels underlying slow IPSCs in rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 77: 2202-2208, 1997.
- Dingledine, R., Langmoen, I.A. Conductance changes and inhibitory actions of hippocampal recurrent IPSPs. *Brain Res.* 185: 277-287, 1980.
- Dittman, J.S., Regher, W.G. Mechanism and kinetics of heterosynaptic depression at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.* 17 (23): 9048-9059, 1997.
- Dolphin, A.C., McGuirk, S.M., Scott, R.H. An investigation into the mechanisms of inhibition of calcium channel currents in cultured sensory neurons of the rat by guanine nucleotide analogues and by (-)baclofen. *Br. J. Pharmacol.* 97: 263-273, 1989.
- Dolphin, A.C., Scott, R.H. Calcium channel currents and their inhibition by (-)baclofen in rat sensory neuron by guanine nucleotide. *J. Physiol. (London)* 386: 1-17, 1987.
- Dudar, J.D. In vitro excitation of pyramidal cell dendrites by glutamic acid. *Neuropharmacology* 13: 1083-1089, 1974.
- Dunlap, K. Two types of γ -aminobutyric acid receptor on embryonic sensory

- neurones. *Br. J. Pharmacol.* 74: 579-585, 1981.
- Dunlap, K., Fischbach, G.D. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J. Physiol. (London)* 317: 519-535, 1981b.
- Dutar, P., Nicoll, R. A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. *Nature* 332:156-158, 1988a.
- Dutar, P., Nicoll, R. Pre- and postsynaptic GABA_B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1: 585-591, 1988b.
- Edwards, F.A., Konnerth, A., Sakmann, B., Busch, C. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J. Physiol. (London)* 430: 213-249, 1990
- Fatt, P., Katz, B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol. (London)* 117: 109-128, 1952
- Feigenspan, A., Wassle, H., Bormann, J. Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* 361: 159-162, 1993.
- Gähwiler, B.H., Brown, D.A. GABA_B-receptor-activated K⁺ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1558-1562, 1985.
- Garris, P.A., Ciolkowski, E.L., Pastore, P., Wightman, R.M. Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *J. Neurosci.* 14(10): 6084-6093, 1994.
- Gonon, F. Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by

- D1 receptors in the rat striatum in vivo. *J. Neurosci.* 17(15): 5972-5978, 1997.
- Grover, L.M., Lambert, N.A. Schwartzkroin, P.A., Tyler, T.J. Role of HCO_3^- ions in depolarizing GABA_A receptor-mediated responses in pyramidal cells of rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 69: 1541-1555, 1993.
- Green, K.A., Cottrell, G.A. Actions of baclofen on components of the Ca-current in rat and mouse DRG neurons in culture. *Br. J. Pharmacol.* 94: 235-45, 1988
- Haas, H.L., Wieser, H.G., Yasargil, M.G. 4-aminopyridine and fiber potentials in rat and human hippocampal slices. *Experientia*, 39: 114-115, 1983.
- Hablitz, J.J., Thalmann, R.H. Conductance changes underlying a late synaptic hyperpolarization in hippocampal CA3 neurons. *J. Neurophysiol.* 58: 160-179, 1987.
- Harrison, N.L. On the presynaptic action of baclofen at inhibitory synapses between cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol. (London)* 422: 433-446, 1990a.
- Holz, G.G., Rane, S.G., Dunlap, K. GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 319: 670-672, 1986.
- Howe, J.R., Sutor, B., Zieglgänsberger, W. Baclofen reduces postsynaptic potentials of rat cortical neurones by an action other than its hyperpolarizing action. *J. Physiol. (London)* 384: 539-569, 1987a.
- Ikeda, S.R. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-

protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 380: 255-258, 1996.

Inoue, M., Matsuo, T., Ogata, N. Baclofen activates voltage-dependent and 4-aminopyridine sensitive K^+ conductance in guinea-pig hippocampal pyramidal cells maintained in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 84: 833-841, 1985a.

Inoue, M., Matsuo, T., Ogata, N. Possible involvement of K^+ conductance in the action of γ -aminobutyric acid in the guinea-pig hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 86: 515-524, 1985b.

Isaacson, J.S., Solis, J.M., Nicoll, R.A. Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10: 165-175, 1993.

Iversen, L.L., Bloom, F.E. Studies of uptake 3H -GABA and 3H -glycine in slices and homogenates of rat brain and spinal cord by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.* 41: 131-143, 1972.

Janigro, D., Schwartzkroin, P.A. Effects of GABA and baclofen on pyramidal cells in the developing rabbit hippocampus: an in vitro study. *Dev. Brain Res.* 41:171-184, 1988.

Jankowska, E., Lundberg, E., Rudomin, P., Sykova, E. Effects of 4-aminopyridine on transmission in excitatory and inhibitory synapses in the spinal cord. *Brain Res.* 136: 387-392, 1977.

Jarolimek, W., Bijak, M., Misgeld, U. Differences in the Cs^+ block of baclofen and 4-aminopyridine induced potassium currents of guinea pig CA3 neurons in vitro. *Synapse* 18: 169-177, 1994.

Jarolimek, W., Demmelhuber, J., Bijak, M., Misgeld, U. CGP55845A blocks

- baclofen, γ -aminobutyric acid and inhibitory postsynaptic potassium currents in guinea pig CA3 neurons. *Neurosci. Lett.* 154: 31-34, 1993.
- Jarolimek, W., Misgeld, U. 4-Aminopyridine-induced synaptic GABA_B currents in granule cells of the guinea-pig hippocampus. *Pflügers Arch.* 425:491-498, 1993.
- Jiang, Z.G., Allen, C.N., North, R.A. Presynaptic inhibition by baclofen of retinohypothalamic excitatory synaptic transmission in rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 64: 813-819, 1995.
- Johnston, G.A.R. Molecular Biology, Pharmacology and Physiology of GABA_C receptors. Dans: *The GABA receptors*, Enna, S.J., Bowery, N.G., Eds, Humana Press, 2nd Ed. 1997.
- Kaila, K., Voipio, J. Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature* 330: 163-165, 1987.
- Kandel, E.R., Spencer, W.A., Brinkley, F.J. Electrophysiology of hippocampal neurons I. Sequential invasion and synaptic organization. *J. Neurophysiol.* 24: 225-242, 1961.
- Karlsson, G., Pozza, M., Olpe, H.-R. Phaclofen: a GABA_B blocker reduces long duration inhibition in the neocortex. *Eur. J. Pharmacol.* 148: 485-486, 1988.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B. Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate

- receptors. *Nature* 386: 239-246, 1997.
- Kavanaugh, M.P., Arriza, J.L., North, R.A., Amara, S.G. Electrogenic uptake of γ -aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in oocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 22007-22009, 1992.
- Knowles, W.D., Schneiderman, J.H., Wheal, H.V. Stafstrom, C.E., Schwartzkroin, P.A. Hyperpolarizing potentials in guinea pig hippocampal CA3 neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 4: 207-230, 1984.
- Knowles, W.D., Schwartzkroin, P.A. Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. *J. Neurosci.* 1: 318-322, 1981.
- Krnjevic, K., Schwartz, S. The action of γ -aminobutyric acid on cortical neurons. *Exp. Brain Res.* 3: 320-336, 1967.
- Lacaille, J.-C., Mueller, A.L., Kunkel, D.D., Schwartzkroin, P.A. Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: Electrophysiology and morphology. *J. Neurosci.* 7: 1979-1993, 1987.
- Lacey, M.G., Mercuri, N.B., North, R.A. On the potassium conductance increase activated by GABA_B and dopamine D₂ receptors in rat substantia nigra neurones. *J. Physiol. (London)* 401: 437- 453, 1988.
- Lambert, N.A., Borroni, A.M., Grover, L.M., Teyler, T.J. Hyperpolarizing and depolarizing GABA_A receptor-mediated dendritic inhibition in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 66: 1538-1548, 1991b.
- Lambert, N.A., Harrison, N.L., Teyler, T.J. Baclofen-induced disinhibition in area

- CA1 of rat hippocampus is resistant to extracellular Ba^{2+} . *Brain Res.* 547: 349-352, 1991a.
- Lambert, N.A., Wilson, W.A. Heterogeneity in pre-synaptic regulation of GABA release from hippocampus inhibitory neurons. *Neuron* 11: 1057-1067, 1993.
- Lambert, N.A., Wilson, W.A. Discrimination of post- and presynaptic GABA_B receptor-mediated responses by tetrahydroacridine in area CA3 of the rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 69: 630-635, 1993.
- Lanthorn, T.H., Cotman, C.W. Baclofen selectively inhibits excitatory transmission in the hippocampus. *Brain Res.* 225: 171-178, 1981.
- Lemeignan, M. Analysis of the action of 4-aminopyridine on the cat lumbar spinal cord. I. Modification of the afferent volley, the monosynaptic discharge amplitude and the polysynaptic evoked responses. *Neuropharmacology* 11(4): 551-558, 1972.
- Lorente de Nó, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 46: 112-177, 1934.
- Luddens, H., Korpi, E.R., Seeburg, P.H. GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology* 34: 245-254, 1995.
- Lundh, H., Thesleff, S. The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.* 42: 411-412, 1977.
- MacDonald, R.L., Olsen, R.W. GABA_A receptor channels. *Ann. Rev. Neurosci.* 17:

569-602, 1994.

Madison, D.V., Nicoll, R.A. Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat

hippocampus. *J. Physiol. (London)* 398: 123-130, 1988.

McCarren, M., Alger, B.E. Use-dependent depression of IPSPs in rat hippocampal

pyramidal cells in vitro. *J. Neurophysiol.* 53: 557-571, 1985.

McCormick, D.A. GABA as an inhibitory transmitter in human cerebral cortex. *J.*

Neurophysiol. 62: 1018-1027, 1989.

McGeer, P.L., Eccles, J.C., McGeer, E.G. *Molecular Neurobiology of the*

Mammalian Brain. Plenum press, New York, 1978.

McGeer, P.L., Hattori, T., McGeer, E.G. Chemical and autoradiographic analysis

of γ -aminobutyric acid transport in Purkinje cells of the cerebellum. *Exp.*

Neurol. 47: 26-41, 1975.

McKernan, R.M., Whiting, P. J. Which GABA_A receptor subtypes really occur in

the brain. *Trends Neurosci.* 19:139-143, 1996.

Michelson, H.B., Wong, R.K.S. Synchronization of inhibitory neurons in the

guinea-pig hippocampus in vitro. *J. Physiol. (London)* 477: 35-45, 1994.

Miles, R., Wong, R.K.S. Unitary inhibitory synaptic potentials in the guinea pig

hippocampus in vitro. *J. Physiol. (London)* 356: 97-113, 1984.

Misgeld, U., Bijak, M., Jarolimek, W. A physiological role for GABA_B receptors

and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system.

Progress in Neurobiology 46: 423-462, 1995.

Misgeld, U., Deisz, R.A., Dodt, H.U., Lux, H.D. The role of chloride transport in

- postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. *Science Wash. DC* 232: 1413-1415, 1986.
- Misgeld, U., Müller, W., Brunner, H. Effects of (-) baclofen on inhibitory neurons in the guinea pig hippocampal slice. *Pflügers Archiv*, 414: 139-144, 1989.
- Mott, D.D., Xie, C.W., Wilson, W.A., Swartzwelder, H.S., Lewis, D.V. GABA_B autoreceptors mediate disinhibition and enhance signal transmission in the dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 69(3): 674-691, 1990.
- Müller, W., Misgeld, U. Carbachol reduces $I_{K,Baclofen}$ but not $I_{K,GABA}$ in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 102:229-234, 1989.
- Nadler, J.V. , Vaca, K.W., White, W.F., Lynch, G.S., Cotman, C.W. Aspartate and glutamate as possible transmitters of excitatory hippocampal afferents. *Nature* 260: 538-540, 1976.
- Nadler, J.V. , Vaca, K.W., White, W.F., Lynch, G.S., Cotman, C.W. Biochemical correlates of transmission mediated by glutamate and aspartate. *J. Neurochem.* 31: 147-155, 1978.
- Nathan, T., Jensen, M.S., Lambert, J.D.C. The slow inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal CA1 neurones is blocked by intracellular injection of QX-314. *Neurosci. Lett.* 110: 309-313, 1990.
- Nathan, T., Lambert, J.D.C. Depression of the fast IPSP underlies paired-pulse facilitation in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 66: 1704-1715, 1991.
- Newberry, N.R., Nicoll, R.A. Direct hyperpolarizing action of baclofen on

hippocampal pyramidal cells. *Nature* 308:450-452, 1984a.

Newberry, N.R., Nicoll, R.A. A bicuculline-resistant inhibitory post-synaptic potential in rat hippocampal cells in vitro. *J. Physiol. (London)* 348:239-254, 1984b.

Newberry, N.R., Nicoll, R.A. Comparison of the action of baclofen with γ -aminobutyric acid on rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Physiol. (London)* 360: 161-165, 1985.

Nicoll, R.A., Alger, B.E. Synaptic excitation may activate a calcium-dependent potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. *Science Wash. DC* 957-959, 1981.

Nicoll, R.A., Malenka, R.C., Kauer, J.A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 70(2): 513-565, 1990.

Ogata, N., Inoue, M., Matsuo, T. Contrasting properties of K^+ conductances induced by baclofen and γ -aminobutyric acid in slices of the guinea pig hippocampus. *Synapse* 1:62-69, 1987.

Oleskevich, S., Lacaille, J.-C. Reduction of GABA_B inhibitory postsynaptic potentials by serotonin via pre- and postsynaptic mechanisms in CA3 pyramidal cells of rat hippocampus in vitro. *Synapse* 12(3): 173-188, 1992.

Olpe, H.-R., Karlsson, G., Pozza, M.F., Brugger, F., Steinmann, M., Riezen, H.V., Fagg, G., Hall, R.G., Froestl, W., Bittiger, H. CGP-35348: a centrally active blocker of GABA_B receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 187: 27-38, 1990.

- Olsen, R.W., Tobin, A.J. Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J.* 4: 1469-1480, 1990.
- Otis, T.S., Mody, I. Differential activation of GABA_A and GABA_B receptors by spontaneously released transmitter. *J. Neurophysiol.* 67: 227-235, 1992.
- Otis, T.S., Staley, K.J., Mody, I. Perpetual inhibitory activity in mammalian brain slices generated by spontaneous GABA release. *Brain Res.* 545: 142-150, 1991.
- Ouardouz, M., Lacaille, J.-C. Properties of unitary IPSCs in hippocampal pyramidal cells originating from different types of interneurons in young rats. *J. Neurophysiol.* 77: 1939-1949, 1997.
- Pearce, R.A. Physiological evidence for two distinct GABA_A responses in rat hippocampus. *Neuron* 10: 189-200, 1993.
- Pearce, R.A., Grunder, S.D., Faucher, L.D. Different mechanisms for use-dependent depression of two GABA_A-mediated IPSCs in rat hippocampus. *J. Physiol. (London)* 484: 425-435, 1995.
- Perreault, P., Avoli, M. Effects of low concentrations of 4-aminopyridine on CA1 pyramidal cells of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 61: 953-970, 1989.
- Piguet, P. GABA_A- and GABA_B-mediated inhibition in the rat dentate gyrus in vitro. *Epilepsy Res.* 16: 111-122, 1993.
- Pitler, T.A., Alger, B.E. Differences between presynaptic and postsynaptic GABA_B mechanisms in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 72 (5): 2317-2327, 1994.

- Polenzani, L., Woodward, R.M., Miledi, R. Expression of mammalian γ -aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4318-4322, 1991.
- Premkumar, L.S., Chung, S.-H., Gage, P.W. GABA-induced potassium channels in cultured neurons. *Proc. R. Soc. Lond.* B241: 153-158, 1990a.
- Premkumar, L.S., Gage, P.W. Potassium channels activated by GABAB agonists and serotonin in cultured hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 71: 2570-2575, 1994.
- Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Stefani, E., Birnbaumer, L. Direct interaction of $G\beta\gamma$ with a C-terminal $G\beta\gamma$ -binding domain of Ca^{2+} channel α_1 subunit is responsible for channel inhibition by G-protein coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8866-8871, 1997.
- Qian, H., Dowling, J.E. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature* 361: 162-164, 1993.
- Qian, H. and Dowling, J.E. Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina. *J. Neurosci.* 14:4299-4307, 1994.
- Ramón y Cajal, S. *Histologie du Système Nerveux de L'homme et des Vertébrés*. Maloine, Paris, 1911.
- Roberts, E., Frankel, S. γ -aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 187: 55-63, 1950.
- Rogawski, M.A., Barker, J.L. Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage-clamp in spinal neurons. *Brain*

- Res.* 280: 180-185, 1983.
- Saint, D.A., Thomas, T., Gage, P.W. GABA_B agonists modulate a transient potassium current in cultured mammalian hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 118:9-13, 1990.
- Samulack, D.D., Lacaille, J.-C., Hyperpolarizing synaptic potentials evoked in CA1 pyramidal cells by glutamate stimulation of interneurons from the oriens/alveus border of rat hippocampal slices. II. Sensitivity to GABA antagonists. *Hippocampus* 3: 345-358, 1993.
- Samulack, D.D., Williams, S., Lacaille, J.-C., Hyperpolarizing synaptic potentials evoked in CA1 pyramidal cells by glutamate stimulation of interneurons from the oriens/alveus border of rat hippocampal slices. I. Electrophysiological response properties. *Hippocampus* 3: 331-344, 1993.
- Scanziani, M., Capogna, M., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M. Pre-synaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* 9: 919-927, 1992.
- Schofield, P.R., Darlison, M.G., Fijita, N., Burt, D.R., Stephenson, F.A., Rodriguez, H., Rhee, L.M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T.A., Seeburg, P.H., Barnard, E.A. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328: 221-227, 1987.
- Scholz, K.P., Miller, R.J. GABA_B receptor mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.*

(London) 444: 669-686, 1991.

Schwartzkroin, P.A., Andersen, P. Glutamic acid sensitivity of dendrites in

hippocampal slices in vitro. *Adv. Neurol.* 12: 45-51, 1975.

Scott, R.H., Dolphin, A.C. Regulation of calcium currents by a GTP analogue:

potentiation of (-)baclofen mediated inhibition. *Neurosci. Lett.* 56: 59-64,

1986.

Scoville, M.B., Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal

lesions. *J. Neurol. Neurosurg. and Psychiatry* 20: 11-21, 1957.

Segal, M. Repetitive inhibitory postsynaptic potentials evoked by 4-aminopyridine

in hippocampal neurons in vitro. *Brain Res.* 414: 285-293, 1987.

Segal, M., Barker, J.L. Rat hippocampal neurons in culture: properties of GABA-

activated Cl⁻ ion conductance. *J. Neurophysiol.* 51: 500-515, 1984a.

Shefner, S.A., Osmanovic, S.S. GABA_A and GABA_B receptors and the ionic

mechanisms mediating their effects on locus coeruleus neurons. *Prog. in*

Brain Res. 88: 187-195, 1991.

Sivilotti, L., Nistri, A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system.

Prog. Neurobiol. 36:35-92, 1991.

Solis, J.M., Nicoll, R.A. Pharmacological characterization of GABA_B-mediated

responses in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *J. Neurosci.*

12:3466-3472, 1992a.

Soltesz, I., Haby, M., Leresche, N., Crunelli, V. The GABA_B antagonist phaclofen

inhibits the late K⁺-dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal

- neurons. *Brain Res.* 448: 351-354, 1988.
- Squire, L.R. *Memory and Brain*. New York: *Oxford University Press*, 1987.
- Staley, K.J., Soldo, B.L., Proctor, W.R. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science* 269: 977-981, 1995.
- Starke, K. Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21: 7-30, 1981.
- Starke, K., Gothert, M., and Kilbinger, H. Modulation of neurotransmitters release by pre-synaptic autoreceptors. *Physiol. Rev.* 69: 864-989, 1989.
- Steward, O., Scoville, S.A. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169: 347-370, 1976.
- Storm, J.F. Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. Dans: *Prog. Brain Res.* 83: 161-187, 1990.
- Sugita, S., Johnson, S.W., North, R.A. Synaptic inputs to GABA_A and GABA_B receptors originate from discrete afferent neurons. *Neurosci. Lett.* 134: 207-211, 1992.
- Sutor, B., Zieglgänsberger, W. A GABA-mediated, chloride dependent depolarizing IPSP in neocortical neurones of the rat in vitro. *Pflügers Archiv.* 400, suppl., R37, 1984.
- Taube J.S., Schwartzkroin, P.A. Hyperpolarizing responses to application of glutamate in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci. Lett.* 78: 85-90, 1987.
- Thalmann, R.H. Reversal properties of an EGTA-resistant late hyperpolarization

that follows synaptic stimulation of hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 46: 103-108, 1984.

Thalmann, R.H. Pertussis toxin blocks a late inhibitory post-synaptic potential in hippocampal CA3 neurons. *Neurosci. Lett.* 82: 41-46, 1987.

Thalmann, R.H. Evidence that guanosine triphosphate (GTP)-binding proteins control a synaptic response in brain: effect of pertussis toxin and GTP γ S on the late inhibitory postsynaptic potential of hippocampal CA3 neurons. *J. Neurosci.* 8: 4589-4602, 1988.

Thalmann, R.H., Ayala, G. A late increase in potassium conductance follows synaptic stimulation of granule neurons of the dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* 29: 243-248, 1982.

Thompson, S.M., Capogna, M., Scanziani, M. Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci.* Vol 16, 6: 222-227, 1993.

Thompson, S.M., Deisz, R.A., Prince, D.A. Relative contribution of passive equilibrium and active transport to the distribution of chloride in mammalian cortical neurons. *J. Neurophysiol.* 60: 105-124, 1988a.

Thompson, S.M., Gähwiler, B. Activity-dependent disinhibition. III. Desensitization and GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition in the hippocampus in vitro. *J. Neurophysiol.* 61(3): 524-533, 1989.

Thompson, S.M., Gähwiler, B. Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol. (London)* 451: 329-345, 1992a.

- Thompson, S.M., Gähwiler, B. Effects of the GABA uptake inhibitor tiagabine on inhibitory synaptic potentials in rat hippocampal slice cultures. *J. Neurophysiol.* 67: 1698-1701, 1992b.
- Traub, R.D., Miles, R., Wong, R.K.S. Models of the origin of rhythmic population oscillations in the hippocampal slice. *Science* 243: 1319-1325, 1989.
- Turner, D.A. Feed-forward inhibitory potential and excitatory interactions in guinea-pig hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol. (London)* 422: 333-350, 1990.
- Uschimura, N., North, R.A. Baclofen and adenosine inhibit synaptic potentials mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate release in rat nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 663-668, 1991.
- Voskuyl, R.A., Albus, H. Spontaneous epileptiform discharges in hippocampal slices induced by 4-aminopyridine. *Brain Res.* 342: 54-66, 1985.
- Wagner, P.G., Dekin, M.S. GABA_B receptors are coupled to a barium-insensitive outward rectifying potassium conductance in premotor respiratory neurons. *J. Neurophysiol.* 69:286-289, 1993.
- Weiss, D., Hablitz, J.J. Interaction of penicillin and pentobarbital with inhibitory synaptic mechanisms in neocortex. *Cell. Mol. Neurobiol.* 4: 301-317, 1984.
- Wilcox, K.S., Dichter, M.A. Paired-pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA_B autoreceptor activation. *J. Neurosci.* 14(3): 1775-1788, 1994.
- Williams, S., Lacaille, J.-C. Bicuculline and phaclofen-resistant hyperpolarizations

- evoked by glutamate applications to *stratum lacunosum-moleculare* in CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* 2: 993-1003, 1990.
- Williams, S., Lacaille, J.-C. GABA_B receptor-mediated inhibitory postsynaptic potentials evoked by electrical stimulation and by glutamate stimulation of interneurons in *stratum lacunosum-moleculare* in hippocampal CA1 pyramidal cells *in vitro*. *Synapse* 11: 249-258, 1992.
- Wojcik, W.J., Neff, N.H. γ -aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain and in the cerebellum; these receptors may be associated with granule cells. *Mol. Pharmacol.* 25: 24-28, 1984.
- Wong, R.K.S., Traub, R.D., Miles, R. Epileptogenic mechanisms as revealed by studies in the hippocampal slice. In: *Electrophysiology of Epilepsy* (Schwartzkroin, P.A., Wheal, H.V. eds). New York Academic Press, pp. 253-276, 1984.
- Wong, R.K.S., Watkins, D.J. Cellular factors influencing GABA response in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 48: 938-951, 1982.
- Worley, P.F., Baraban, J.M., McCarren, M., Snyder, S.H., Alger, B.E. Cholinergic phosphatidylinositol modulation of inhibitory, G protein-linked, neurotransmitter actions: electrophysiological studies in rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3467-3471, 1987.
- Wu, L.-G., Saggau, P. GABA_B receptor mediated presynaptic inhibition in guinea pig hippocampus is caused by reduction of pre-synaptic Ca²⁺ influx. *J.*

Physiol. (London) 485: 649-657, 1995.

Xie, X., Smart, T.G. A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. *Nature* 349: 521-524, 1991.

Yoon, K.W., Rothman, S.M. The modulation of rat hippocampal synaptic conductances by baclofen and γ -aminobutyric acid. *J. Physiol. (London)* 442: 377-390, 1991.

ANNEXE

Contribution de l'étudiant aux articles**Premier article: Journal of Neurophysiology 76: 69-80, 1996**

Mr. Tri Pham a effectué toutes les expériences. Il a fait l'analyse et la compilation des données, la préparation des tableaux, la figure 7 ainsi que la rédaction de la première version du manuscrit.

Deuxième article: Journal of Neurophysiology 80: 297-308, 1998

Mr. Tri Pham a effectué les expériences, sauf celles impliquant l'enregistrement en mode patch-clamp (Dr. Suzanne Nurse). Il a fait l'analyse et la compilation des données, la préparation des figures (sauf figure 10; Dr. Suzanne Nurse). Il a rédigé la première version du manuscrit.