

Formation de la frontière entre cerveaux moyen et postérieur : implication des gènes *Otx2* et *Gbx2*

par Matías Hidalgo-Sánchez*, Sandrine Millet**, Evelyne Bloch-Gallego & Rosa-Magda Alvarado-Mallart

INSERM U-106, Hôpital de la Salpêtrière, 47, Boulevard de l'Hôpital, F-75651 Paris Cedex 13

Nouvelles adresses :

* Depto. Biología Celular, Universidad de Extremadura, Avda. de Elvas s.n.06071 Badajoz, Espagne ;

** Developmental Genetic Program (4th floor), Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University Medical Center, 540 First Avenue, New York, NY 10016, USA.

reçu le 24 février 2000

RÉSUMÉ

Nous avons étudié la subdivision neuromérique de la région mésencéphalique-métencéphalique (mes-met) du tube neural, en utilisant des transplantations hétérospécifiques entre les embryons de Poulet et de Caille et en analysant, chez l'embryon de poulet normal et les embryons chimères, l'étendue de l'expression de plusieurs gènes régulateurs qui s'expriment dans cette région. Des greffes homotopiques ont montré la présence d'une limite interneuromérique entre les ébauches du mésencéphale et du cervelet (frontière mes-met ou entre cerveaux moyen et postérieur). Cette frontière est formée par la confrontation des domaines d'expression *Otx2-Wnt1* et *Gbx2-Fgf8*. En revanche, l'expression des gènes *En2* et *Pax2* s'étend de part et d'autre de cette frontière. Nous avons montré que la localisation de la limite *Otx2/Gbx2* évolue par rapport à la vésicule mésencéphalique et la constriction mes-met entre les stades HH10 et HH20, ce qui nous a permis de proposer une nouvelle

nomenclature pour ces deux entités morphologiques au stade HH10. En utilisant des transplantations ectopiques entre prosencéphale et le territoire mes-met, nous avons montré que l'expression de la cascade génique menant à un phénotype mes-met peut être induite dans les deux prosomères caudaux. Cette cascade se déclenche sélectivement à la frontière entre le prosencéphale, *Otx2*-positif, et le territoire cérébelleux de l'hôte, fortement *Gbx2*-positif. Cette cascade implique l'induction d'une nouvelle frontière *Otx2/Gbx2* à l'intérieur du transplant. Aucun changement phénotypique n'est observé quand le prosencéphale contacte des territoires *Otx2* positifs de l'hôte. Bien que *Fgf8* soit probablement impliqué dans le déclenchement de l'induction, l'ensemble de nos données suggère fortement que la confrontation des domaines *Otx2/Gbx2* joue un rôle primordial comme organisateur phénotypique du territoire mes-met.

SUMMARY Formation of the midbrain-hindbrain boundary: involvement of both *Otx2* and *Gbx2* genes

We have studied the neuromeric organisation of the mesencephalic-metencephalic (mes-met) territory of the avian neural tube using chick/quail transplantation experiments and analysing the expression of various regulatory genes in chimeric and normal embryos. Homotopic grafts demonstrate the presence of an interneuromeric boundary separating the mesencephalic and cerebellar territories (the mes-met or midbrain/hindbrain boundary). This boundary is characterised from HH10 onwards by the confrontation of the *Otx2-Wnt1* and *Gbx2-Fgf8* expressing domains, while *En2* and *Pax2* genes are expressed at

both sides of the mes-met boundary. The evolution of the position of the *Otx2/Gbx2* boundary with respect to the vesicles and constriction observed within the mes-met domain between stages HH10 and HH20, allows us to redefine the fate map of this region and to propose a new nomenclature for HH10. Transplantation between the prosencephalic neuroepithelium and the mes-met domain shows the possibility of inducing a mes-met phenotype within the two caudal-most prosomeres, preceded by its characteristic genetic cascade. The induction selectively takes place along the boundary between the graft (*Otx2* positive) and

the host cerebellar territory (expressing high levels of *Gbx2*); this includes the induction inside the graft of a new *Otx2/Gbx2* boundary. Conversely, no induction is ever observed when the graft is confronted to the

host *Otx2* expressing domain. Although *Fgf8* may be involved in the inductive events, our data strongly suggest that confrontation between *Otx2* and *Gbx2* is essential as an organiser of the mes-met domain.

LA THÉORIE NEUROMÉRIQUE, UN PEU D'HISTOIRE

Les anatomistes classiques avaient proposé que la segmentation du tube neural, observée dès les premières étapes de la neurogenèse, pourrait être à la base de la spécification précoce du système nerveux central (SNC). Les vésicules encéphaliques, séparées par des constriction, représenteraient des unités morphogénétiques, les *neuromères*, dans lesquels les cellules se multiplieraient sans se mélanger aux cellules issues des neuromères voisins (Orr, 1887). Cependant, cette théorie neuromérique a été largement controversée au cours du XX^e siècle par les défenseurs de l'organisation du SNC en colonnes longitudinales motrices et sensitives. C'est seulement au moment de la découverte des gènes à homéoboîte des Vertébrés, dans les années 80, que la théorie neuromérique a repris un nouvel essor pour être unanimement acceptée aujourd'hui. L'organisation neuromérique du tube neural est particulièrement claire au niveau du rhombencéphale où l'arrêt d'expression des gènes de la famille Hox, les premiers gènes à homéoboîte décrits chez les Vertébrés, coïncide avec les limites inter-rhombomériques (Keynes & Lumsden, 1990; Wilkinson & Krumlauf, 1990). Au niveau du prosencéphale, un modèle prosomérique a été proposé, basé sur l'expression de divers facteurs de transcription (Puelles & Rubenstein, 1993; Rubenstein *et al.*, 1994). Dans cet article, nous traiterons de l'organisation segmentaire de la région mes-met qui contient les ébauches de deux subdivisions majeures du cerveau, le mésencéphale et le cervelet. Nous verrons que les données obtenues à l'aide du modèle de transplantation Caille/Poulet (Le Douarin, 1969), témoignent de la présence d'une séparation neuromérique au niveau de la frontière entre les territoires mésencéphalique et cérébelleux (frontière entre cerveaux moyen et postérieur, aussi appelé frontière mes-met) et de son rôle possible comme centre *organisateur* secondaire.

CARTE DES TERRITOIRES PROSPECTIFS DE LA RÉGION MES-MÉTENCÉPHALIQUE

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé des transplantations homotopiques, *i.e.* échanges de petites portions de l'épithélium mes-met de l'embryon de Poulet par la même portion de l'embryon de Caille (Martínez & Alvarado-Mallart, 1989; Alvarez Otero *et al.*, 1993). Cette approche a montré qu'au stade accessible pour la transplantation, stade 10-11 de Hamburger & Hamilton (1951) (HH10-11), l'ébauche cérébelleuse

s'étend de part et d'autre de la constriction qui sépare la vésicule mésencéphalique et la première vésicule rhombencéphalique, le pro-rhombomère A1 de Vaage (1973) : constriction dite « mes-met ». Des expériences réalisées par l'équipe de Le Douarin utilisant la même approche ont corroboré ces résultats (Hallonet *et al.*, 1990; Hallonet & Le Douarin, 1993). Ces données suggéraient que le cervelet serait formé par deux neuromères distincts : l'un mésencéphalique, l'autre rhombencéphalique. Toutefois, Millet *et al.* (1996) ont étudié plus avant cette question en se basant sur des transplantations homotopiques de diverses portions du territoire mes-met et en analysant, 4 à 48 heures après greffe, l'étendue des territoires transplantés par rapport à l'expression du gène à homéoboîte *Otx2* (Simeone *et al.*, 1992). Les données obtenues ont montré que les constriction observées dans le domaine mes-met, aux stades HH10 et HH20 sont deux entités différentes, non reliées clonalement. En revanche, entre ces deux stades, la limite caudale de l'expression *Otx2* marque toujours le bord caudal de l'ébauche mésencéphalique. Deux points se dégagent de cette analyse : *i*) des mouvements morphogénétiques importants affectent les régions alaires de la vésicule mésencéphalique entre les stades HH10 et HH20, et *ii*) le territoire cérébelleux occupe toujours des régions du tube neural négatives pour le gène *Otx2*. Nous avons aussi montré (Hidalgo-Sánchez *et al.*, 1999a) que le domaine du gène *Gbx2* (Bulfone *et al.*, 1993; von Bubnoff *et al.*, 1995; Wassarman *et al.*, 1997) s'étend à l'ensemble du rhombencéphale, mais que son expression est particulièrement intense dans le territoire cérébelleux, au contact du domaine *Otx2*. En revanche le gène *Pax2* (Asano & Gruss, 1992) s'exprime de part et d'autre de la frontière *Otx2/Gbx2*, formant un double gradient décroissant, tout comme le fait le gène *En2* (Millet & Alvarado-Mallart, 1995). A partir du stade HH10, une frontière nette s'observe dans le territoire mes-met, entre les ébauches du mésencéphale et du cervelet. Elle est formée par la confrontation des territoires *Otx2* et *Gbx2* (Figs. 1A-B). Deux autres gènes qui codent pour des protéines sécrétées, les gènes *Wnt1* (McMahon & Bradley, 1990) et *Fgf8* (Crossley & Martin, 1995), sont aussi juxtaposés à la frontière *Otx2/Gbx2*. *Wnt1* est exprimé dans le territoire *Otx2*, alors que *Fgf8* s'exprime dans le domaine *Gbx2* (Figs. 1B-C). Entre les stades HH10 et HH20, la limite caudale des gènes *Otx2* et *Wnt1* et les limites rostrales de *Gbx2* et *Fgf8* subissent le même déplacement relatif vis-à-vis de la constriction mes-met. Ceci démontre que, dès le stade HH10, la région mes-met est subdivisée en un territoire rostral exprimant *Otx2* et *Wnt1*, et un territoire caudal exprimant les gènes *Gbx2* et *Fgf8*. Cette subdivision moléculaire est cohérente avec la localisation des ébauches mésencéphalique et cérébelleuse. Cepen-

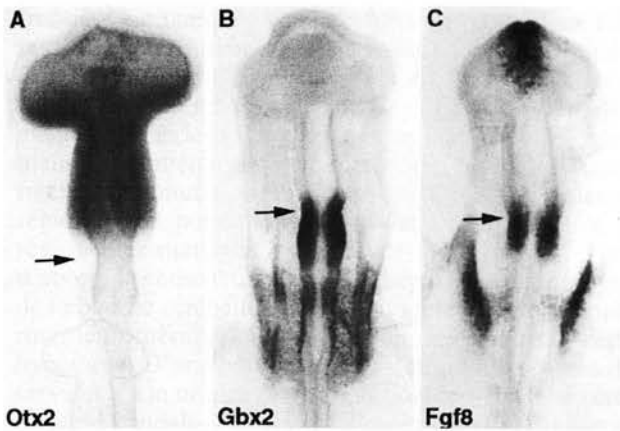


FIG. 1. — Embryons de Poulet au stade HH10 colorés *in toto* par hybridation *in situ*. Les sondes utilisées sont signalées dans chaque figure. Noter que la limite caudale d'expression *Otx2* (A) et les limites rostrales d'expression *Gbx2* (B) et *Fgf8* (C) se trouvent localisées dans le tiers caudal de la vésicule mes-met. Elles marquent la frontière entre cerveau moyen et postérieur (mes-met) $\times 130$. Les flèches marquent la constriction intramet.

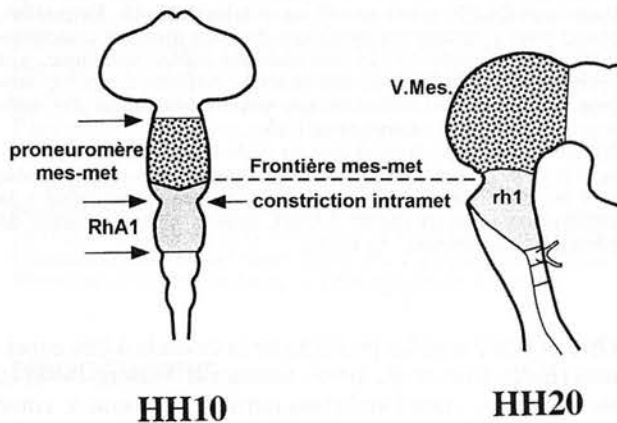


FIG. 2. — Schéma de la région mes-met du tube neural aviaire au stade HH10 et HH20, marquant la frontière entre cerveau moyen et postérieur (mes-met) selon Millet *et al.* (1996) et Hidalgo-Sánchez *et al.* (1999a). La trame indique le territoire mésencéphalique, *Otx2* positif, et le grisé le territoire rostral du rhombencéphale, incluant l'ébauche cérébelleuse et exprimant fortement le gène *Gbx2*. Nomenclature de Hidalgo-Sánchez *et al.* (1999a).

dant, le fait que, chez le Poulet à HH10, la constriction morphologique ne coïncide pas avec la limite *Otx2-Wnt1/Gbx2-Fgf8* est source de confusions. Nous proposons une nouvelle nomenclature pour le stade HH10 (Fig. 2) : nous utiliserons le terme *pro-neuromère* ou *vésicule mes-met* pour désigner la vésicule contenant l'ébauche mésencéphalique mais aussi une partie de l'ébauche cérébelleuse, et *constriction intramétencéphalique* (ou *intramet*) pour désigner la constriction qui se trouve dans le domaine cérébelleux. Nous garderons les termes *vésicule mésencéphalique* et *constriction mes-met* pour les stade HH20, où la constriction coïncide avec la frontière *Otx2/Gbx2*. Nous ne pouvons cependant

conclure quant à l'existence d'une limite interneuromérique intracérébelleuse au niveau de la constriction intramet (voir Hallonet and Alvarado-Mallart, 1997).

CORRÉLATION ENTRE L'EXPRESSION EN2 ET LE PHÉNOTYPE MES-MET

Les prosomères 1 et 2 sont compétents à exprimer *En2*

La possibilité d'induire l'expression du gène *En2* dans le prosencéphale a été démontrée par Martínez *et al.* (1990), en transplantant à ce niveau une partie de l'ébauche cérébelleuse. Ce travail avait également montré que le territoire transplanté maintient son expression *En2* et son devenir cérébelleux. En revanche, le prosencéphale induit présente toujours un gradient décroissant de *En2* et change son devenir thalamique pour développer un mésencéphale ectopique. De même, ces changements phénotypiques peuvent aussi se produire quand le prosencéphale aviaire se trouve au contact d'une greffe *En2* positive provenant d'un embryon de Souris, indiquant que les facteurs inducteurs sont phylogénétiquement conservés. A HH10, au sein de l'épithélium prosencéphalique, seuls les deux prosomères (p) caudaux, p1, p2, ébauches de la région préteectale et du thalamus dorsal respectivement, sont compétents à exprimer *En2* : les régions rostrales à la *zona limitans intrathalamica* (*zli*), i.e. p3-p6, ne répondent pas aux facteurs inducteurs provenant du territoire *En2* (Bloch-Gallego *et al.*, 1996). Toutefois, Ristatore *et al.* (1999) ont récemment montré, chez le Medaka, que l'expression de *En2* dans la région antérieure de l'embryon, obtenue par injection des mRNA au stade 2 cellules, peut induire la cascade génique menant à un phénotype mes-met, ce qui indique que la compétence de l'épithélium prosencéphalique se restreint au cours de la neurulation.

Organisateur isthmique

Il est important de rappeler ici les expériences de Marin & Puelles (1994) montrant le rôle organisateur du neuroépithélium *En2*. Ces auteurs ont obtenu des chimeres Caille/Poulet dans lesquelles la vésicule mes-met avait été transplantée au stade HH10, après inversion rostro-caudale. Ceci leur a permis de montrer que le territoire *En2* est un centre organisateur secondaire, l'*organisateur isthmique*, capable d'induire la séquence caudo-rostrale des noyaux cérébello-isthmo-mésencéphaliques. Plus tard, Crossley *et al.* (1996) ont appliqué des billes acryliques recouvertes d'héparine et imprégnées de FGF8 dans le prosencéphale du poulet au stade HH10 ; ils ont montré que ce facteur mime l'effet de l'organisateur isthmique sur les deux prosomères compétents. Rappelons que le territoire isthmo-cérébelleux exprime aussi le gène *Fgf8* (Crossley & Martin, 1995 ; Hidalgo-Sánchez *et al.*, 1999a).

L'organisateur isthmique est aussi capable d'induire l'expression *En2* dans les rhombomères 2 à 6 (Martínez

et al., 1995). Toutefois, dans ces cas, l'épithélium induit ne développe pas un mésencéphale ectopique mais un phénotype cérébelleux. De plus, nous avons montré que l'épithélium p1-p2, transplanté au niveau de la frontière mes-met, peut aussi exprimer *En2*. Dans ce cas, le devenir phénotypique du transplant semble en accord avec son site d'intégration, soit mésencéphalique soit cérébelleux (Bloch-Gallego *et al.*, 1996). Or, au niveau du rhombencéphale, les billes imprégnées de FGF8 ne semblent induire ni l'expression de *En2*, ni un phénotype cérébelleux (Martínez *et al.*, 1996).

L'ensemble de ces résultats indique qu'au stade HH10, un segment très large du tube neural aviaire, allant du prosomère 2 au rhombomère 6, est susceptible d'exprimer le gène *En2*. Néanmoins, son devenir phénotypique, mésencéphalique ou cérébelleux, dépend de sa position par rapport à la frontière *Otx2/Gbx2*. La possibilité que ces deux gènes puissent être impliqués dans ce choix phénotypique était donc fortement suggérée.

Confrontation des domaines *Otx2* et *Gbx2*

Nous avons voulu savoir (Hidalgo-Sánchez *et al.*, 1999b) si les transplants p1-p2, induits à développer un phénotype cérébelleux, perdent leur expression *Otx2*. Des greffes p1-p2 ont été placées à différents niveaux du territoire mes-met et ont été analysées pour l'expression *Otx2*, *Gbx2*, *En2*, *Pax2*, *Fgf8* et *Wnt1*, et pour son devenir phénotypique. Nous avons montré que : i) le greffon (exprimant *Otx2*) peut changer son devenir pré-somptif et développer un phénotype mes-met (Fig. 3) quand il est au contact du territoire cérébelleux exprimant le gène *Gbx2*. Aucun changement phénotypique n'est observé quand le greffon est confronté au neuroépithélium mésencéphalique ou à la toile choroïdienne qui recouvre le 4^e ventricule, deux territoires exprimant *Otx2*; ii) à la nouvelle frontière *Otx2/Gbx2*, créée au moment de la transplantation, une partie du greffon est induite à exprimer *Fgf8* et *Gbx2*; cette portion du greffon perd l'expression *Otx2*, ce qui déplace à l'intérieur du greffon la frontière *Otx2/Gbx2* créée expérimentalement. Les expressions *En2*, *Pax2* et *Wnt1* sont induites à l'intérieur du transplant de part et d'autre de la frontière *Otx2/Gbx2*, mimant ainsi l'expression génique qui s'observe dans le territoire mes-met normal. Aux stades embryonnaires tardifs, la région du greffon induite à exprimer *Gbx2*, *Fgf8*, *En2* et *Pax2*, dans laquelle le gène *Otx2* a été réprimé, adopte le phénotype cérébelleux, alors que la portion *Otx2*-positive, induite à exprimer *En2*, *Pax2* et *Wnt1*, mais pas *Gbx2* ni *Fgf8*, développe du mésencéphale. Il est très probable que la protéine FGF8, émanant des territoires rhombencéphaliques de l'hôte, soit impliquée dans le déclenchement de cette cascade, comme le suggèrent les expériences utilisant des billes imprégnées de ce facteur (Crossley *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1999). Toutefois, nos résultats montrent que la cascade n'a jamais lieu à la frontière entre deux territoires *Otx2*, même si celle-ci se trouve proche de l'anneau d'expression *Fgf8*, et elle peut s'étaler loin de cet anneau le long de l'interface *Otx2/Gbx2*. Les gènes

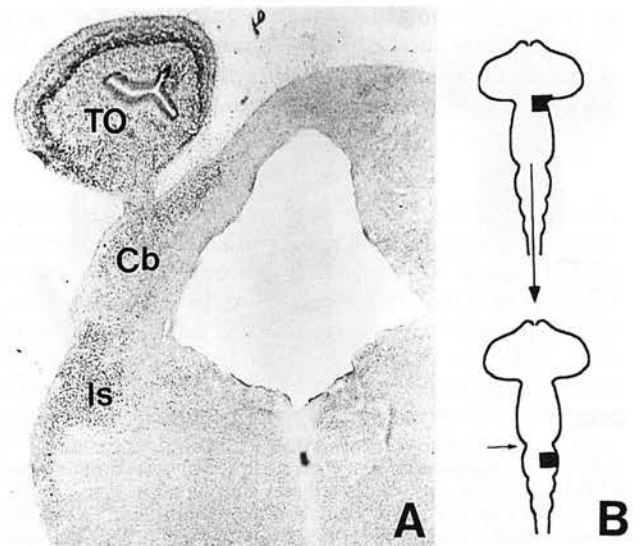


FIG. 3. – Différentiation phénotypique des prosomères 1-2 de Caille après transplantation dans le territoire cérébelleux du poulet.

A) Coupe d'embryon chimère au 12^e jour d'incubation colorée par l'anticorps QCPN, qui reconnaît les cellules de Caille. Le greffon, positif pour l'anticorps, a formé une structure mes-met caractéristique. Elle consiste en : i) une structure mésencéphalique, toit optique ectopique (TO), ii) une structure cérébelleuse (Cb), intégrée dans le cervelet hôte et iii) une structure isthmique (Is), intégrée dans la région isthmique de l'hôte.

B) Schéma de l'opération réalisée au stade HH10. En haut, le donneur et en bas, l'hôte. Le greffon et la région disséquée dans l'hôte sont en noir. Noter que la greffe a été placée caudalement à la constriction intramet (petite flèche), dans la portion caudale de l'ébauche cérébelleuse. A) $\times 48$.

Otx2 et *Gbx2* sont les premiers de la cascade à être exprimés (Bally-Cuif *et al.*, 1995; Shamin & Mason, 1998) et ils marquent, chez l'embryon normal, la frontière entre mésencéphale et cervelet (Hidalgo-Sánchez *et al.*, 1999a). Des données récentes, obtenues chez des souris mutantes ou transgéniques, montrent que ni le gène *Otx2* (Acampora *et al.*, 1997; Broccoli *et al.*, 1999) ni le gène *Gbx2* (Wassarman *et al.*, 1997; Millet *et al.*, 1999) ne sont absolument nécessaires pour induire l'expression *Fgf8*. Cependant, en accord avec nos données, les résultats de ces travaux montrent que le déplacement de la limite caudale du gène *Otx2* ou de la limite rostrale du gène *Gbx2* conditionnent la localisation des domaines d'expression des autres gènes de la cascade. Nous proposons donc que la confrontation de ces deux gènes soit essentielle comme organisateur phénotypique du territoire mes-met.

PERSPECTIVES

Les travaux que nous venons de présenter, réalisés à l'aide des chimères Caille/Poulet, ont permis de préciser l'organisation neuromérique de la frontière entre cerveaux moyen et postérieur. Nous avons montré que cette

frontière est marquée par la confrontation de deux facteurs de transcription exprimés précocement dans le tube neural, les gènes *Otx2* et *Gbx2*. Nos résultats suggèrent fortement que cette confrontation doit jouer un rôle essentiel dans le déclenchement de la cascade génique menant au phénotype mes-met et donc qu'elle puisse intervenir comme organisateur phénotypique de cette région. Deux points essentiels pour l'ontogenèse de la région mes-met sont ouverts par nos résultats. Tout d'abord, la constriction intramet, séparant deux portions de l'ébauche cérébelleuse, pourrait représenter une limite interneuromérique. Plusieurs données appuient cette hypothèse. D'une part, la couche des grains externes du cervelet a son origine dans la portion de l'ébauche cérébelleuse caudale à la constriction intramet (Hallonet *et al.*, 1990; Hallonet & Alvarado-Mallart, 1997; Wingate & Hatten, 1999). D'autre part, et en accord avec la définition des limites interneuromériques (Fraser *et al.*, 1990), Mathis *et al.* (1997) ont montré, chez des souris transgéniques, que les portions médio-rostrales ou latéro-caudales du cervelet proviennent de clones différents. Ces deux régions pourraient donc provenir d'unités morphogénétiques distinctes. Pour terminer, il nous semble essentiel de disséquer plus avant les mécanismes moléculaires impliqués dans le déclenchement de la cascade mes-met. Pour cela, il faudrait déterminer la nature des autres gènes partenaires ainsi que la chronologie de l'intervention de chacun d'entre eux.

Remerciements. – Nous remercions le Dr. Constantino SOTELO pour son soutien et ses suggestions tout au long de ce travail. M. H-S a été financé par la « Junta de Extremadura, Conserjería de Educacion y Juventud-Fondos Europeos, Espagne » et S. M. par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

BIBLIOGRAPHIE

- Acampora D., Avantaggiato V., Tuorto, F. & Simeone A., Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement. *Development*, 1997, 124, 3639-3650.
- Alvarez-Otero R., Sotelo C. & Alvarado-Mallart R.-M., Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells. *J. Comp. Neurol.*, 1993, 333, 597-615.
- Asano M. & Gruss P., *Pax-5* is expressed at the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Mech. Dev.*, 1992, 39, 29-39.
- Bally-Cuif L., Gulisano M., Broccoli V. & Boncinelli E., *c-otx-2* is expressed in two different phases of gastrulation and is sensitive to retinoic acid treatment in chick embryo. *Mech. Dev.*, 1995, 49, 49-63.
- Bloch-Gallego E., Millet S. & Alvarado-Mallart R.-M., Further observations on the susceptibility of diencephalic prosomeres to *En-2* induction and on the resulting histogenetic capabilities. *Mech. Dev.*, 1996, 58, 51-63.
- Broccoli V., Boncinelli E. & Wurst W., The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmus organizer. *Nature*, 1999, 401, 164-168.
- Bulfone A., Puelles L., Porteus M. H., Frohman M. A., Martin G. R. & Rubenstein J.L.R., Spatially restricted expression of *Dlx-1*, *Dlx-2* (*Tes-1*), *Gbx-2*, and *Wnt-3* in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J. Neurosci.*, 1993, 13, 3155-3172.
- Crossley P. H., Martinez S. & Martin G. M., Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature*, 1996, 380, 66-68.
- Crossley P. H. & Martin G. M., The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, 1995, 121, 439-451.
- Fraser S., Keynes R. & Lumsden A., Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restriction. *Nature*, 1990, 344, 431-435.
- Gardner C. A., Darnell D. K., Poole S. J., Ordhal C. P. & Barald K. F., Expression of an *engrailed*-like gene during development of the early embryonic chick nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 1988, 21, 426-437.
- Hallonet M. E. R. & Alvarado-Mallart R.-M., The chick/quail chimeric system: a model for early cerebellar development. In: *The cerebellum: a model for construction of a cortex*. (ed. Lauder J. & Prochiantz A.), 1997, pp. 17-31. Gordon & Breach Scien. Publ. Persp. Dev. Neurobiol.
- Hallonet M. E. R. & Le Douarin N. M., Tracing neuroepithelial cells of the mesencephalic and metencephalic alar plates during cerebellar ontogeny in quail-chick chimeras. *Eur. J. Neurosci.*, 1993, 5, 1145-1155.
- Hallonet M. E. R., Teillet M. A. & Le Douarin N. M., A new approach to the development of cerebellum provided by the chick/quail marker system. *Development*, 1990, 108, 19-31.
- Hamburger V. & Hamilton H. L., A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 1951, 88, 49-92.
- Hidalgo-Sánchez M., Millet S., Simeone A. & Alvarado-Mallart R.-M., Comparative analysis of *Otx2*, *Gbx2*, *Pax2*, *Fgf8* and *Wnt1* gene expressions during the formation of the midbrain/hindbrain domain. *Mech. Dev.*, 1999a, 81, 59-62.
- Hidalgo-Sánchez M., Simeone A. & Alvarado-Mallart R.-M., *Fgf8* and *Gbx2* induction concomitant with *Otx2* repression is correlated with midbrain/hindbrain fate of caudal prosencephalon. *Development*, 1999b, 126, 3191-3203.
- Keynes R. & Lumsden A., Segmentation and the origin of regional diversity in the vertebrate central nervous system. *Neuron*, 1990, 2, 1-19.
- Le Douarin N. M., Particularités du noyau interphasique chez la caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*). Utilisation de ces particularités comme marquage biologique dans les recherches. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1969, 10, 435-452.
- Marin F. & Puelles L., Patterning of the embryonic avian midbrain after experimental inversions: a polarizing activity from the isthmus. *Dev. Biol.*, 1994, 167, 19-37.
- Martinez S. & Alvarado-Mallart R.-M., Rostral cerebellum originates from the caudal portion of the so-called "mesencephalic" vesicle: a study using chick/quail chimeras. *Eur. J. Neurosci.*, 1989, 1, 549-560.
- Martinez S., Wassef M. & Alvarado-Mallart R.-M., Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron*, 1990, 6, 971-981.
- Martinez S., Marin F., Nieto M. A. & Puelles L., Induction of ectopic *engrailed* expression and fate change in avian rhombomeres: intersegmental boundaries as barriers. *Mech. Dev.*, 1995, 51, 289-303.
- Martinez S., Crossley P. H., Cobos I., Rubenstein J. L. R. & Martin G. R., FGF8 induces formation of an ectopic isthmus organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development*, 1999, 126, 1189-1200.
- Mathis L., Bonnerot, C., Puelles L. & Nicolas J. F., Retrospective clonal analysis of the cerebellum using genetic *lacZ/lacZ* mouse mosaics. *Development*, 1997, 124, 4089-4104.

- McMahon A. P. & Bradley A., The *wnt-1* (*int-1*) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 1990, 69, 581-595.
- Millet S. & Alvarado-Mallart R.-M., Expression of the homeobox-containing gene *En-2* during the development of the chick central nervous system. *Eur. J. Neurosci.*, 1995, 7, 777-791.
- Millet S., Bloch-Gallego E., Simeone A. & Alvarado-Mallart R.-M., The caudal limit of *Otx2* gene expression as a marker of the midbrain-hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotopic grafts. *Development*, 1996, 122, 3785-3797.
- Millet S., Campbell K., Epstein D. J., Losos K., Harris E. & Joyner A. L., A role for *Gbx2* in repression of *Otx2* and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature*, 1999, 401, 161-164.
- Orr H., Contribution to the embryology of the lizard. *J. Morphol.*, 1887, 1, 311-372.
- Puelles L. & Rubenstein J. L. R., Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.*, 1993, 16, 472-479.
- Rubenstein J. L. R., Martínez S., Shimamura K. & Puelles L., The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science*, 1994, 266, 578-580.
- Ristoratore F., Carl M., Deschet K., Richard-Parpaillon L., Boujard D., Wittbrodt J., Chourrout D., Bourrat F. & Joly, J.-S., The midbrain-hindbrain boundary genetic cascade is activated ectopically in the diencephalon in response to the widespread expression of one of its components, the medaka *Ol-eng2*. *Development*, 1999, 126, 3769-3779.
- Shamin H. & Mason I., Expression of *Gbx2* during early development of the chick embryo. *Mech. Dev.*, 1998, 76, 157-159.
- Simeone A., Acampora D., Massino G., Stornaiuolo A. & Boncinelli E., Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature*, 1992, 358, 687-690.
- Vaage S., The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological histochemical and autoradiographic investigation. In: *Advances in Anat., Embryol. and Cell Biol.* (ed. Brodal H. O. H. et al.), 1973, pp. 5-21. Berlin, Springer-verlag.
- von Bubnoff A., Schmidt J. E. & Kimelman D., The *Xenopus laevis* homeobox gene *Xgbx-2* is an early marker of antero-posterior patterning in ectoderm. *Mech. Dev.*, 1995, 54, 149-160.
- Wassarman K. M., Lewandoski M., Campbell K., Joyner A. L., Rubenstein J. L. R., Martínez S. & Martin G. R., Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function. *Development*, 1997, 124, 2923-2934.
- Wilkinson D. G. & Krumlauf R., Molecular approaches to the segmentation of the hindbrain. *Trends Neurosci.*, 1990, 13, 335-339.
- Wingate J. T. & Hatten M. E. The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development*, 1999, 127, 4395-4404.