



**HAL**  
open science

# Structure et Evolution du Génome Mitochondrial des Oniscidea (Crustacea, Isopoda)

V. Doublet

► **To cite this version:**

V. Doublet. Structure et Evolution du Génome Mitochondrial des Oniscidea (Crustacea, Isopoda).  
Ecologie, Environnement. Université de Poitiers, 2010. Français. NNT: . tel-00586370

**HAL Id: tel-00586370**

**<https://theses.hal.science/tel-00586370>**

Submitted on 15 Apr 2011

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

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

Université de Poitiers  
Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées  
Ecole Doctorale Gay Lussac

## **THÈSE**

Pour l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Université de Poitiers**  
(Diplôme National – Arrêté du 25 avril 2002)

**Spécialité : Biologie des Organismes**

Présentée par

Vincent DOUBLET

# **Structure et Evolution du Génome Mitochondrial des Oniscidea (Crustacea, Isopoda)**

Directrice de thèse : Catherine SOUTY-GROSSET

Co-directrice de thèse : Isabelle MARCADÉ

Soutenue le 24 mars 2010  
devant la Commission d'Examen :

## **JURY**

L. MARÉCHAL-DROUARD	Directrice de Recherche CNRS, IBMP Strasbourg	Rapporteur
N. GALTIER	Directeur de Recherche, Université de Montpellier II	Rapporteur
P. LOPEZ	Maître de Conférences, Université Paris IV	Examineur
D. BOUCHON	Professeur, Université de Poitiers	Examineur
C. SOUTY-GROSSET	Chargée de Recherche CNRS, Université de Poitiers	Directrice
I. MARCADÉ	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Co-directrice

---

## Sommaire

<b>I.</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Synthèse bibliographique</b>	<b>5</b>
<b>A.</b>	<b><i>Les génomes mitochondriaux</i></b>	<b>5</b>
1.	<i>Les génomes mitochondriaux : tailles et formes</i>	5
2.	<i>Les génomes mitochondriaux des Métazoaires</i>	8
3.	<i>La transmission maternelle de l'ADNmt</i>	10
4.	<i>La recombinaison dans les génomes mitochondriaux des Métazoaires</i>	12
5.	<i>L'hétéroplasmie chez les Métazoaires</i>	12
<b>B.</b>	<b><i>Les Crustacés Isopodes terrestres</i></b>	<b>15</b>
1.	<i>Les Oniscidea : Crustacés Isopodes terrestres</i>	15
2.	<i>Wolbachia pipientis, parasite de la reproduction</i>	18
3.	<i>Influence de Wolbachia sur la diversité mitochondriale des Oniscidea</i>	20
4.	<i>Présence d'autres parasites de la reproduction chez les Oniscidea</i>	21
<b>C.</b>	<b><i>Etat des connaissances sur l'ADN mitochondrial des Crustacés : le cas particulier des Isopodes</i></b>	<b>21</b>
1.	<i>La taille des génomes mitochondriaux de Crustacés</i>	21
2.	<i>La composition génique des génomes</i>	22
3.	<i>La région de contrôle chez les Crustacés</i>	24
4.	<i>Le génome mitochondrial atypique d'Armadillidium vulgare</i>	24
5.	<i>L'ADNmt atypique est-il présent seulement chez A. vulgare ?</i>	28
<b>III.</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>29</b>
<b>A.</b>	<b><i>Matériel biologique</i></b>	<b>29</b>
<b>B.</b>	<b><i>Protocoles d'extraction d'ADN et d'ARN</i></b>	<b>29</b>
1.	<i>Dissection des animaux</i>	29
2.	<i>Extraction d'ADN total</i>	29
3.	<i>Extraction d'ADN mitochondrial</i>	29
4.	<i>Extraction d'ARN</i>	31
<b>C.</b>	<b><i>Protocole de RFLP et Southern Blot</i></b>	<b>33</b>
1.	<i>Digestion de l'ADNmt</i>	33
2.	<i>Dénaturation des produits de digestion</i>	33

3.	<i>Electrophorèses et Southern Blot</i>	34
<b>D.</b>	<b><i>Amplification d'ADN et séquençage</i></b>	<b>35</b>
1.	<i>Amplification par PCR</i>	35
2.	<i>Amplification par RT-PCR</i>	35
3.	<i>Clonage</i>	36
4.	<i>Séquençage</i>	36
<b>E.</b>	<b><i>Utilisation de programmes bioinformatiques</i></b>	<b>36</b>
1.	<i>Analyses des séquences nucléotidiques</i>	36
2.	<i>Programmes de recherche d'ARNt : tRNAscan-SE et ARWEN</i>	36
3.	<i>Programme de prédiction de code génétique : GenDecoder</i>	37
4.	<i>Programme de recherche de structures secondaires : RNAfold</i>	37
<b>IV.</b>	<b>Structure et évolution du génome mitochondrial atypique d'<i>Armadillidium vulgare</i> (Isopoda, Crustacea)</b>	<b>38</b>
<b>A.</b>	<b><i>Organisation et composition de la région codante de l'ADNmt d'A. vulgare</i></b>	<b>38</b>
1.	<i>Structure and Evolution of the Atypical Mitochondrial Genome of <i>Armadillidium vulgare</i> (Isopoda, Crustacea) - Marcadé et al. (2007) J. Mol. Evol. 65:651-659</i>	38
2.	<i>Résultats complémentaires sur la région codante de l'ADNmt</i>	50
3.	<i>Recherche des gènes d'ARNt dans le génome mitochondrial</i>	54
<b>B.</b>	<b><i>La région de contrôle de l'ADNmt d'A. vulgare</i></b>	<b>65</b>
1.	<i>Séquençage de la région de contrôle</i>	65
2.	<i>Recherche des petits motifs répétés</i>	69
3.	<i>Recherche de l'origine de réplication</i>	71
4.	<i>Linéarisation et dimérisation du génome atypique</i>	73
5.	<i>Orientation de l'origine de réplication</i>	74
<b>C.</b>	<b><i>Conclusions</i></b>	<b>77</b>
<b>V.</b>	<b>Découverte de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>, un gène « deux en un »</b>	<b>78</b>
<b>A.</b>	<b><i>A Thirty Million Year-Old Inherited Heteroplasmy – Doublet et al. (2008) PLoS ONE e2938</i></b>	<b>78</b>
<b>B.</b>	<b><i>Résultats complémentaires</i></b>	<b>83</b>
1.	<i>Le code génétique mitochondrial d'A. vulgare</i>	83
2.	<i>Structure secondaire de l'ARNt bivalent</i>	85



<b>C. <i>Avancées récentes des travaux</i></b>	<b>87</b>
1. <i>Expression des ARNt Alanine et Valine chez A. vulgare</i>	87
2. <i>Identités des ARNt Alanine et Valine</i>	87
<b>D. <i>Conclusions</i></b>	<b>94</b>
<b>VI. <i>Distribution de l'ADNmt atypique et évolution de sa synténie</i></b>	<b>95</b>
<b>A. <i>Une large répartition de l'ADN mitochondrial atypique</i></b>	<b>95</b>
1. <i>Widespread of the atypical mtDNA structure in Isopods (Crustacea, Peracarida): a possible way of heteroplasmy transmission - Doublet et al. (in prep. - Genetics)</i>	95
2. <i>Résultats de southern-blot</i>	115
<b>B. <i>Influence de Wolbachia sur la propagation de l'ADNmt atypique</i></b>	<b>117</b>
<b>C. <i>Résultats préliminaires sur la synténie de l'ADNmt des Oniscidea</i></b>	<b>119</b>
1. <i>Conservation de l'ordre des gènes dans les génomes atypiques</i>	119
2. <i>Mécanismes des réarrangements de l'ordre des gènes</i>	122
<b>D. <i>Conclusions</i></b>	<b>125</b>
<b>VII. <i>Reconstruction de l'histoire évolutive de l'ADNmt atypique des Oniscidea</i></b>	<b>126</b>
<b>A. <i>Apparition du génome mitochondrial atypique</i></b>	<b>126</b>
<b>B. <i>Nouvelle organisation du génome</i></b>	<b>129</b>
<b>C. <i>Apparition d'une hétéroplasmie : l'ARNt<sup>Ala/Val</sup></i></b>	<b>129</b>
1. <i>Une hétéroplasmie stable</i>	129
2. <i>Des conditions réunies pour la formation d'un ARNt bivalent</i>	131
<b>D. <i>Les dimères d'ADNmt catalyseurs de réarrangements ?</i></b>	<b>132</b>
<b>VIII. <i>Conclusion &amp; perspectives</i></b>	<b>134</b>
<b>IX. <i>Références bibliographiques</i></b>	<b>137</b>
<b>X. <i>Annexes</i></b>	<b>168</b>

### *Liste des abréviations*

aaRS : aminoacyl-ARNt synthétase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNmt : ADN mitochondrial

AlaRS : Alanyl-ARNt synthétase

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine TriPhosphate

*Atp6* et *8* : gènes du complexe ATPase

*Cox1* à *3* : gènes du cytochrome oxydase c

*Cytb* : gène du cytochrome b

kb : kilobases

pb : paire de base

*Nad1* à *6* et *4L* : gènes du complexe NADH deshydrogenase

PCR : Polymerase Chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

RT-PCR : Reverse Transcriptase-PCR

ssDNA : single-strand DNA = ADN simple brin

## *Liste des figures et des tableaux*

<b>Figure II-1</b> : Variation de taille et contenu génique des génomes mitochondriaux.	p. 7
<b>Figure II-2</b> : Exemple de génome mitochondrial de Métazoaire : l'ADNmt de l'homme.	p. 7
<b>Figure II-3</b> : Relations phylogénétiques des différents sous-ordres des Isopodes.	p. 14
<b>Figure II-4</b> : Phylogénies et émergence des Oniscidea.	p. 17
<b>Figure II-5</b> : Origines de réplication de l'ADNmt de trois Crustacés et de la drosophile.	p. 23
<b>Figure II-6</b> : Représentation schématique de la structure atypique du génome mitochondrial d' <i>A. vulgare</i> .	p. 25
<b>Figure II-7</b> : Modèles de formation de dimères d'ADN circulaires et palindromiques.	p. 25
<b>Figure II-8</b> : Cartes des génomes mitochondriaux des Isopodes <i>Ligia oceanica</i> et <i>Idotea baltica</i> .	p. 27
<b>Tableau III-1</b> : Espèces d'Isopodes utilisées dans ce travail.	p. 30
<b>Figure III-1</b> . Interprétation des profils de restriction de l'ADNmt atypique d' <i>A. vulgare</i> .	p. 32
<b>Figure III-2</b> . Dénaturation du produit de digestion d'ADNmt atypique.	p. 32
<b>Figure IV-1</b> : Profils de restriction de l'ADNmt de mâles <i>A. vulgare</i> à partir de différents tissus.	p. 49
<b>Figure IV-2</b> : PCR-RFLP réalisées sur l'ARNt bivalent Alanine/Valine de différents individus d' <i>A. vulgare</i> .	p. 51
<b>Figure IV-3</b> : Exemple de chromatogrammes <i>forward</i> (A) et <i>reverse</i> (B) sur l'ARNt <sup>Ala/Val</sup> chez <i>A. vulgare</i> .	p. 51
<b>Figure IV-4</b> : PCR-RFLP réalisées sur l'ARNt bivalent Alanine/Valine, à partir de différents tissus.	p. 53
<b>Figure IV-5</b> : Structures secondaires de l'ARNt <sup>Pro</sup> et de l'ARNt <sup>Ala/Val</sup> obtenues avec tRNAscan-SE.	p. 55
<b>Figure IV-6</b> : Structures secondaires des ARNt d' <i>A. vulgare</i> obtenues avec le programme ARWEN.	p. 58
<b>Figure IV-7</b> : Cartographie de l'unité monomérique qui compose l'ADNmt d' <i>A. vulgare</i> .	p. 60
<b>Tableau IV-1</b> : Bilan des RT-PCR réalisées sur les ARNt du génome mitochondrial d' <i>A. vulgare</i> .	p. 62
<b>Figure IV-8</b> : RT-PCR sur les ARNt <sup>Tyr</sup> , ARNt <sup>Pro</sup> , ARNt <sup>Thr</sup> et ARNt <sup>Phe</sup> chez <i>A. vulgare</i> .	p. 62
<b>Figure IV-9</b> : Séquence de la région de contrôle du génome mitochondrial d' <i>A. vulgare</i> .	p. 68
<b>Figure IV-10</b> : Simulation de structure secondaire de la région de contrôle du génome d' <i>A. vulgare</i> .	p. 70
<b>Figure IV-11</b> : Formation de molécules linéaires à partir de molécules circulaires, d'après Lin <i>et al.</i> (1997).	p. 72
<b>Figure IV-12</b> : Fréquence des nucléotides du brin lourd de l'ADNmt d' <i>A. vulgare</i> .	p. 75
<b>Figure IV-13</b> : Comparaison des GC-skews des gènes codant d' <i>A. vulgare</i> , <i>L. oceanica</i> et <i>I. baltica</i> .	p. 75
<b>Figure V-1</b> : Analyse du code génétique mitochondrial d' <i>A. vulgare</i> avec le programme GenDecoder.	p. 84
<b>Figure V-2</b> : Comparaison entre les bases conservées des ARNt mitochondriaux et l'ARNt bivalent d' <i>A. vulgare</i> .	p. 86
<b>Figure V-3</b> : RT-PCR sur l'ARNt bivalent Alanine/Valine d' <i>A. vulgare</i> .	p. 86
<b>Tableau V-1</b> : Résultats de séquençages des produits de RT-PCR sur l'ARNt <sup>Ala/Val</sup> d' <i>A. vulgare</i> .	p. 86
<b>Figure V-4</b> : Comparaison de séquences des bras accepteurs d'ARNt <sup>Ala</sup> .	p. 89
<b>Figure V-5</b> : Conservation des bases nucléotidiques de l'ARNt <sup>Ala</sup> mitochondrial des Crustacés Pécaricides.	p. 92
<b>Figure VI-1</b> : Southern blot-RFLP de l'ADNmt des espèces <i>P. hoffmannseggii</i> , <i>P. caudatus</i> , <i>T. tomentosa</i> et <i>H. couchii</i> .	p. 114
<b>Figure VI-2</b> : Southern blot-RFLP de l'ADNmt de <i>C. elongata</i> .	p. 114
<b>Figure VI-3</b> : Southern blot-RFLP de l'ADNmt de <i>P. muscorum</i> .	p. 114
<b>Figure VI-4</b> : Southern blot-RFLP de l'ADNmt de <i>S. serratum</i> .	p. 115
<b>Tableau VI-1</b> : Statuts d'infection par <i>Wolbachia</i> des espèces d'Isopodes.	p. 116
<b>Tableau VI-2</b> : Etude de la synténie mitochondriale des Oniscidea.	p. 120
<b>Figure VI-5</b> : Exemple d'amplification PCR sur une portion du génome mitochondrial.	p. 120
<b>Figure VI-6</b> : Représentation schématique du réarrangement génique observé chez un <i>Oniscus sp.</i>	p. 123
<b>Figure VII-1</b> : Reconstruction de l'histoire évolutive de l'ADNmt des Oniscidea.	p. 127

## I. Introduction

L'une des étapes les plus importantes de l'évolution des Eucaryotes fut l'acquisition de la mitochondrie. Cette organelle, au centre du métabolisme cellulaire, approvisionne les cellules en énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate) via la phosphorylation oxydative, contrôle l'homéostasie de la cellule en calcium ou encore génère la biosynthèse des hormones stéroïdes (Mukhin *et al.* 1989; Saraste 1999; Nicholls 2005). C'est également la mitochondrie qui commande l'apoptose (la mort cellulaire), phénomène des plus importants dans l'organisation des êtres pluricellulaires (Green & Reed 1998; Oberst *et al.* 2008).

C'est une  $\alpha$ -protéobactérie, symbiotique des premières cellules eucaryotes, et secondairement intégrée dans le cytoplasme, qui est à l'origine des mitochondries (Margulis 1981; Andersson *et al.* 1998; Gray *et al.* 1999; 2001). Il est maintenant reconnu que cette acquisition de la mitochondrie ne s'est produite qu'une seule fois (Gray *et al.* 2001; Fitzpatrick *et al.* 2006). En d'autres termes, une seule  $\alpha$ -protéobactérie est à l'origine de l'ensemble des mitochondries présentes chez les Eucaryotes. De cette origine bactérienne, les mitochondries en ont gardé un génome qui leur est propre et dont le code génétique est différent de celui des cellules hôtes. Cet ADN mitochondrial (ADNmt) est en général identique dans toutes les mitochondries de toutes les cellules d'un même individu. Ce génome ne contient toutefois qu'un nombre réduit de gènes, en comparaison aux  $\alpha$ -protéobactéries à vie libre et proches parentes des mitochondries. Cette réduction du génome est la marque d'une symbiose avancée : c'est le résultat d'un transfert d'un grand nombre de gènes mitochondriaux dans le génome nucléaire de ses hôtes. Ces gènes, nécessaires au fonctionnement de la mitochondrie, sont alors importés du génome nucléaire vers les mitochondries sous leur forme protéique (Adams & Palmer 2003). Néanmoins, certains gènes restent encodés par les mitochondries, soit parce que leur forme protéique ne peut pas être importée, soit parce qu'il est nécessaire que leur expression se fasse très rapidement au sein de l'organelle (Race *et al.* 1999).

Malgré l'origine unique des mitochondries, l'ADNmt ne se présente pas sous la même forme selon que l'on étudie les plantes, les champignons, les unicellulaires ou les animaux (Gray *et al.* 1999; Burger *et al.* 2003b; Nosek & Tomáška 2003). Les formes, les tailles et les compositions géniques des génomes mitochondriaux sont très variables entre tous ces Eucaryotes. En effet, l'ADNmt des plantes est généralement de grande taille (de l'ordre de plusieurs centaines de kilobases) et composé à 90% de zones non codantes, alors que chez les

unicellulaires ou les animaux, il est généralement plus petit et plus compact. Mais au sein de cette grande diversité, il existe un groupe pour lequel il est observé très peu de variations de taille, de composition et de forme : ce sont les animaux pluricellulaires, appelés Métazoaires.

Le génome mitochondrial des Métazoaires est ordinairement constitué de 37 gènes, participant à la phosphorylation oxydative ou à la traduction en protéines des gènes mitochondriaux. Ces gènes sont concentrés dans une molécule d'ADN monomérique (unité fondamentale) double brin, compacte, de forme circulaire et d'une taille de 15 à 20 kilobases (kb), relativement réduite en comparaison aux autres organismes eucaryotes (Wolstenholme 1992; Boore 1999).

Depuis le séquençage complet du premier génome mitochondrial, qui fut celui de l'homme en 1981 (Anderson *et al.*), il n'a été observé que très peu de variations de forme chez les Métazoaires. Ces autres formes, relativement rares, sont de vraies exceptions à la règle. C'est le cas de certains Cnidaires du groupe des Médusozoa, taxon à la base de la phylogénie des Métazoaires, qui sont les seuls animaux à présenter un génome mitochondrial exclusivement linéaire, parfois divisé en plusieurs parties (Shao *et al.* 2006; Kayal & Lavrov 2008; Voigt *et al.* 2008). D'autres exceptions parmi les animaux présentent des génomes mitochondriaux organisés en plusieurs chromosomes portant des gènes différents. Cela a été décrit chez quelques organismes non apparentés : le pluricellulaire primitif *Dyciema japonica* (Watanabe *et al.* 1999; Awata *et al.* 2005), les nématodes du genre *Globodera* (Armstrong *et al.* 2000; Gibson *et al.* 2007) et le Rotifère *Brachionus plicatilis* (Suga *et al.* 2008), qui présentent différentes molécules circulaires dans leur ADNmt. Enfin, une dernière exception a été révélée chez deux Crustacés terrestres (Isopode, Oniscidea), *Armadillidium vulgare* et *Porcellionides pruinosus*, chez lesquels il a été décrit un ADNmt original présentant des molécules linéaires monomériques, associées à des molécules circulaires dimériques (Marcadé *et al.* 1999; Raimond *et al.* 1999).

Ce génome mitochondrial atypique des Crustacés terrestres a été découvert au sein du laboratoire d'Ecologie Evolution Symbiose (UMR 6556) de l'Université de Poitiers. Ce laboratoire, dont le principal modèle biologique est l'Isopode terrestre *Armadillidium vulgare*, s'est spécialisé dans les relations symbiotiques suite à la découverte d'une bactérie endosymbiotique féminisante hébergée par cette espèce (Martin *et al.* 1973; Juchault *et al.* 1994). Ces bactéries du genre *Wolbachia* qui, comme les mitochondries, se transmettent maternellement, inhibent la formation des organes sexuels mâles et permettent ainsi le développement d'organes sexuels femelles chez des individus génétiquement mâles (Juchault & Legrand 1985).

C'est en étudiant l'influence de ces bactéries sur la variabilité génétique mitochondriale des populations d'*Armadillidium vulgare* que cet ADNmt atypique a été découvert. Dans un premier temps, ce génome avait été décrit avec une taille anormalement élevée (30 ~ 35 kb) par Souty-Grosset *et al.* (1992). Puis Raimond *et al.* (1999) ont détaillé sa structure qui est composée de deux types moléculaires : des monomères et des dimères. Pour cela, plusieurs approches avaient été utilisées : (i) l'observation de profils de digestion (simple ou double) de l'ADNmt par des enzymes de restriction ; (ii) l'observation de profils de digestion dénaturés à la chaleur ; (iii) l'étude en spectrométrie des fragments issus des molécules monomériques et dimériques ; ainsi que (iv) l'observation de l'ADNmt en microscopie électronique.

Le but du présent travail est de continuer les investigations sur ce génome mitochondrial atypique, en s'inscrivant dans le travail de description génétique de l'hôte, dans la relation symbiotique Isopodes terrestres – *Wolbachia*. En bénéficiant des avancées techniques en biologie moléculaire, notamment en termes de séquençage, les objectifs sont de définir les particularités de ce génome atypique et d'en comprendre son évolution. Il apparaît fondamental, face à l'étonnante homogénéité de l'ADNmt des Métazoaires, d'en étudier en détail les exceptions, afin de comprendre quelles pressions agissent sur ces génomes mitochondriaux.

Dans ce contexte, les deux objectifs principaux abordés ici sont (i) de rechercher les causes et les conséquences de l'apparition de cet ADNmt atypique, et (ii) de comprendre celles de son maintien. En s'appuyant sur une importante littérature sur les génomes mitochondriaux des Métazoaires, différentes questions ont été posées :

- Ce génome atypique est-il la conséquence d'une duplication ou d'une triplication ?
- Comment ont évolué les différentes copies de gènes ?
- Quel(s) avantage(s) apporte cette conformation atypique ?
- Existe-t-il des gènes ou des structures caractéristiques de ces génomes ?

Dans ce présent travail, après une présentation des génomes mitochondriaux des Métazoaires, ainsi qu'une synthèse de l'état des connaissances acquises sur le modèle de cette étude, trois axes principaux de recherche seront développés pour répondre à ces questions :

1. la structure et l'organisation du génome mitochondrial atypique, avec comme modèle la séquence du génome mitochondrial complet d'*Armadillidium vulgare*. Ce séquençage a apporté des informations sur le nombre et l'ordre des gènes, la structure de la principale région non-codante et la composition nucléotidique du

génomique atypique. À partir de ces données, la formation des dimères ainsi que la transmission du génome atypique seront discutées.

2. l'étude de la répartition au sein des Oniscidea, de la transmission et de la fonctionnalité d'un gène d'ARN de transfert (ARNt) bivalent alloaccepteur pour deux acides aminés, découvert lors du séquençage de l'ADNmt d'*A. vulgare*.
3. la distribution de ce génome mitochondrial atypique parmi les Crustacés Isopodes et sa relation avec l'ARNt bivalent et la présence de *Wolbachia*, ainsi que les variations dans l'ordre des gènes mitochondriaux chez les Oniscidea.

Une discussion finale retracera l'évolution du génome mitochondrial des Isopodes, avec comme groupe principal d'étude le sous-ordre des Oniscidea.

## II. Synthèse bibliographique

Les mitochondries proviennent d'une  $\alpha$ -protéobactérie intégrée dans le cytoplasme des premières cellules à noyau : les Eucaryotes (Margulis 1981; Andersson *et al.* 1998; Gray *et al.* 1999; 2001). Ce sont les « centrales énergétiques » de ces cellules qui leur apportent l'énergie sous forme d'ATP via la phosphorylation oxydative (Saraste 1999). De cette origine bactérienne, les mitochondries ont gardé leur indépendance génétique : le génome mitochondrial. Il se décline sous différentes formes que nous allons découvrir dans ce chapitre.

### A. Les génomes mitochondriaux

Le génome mitochondrial exerce le même rôle chez tous les organismes Eucaryotes : il encode un petit nombre de gènes indispensables au fonctionnement de la mitochondrie (Gray *et al.* 1999). Malgré l'importance de ces gènes, ils ne représentent seulement que 1% des protéines utilisées par les mitochondries. Tous les autres gènes nécessaires au fonctionnement de la mitochondrie résident dans le génome nucléaire des cellules hôtes, et leurs produits sont importés du noyau vers les mitochondries : c'est le cas de nombreuses protéines (Adams & Palmer 2003; Wiedemann *et al.* 2004; Mokranjac & Neupert 2005; Neupert & Herrmann 2007), et parfois de petits ARN, spécialement d'ARN de transfert (ARNt ; Schneider & Maréchal-Drouard 2000; Salinas *et al.* 2008). Le nombre de gènes perdus par les mitochondries est estimé à plusieurs milliers en comparaison aux  $\alpha$ -protéobactéries à vie libre. Les mitochondries ne portent que 40 à 50 gènes en moyenne chez les Eucaryotes (Andersson *et al.* 1998; Burger *et al.* 2003b). Cette réduction massive du nombre de gènes et de la taille du génome permet aux mitochondries de transcrire et de répliquer l'ensemble de leurs gènes beaucoup plus rapidement et de réaliser ainsi une forte économie d'énergie, marque d'une symbiose ancienne (Attardi 1985; Emelyanov 2003). Cette réduction de la taille du génome est également caractérisée par la réduction de la taille des gènes mitochondriaux par rapport à leurs homologues présents dans les  $\alpha$ -protéobactéries à vie libre (Schneider & Ebert 2004).

#### 1. Les génomes mitochondriaux : tailles et formes

Bien que la fonction du génome mitochondrial soit conservée au sein des Eucaryotes, l'ADNmt se présente sous des aspects très variés selon les groupes. L'origine bactérienne de la mitochondrie a longtemps conduit à des *a priori* sur la forme de la molécule d'ADNmt.



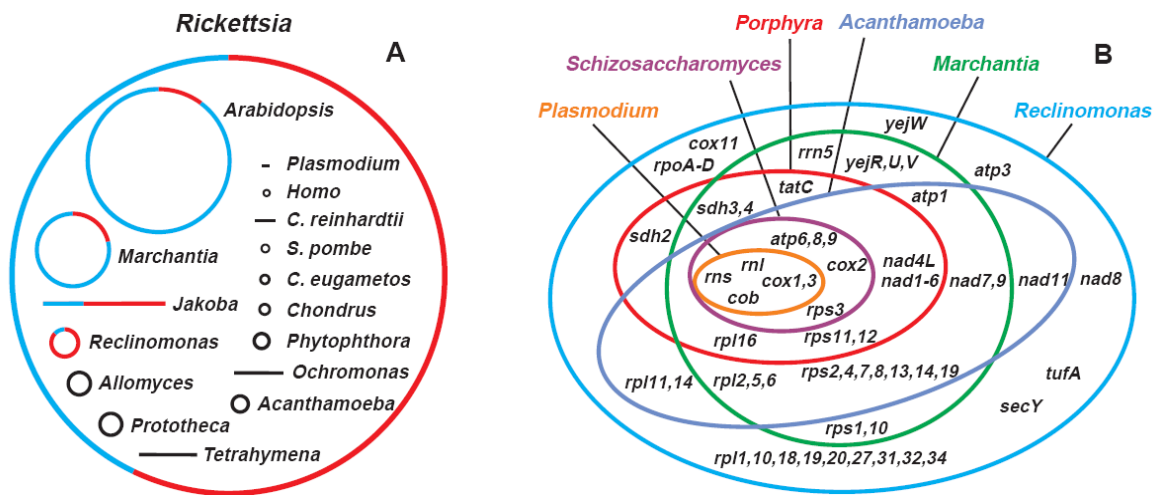
Pendant de nombreuses années, les molécules d'ADNmt ont été décrites sous la forme circulaire et monomérique, et les observations de formes linéaires chez certains organismes étaient généralement interprétées comme des erreurs de préparation et de manipulation de l'ADN (Bendich 1996; Nosek & Tomáška 2003). Ce n'est que récemment qu'il a été reconnu l'existence d'une forte diversité de structure des génomes mitochondriaux. Il est désormais admis que la majorité des Eucaryotes portent un ADNmt linéaire. Ces molécules linéaires se retrouvent tout particulièrement chez les plantes, les champignons et les unicellulaires, que ce soit sous la forme monomérique ou multimérique (Bendich 1993; 1996; Nosek *et al.* 1998; Williamson 2002; Nosek & Tomáška 2003; Gray *et al.* 2004). Certains taxons ont de plus la particularité de présenter des formes circularisées en association avec des formes linéaires : c'est le cas des plantes où coexistent ordinairement plusieurs types moléculaires, dont une molécule circulaire monomérique nommée « master chromosome », ainsi que des petits plasmides de tailles et de formes variables (Backert *et al.* 1997; Fauron *et al.* 2004; Handa 2008; Kubo & Newton 2008). Un des exemples les plus cités est celui de l'hépatique *Marchantia polymorpha*, où il a été observé la présence de molécules linéaires concaténées (branchées les unes à la suite des autres, par liaisons « tête-queue ») ainsi que des molécules circulaires monomériques en très faible quantité (Oldenburg & Bendich 1998; 2001).

Chez les unicellulaires et les champignons, de nombreuses variantes ont également été observées. Ces différentes organisations d'ADNmt peuvent être résumées ainsi :

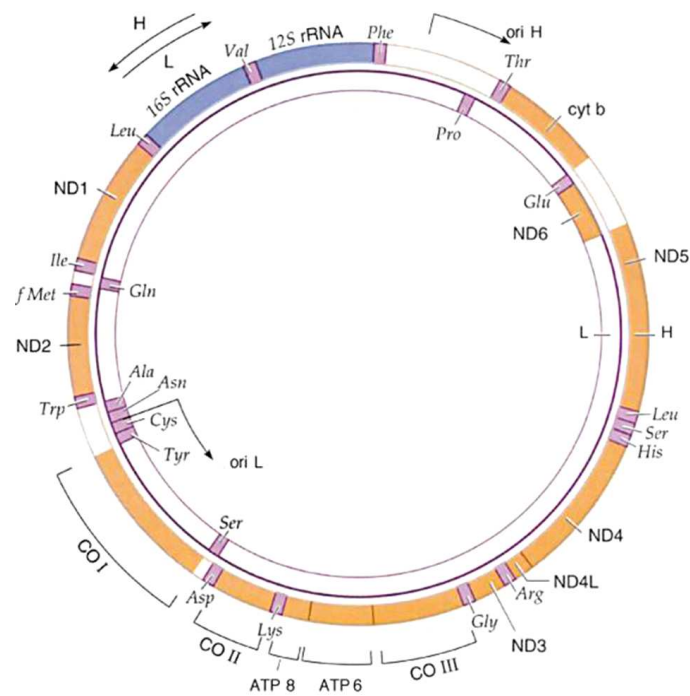
(i) des molécules linéaires monomériques seules, observées chez des levures (Wesolowski & Fukuhara 1981; Fukuhara *et al.* 1993; Nosek *et al.* 1995; Forget *et al.* 2002), des unicellulaires (Suyama & Miura 1968; Goddard & Cummings 1975; Gilson *et al.* 1995; Martin 1995; Gray *et al.* 1998; Burger *et al.* 2000; Sesterhenn *et al.* 2010; Hikosaka *et al.* in press) et des algues vertes unicellulaires (Ryan *et al.* 1978; Vahrenholz *et al.* 1993; Smith & Lee 2008).

(ii) un génome multipartite, scindé en plusieurs parties portant différents gènes. C'est le cas de l'amibe *Amoebidium parasiticum* ainsi que de l'algue verte unicellulaire *Polytomella parva* qui présentent des génomes composés de plusieurs molécules de tailles différentes, linéaires pour le premier (Burger *et al.* 2003a), et circulaires pour le second (Fan & Lee 2002). C'est également le cas des unicellulaires Euglenozoa dont l'ADNmt est composé d'un réseau de milliers de cercles de différentes tailles (Lukeš *et al.* 2002; Marande & Burger 2007; Roy *et al.* 2007).

(iii) un génome « mixte », composé de plusieurs types moléculaires portant les mêmes gènes. C'est le cas de plusieurs espèces de levures qui peuvent présenter dans le même



**Figure II-1 :** Variation de taille et contenu génique des génomes mitochondriaux, en comparaison avec une  $\alpha$ -protéobactérie du genre *Rickettsia*. **(A)** Les cercles et les lignes représentent les formes circulaires et linéaires d'ADNmt. Pour les grands génomes (>60 kb) la partie rouge représente la portion codant pour des gènes connus, et la partie bleue la portion codant pour des gènes non identifiés et les zones intergéniques non-codantes. Les noms d'espèces sont : *C. (Chlamydomonas) reinhardtii*, *C. (Chlamydomonas) eugametos*, et *S. (Schizosaccharomyces) pombe*. **(B)** Contenus en gènes des génomes mitochondriaux. Chaque ovale correspond à un organisme, et leur contenu correspond aux gènes présents chez ces organismes – seuls les gènes codants pour des protéines ainsi que les ARN ribosomiaux (ARNr) sont montrés ici (d'après Gray *et al.* 1998; Gray *et al.* 1999).



**Figure II-2 :** Exemple de génome mitochondrial de Métazoaire : l'ADNmt de l'homme. Celui-ci mesure 16,570 kb, et présente, comme la majorité des Métazoaires, 37 gènes agencés sur une molécule d'ADNmt circulaire monomérique double brin. Ces deux brins sont appelés brin lourd (ici noté H), sur lequel figure la majorité des gènes, et brin léger (ici noté L). Illustration provenant de la page <http://ipvgen.uniprv.it>.

individu des formes linéaires monomériques, ainsi que des formes circulaires monomériques ou dimériques (Locker *et al.* 1974; Lazowska & Slonimski 1976; Sor & Fukuhara 1983; Dinouël *et al.* 1993), ou bien des variations selon les individus, comme cela a été observé chez les levures du genre *Candida* (Kováč *et al.* 1984; Rycovska *et al.* 2004; Kosa *et al.* 2006; Valach *et al.* 2008).

Cette grande diversité de forme de l'ADNmt chez les Eucaryotes s'accompagne également d'une grande diversité de taille des génomes mitochondriaux (figure II-1A). Alors que les plantes possèdent un génome mitochondrial de grande taille, compris entre 180 et 600 kb (kilobases) - voire même 2400 kb pour le melon (Ward *et al.* 1981) - les Métazoaires possèdent un génome beaucoup plus compact, de l'ordre de 15 à 20 kb en moyenne (Boore 1999; Lynch *et al.* 2006). Les organismes unicellulaires et les champignons présentent quant à eux des génomes mitochondriaux de tailles très variables, intermédiaires entre les plantes et les animaux (Clark-Walker 1992; Gray *et al.* 1998; Burger *et al.* 2003a). Ces différences de tailles sont la conséquence d'une part, de la variation du nombre de gènes mitochondriaux, allant de 5 pour le parasite de l'homme *Plasmodium falciparum* (Feagin 1994) à 97 pour l'unicellulaire *Reclinomonas americana* (Lang *et al.* 1997; figure II-1B), et d'autre part, de la variation de la taille des zones non codantes : introns et régions intergéniques (Gray *et al.* 1998; Lynch *et al.* 2006).

## **2. Les génomes mitochondriaux des Métazoaires**

Le génome mitochondrial des Métazoaires est généralement constitué uniquement de molécules circulaires monomériques compactes, de tailles comprises entre 15 et 20 kb. Il comporte habituellement 37 gènes : 13 gènes codants (impliqués dans la phosphorylation oxydative : *Co1* à *Co3*, *Cytb*, *Atp6* et *Atp8*, et dans la chaîne respiratoire : *Nad1* à *Nad6* et *Nad4L*), 2 sous-unités ribosomales (*12S* et *16SARNr*) et 22 ARNt (Wolstenholme 1992; Boore 1999) – (figure II-2). Les régions non codantes sont généralement réduites à la région de contrôle de l'ADNmt. Celle-ci est scindée en deux chez les Métazoaires et ne constitue en moyenne que 7% du génome mitochondrial. Cette région de contrôle est impliquée dans la régulation de la réplication de l'ADNmt et dans l'initiation de la transcription en ARN (Shadel & Clayton 1997). Les autres portions non codantes de l'ADNmt des Métazoaires sont les régions intergéniques, très courtes, et les introns sont inexistantes (Boore 1999; Gray *et al.* 1999; Boore *et al.* 2005).

La réduction de la taille des régions non codantes participe à la réduction globale du génome mitochondrial des Métazoaires. Deux théories principales ont été émises pour

l'expliquer. La première est la « course à la réplication », où une compétition pour les génomes qui se répliquent le plus vite favorise les génomes les plus compacts (Attardi 1985; Rand 2001) – toutefois, cette théorie a récemment été remise en question car elle n'explique pas pourquoi celle-ci ne s'applique qu'à l'ADNmt des animaux. La seconde théorie est que la réduction de cette taille est la conséquence de forces non-adaptatives tels que la dérive génétique et le taux de mutation plus élevé chez les animaux (Lynch 2006; Lynch *et al.* 2006) – mais cette seconde théorie peut également être réfutée pour ses contre-exemples (Lavrov 2007).

Bien que la taille réduite du génome mitochondrial soit une règle quasi générale chez les Métazoaires, il existe quelques exceptions. C'est notamment le cas du Mollusque bivalve *Placopecten magellanicus* qui possède le plus grand génome mitochondrial actuellement séquencé dans le règne animal, mesurant plus de 40 kb (Smith & Snyder 2007). Les différences de taille des génomes mitochondriaux chez les animaux sont ordinairement dues aux variations de longueur de la région de contrôle qui présente parfois des séquences répétées (Powers *et al.* 1986; Boyce *et al.* 1989; Rand 1993; Townsend & Rand 2004; Endo *et al.* 2005; Segawa & Aotsuka 2005; Signorovitch *et al.* 2007; Ma *et al.* 2009; et revue par Gissi *et al.* 2008). Chez *Placopecten magellanicus*, plus de 50% de son génome mitochondrial est non codant. Ces répétitions de séquences non codantes sont causées par des erreurs lors de la réplication du génome (Levinson & Gutman 1987; Fumagalli *et al.* 1996). Ces erreurs peuvent, plus rarement, conduire à des répétitions de séquences codantes comprenant des gènes entiers. C'est le cas du nématode *Thaumamermis cosgrovei*, parasite du Crustacé terrestre *Armadillidium vulgare*, qui possède un génome mitochondrial d'une taille variant de 19 à 34 kb, selon la taille de la séquence répétée, généralement formée par deux à trois copies des gènes *Nad4*, *Atp6* et *12SARNr* (Tang & Hyman 2007). La présence de gènes supplémentaires chez les Métazoaires est en revanche très rare et n'engendre généralement pas une augmentation significative de la taille du génome mitochondrial. Les seules espèces animales présentant des gènes mitochondriaux codant pour des protéines supplémentaires sont des Cnidaires (Pont-Kingdon *et al.* 1995; Medina *et al.* 2006; Shao *et al.* 2006), et certaines moules d'eau douce. Pour ces dernières, la fonction de ces gènes n'est pas encore identifiée (Breton *et al.* 2009).

Il existe aussi quelques exemples de génomes mitochondriaux extrêmement réduits chez les Métazoaires, comme celui du Chaetognathe *Paraspadella gotoi* qui possède le plus petit génome mitochondrial actuellement connu du règne animal avec 11,423 kb. Ce génome ne présente que 14 gènes : il lui manque 2 gènes codants pour des protéines, ainsi que 21

gènes d'ARNt (Helfenbein *et al.* 2004). La perte de gènes mitochondriaux est néanmoins relativement rare chez les Métazoaires et habituellement restreinte aux ARNt. Il semblerait que ces absences soient compensées par un import d'ARNt depuis le génome nucléaire (Gissi *et al.* 2008; Downton *et al.* 2009), bien que cela n'a été que très peu démontré chez les Métazoaires (Schneider & Maréchal-Drouard 2000; Dörner *et al.* 2001).

Contrairement aux plantes et aux unicellulaires, la forme des génomes mitochondriaux des Métazoaires varie peu. La très grande majorité des espèces animales possède un génome circulaire monomérique (Boore 1999; Nosek & Tomáška 2003). Il existe évidemment quelques exceptions où la molécule circulaire monomérique est absente ou simplement temporaire. C'est le cas tout d'abord des Cnidaires « Medusozoa », les seuls animaux à avoir un génome mitochondrial exclusivement linéaire (Bridge *et al.* 1992; Bridge *et al.* 1995; Shao *et al.* 2006) et parmi lesquels les Cubozoa et des Hydrozoa présentent un génome linéaire multipartite composé de deux à quatre molécules portant chacune des gènes différents (Kayal & Lavrov 2008; Voigt *et al.* 2008). Chez le pluricellulaire primitif parasite *Dicyema japonica* (Mésozoaire) le génome mitochondrial apparaît sous différentes formes selon les tissus cellulaires. Il se présente sous la forme classique de monomères circulaires dans ses cellules germinales alors qu'il se découpe en plusieurs mini-cercles ne portant qu'un seul gène dans les cellules somatiques (Watanabe *et al.* 1999; Awata *et al.* 2005). D'autres cas de génomes multipartites se trouvent également chez le Rotifère *Brachionus plicatilis* (Suga *et al.* 2008), les nématodes parasites de plantes du genre *Globodera* (Armstrong *et al.* 2000; Gibson *et al.* 2007), et le poux de l'homme *Pediculus humanus* (Shao *et al.* 2009), qui présentent plusieurs molécules circulaires portant chacune une partie des gènes mitochondriaux. Enfin, un dernier cas particulier et original de génome mitochondrial est celui des Crustacés Isopodes terrestres qui fait l'objet de cette étude et dont la structure est décrite à la fin de ce chapitre.

### **3. La transmission maternelle de l'ADNmt**

L'ADNmt des animaux est depuis longtemps un marqueur de choix pour les études de génétique des populations, de phylogéographie et de phylogénétique (Awise *et al.* 1987; Simon *et al.* 1994; Moore 1995). Les raisons de cet intérêt général pour les gènes mitochondriaux et plus récemment les génomes entiers (Boore & Brown 1998; Curole & Kocher 1999; Boore *et al.* 2005), repose sur les concepts que l'ADNmt évolue rapidement, de façon clonale et sans recombinaison (il est donc présent sous la même forme dans tous les tissus), et qu'il se transmet de façon uniparentale (Awise 1991).

Chez les Métazoaires, l'ADNmt se transmet en effet quasi-exclusivement par héritage maternel, via les ovocytes. Ces ovocytes contiennent entre  $10^4$  et  $10^5$  mitochondries, chacune contenant plusieurs copies d'ADNmt, attachées à la membrane interne de la mitochondrie (Satoh & Kuroiwa 1991; Newman *et al.* 1996). Chez les Mammifères, il a été également démontré que les molécules d'ADNmt s'agrègent dans des sortes de noyaux appelés nucléoides, contenant entre 2 et 10 copies d'ADNmt (Satoh & Kuroiwa 1991; Legros *et al.* 2004; Malka *et al.* 2006). Ces structures en nucléoides participeraient à la ségrégation rapide de l'ADNmt lors de la maturation des ovocytes (Cao *et al.* 2007; Gilkerson 2009).

Depuis la découverte de la transmission maternelle de l'ADNmt chez les animaux dans les années 1970 (Dawid & Blackler 1972) jusque dans les années 1980 avec son observation chez de nombreux modèles (Hutchison *et al.* 1974; Hayashi *et al.* 1978; Giles *et al.* 1980; Reilly & Thomas 1980; Gyllensten *et al.* 1985), aucun contre exemple n'avait été rapporté. Ces observations avaient de plus été supportées par la mise en évidence de processus de régulation empêchant l'ADNmt paternel de pénétrer dans les ovocytes (Ursprung & Schabtach 1965; Kaneda *et al.* 1995; Sutovsky *et al.* 2000; Sutovsky *et al.* 2003; Thompson *et al.* 2003), ainsi que par l'observation d'une diminution du nombre d'ADNmt lors de la spermatogenèse chez les Mammifères (May-Panloup *et al.* 2006). Depuis, quelques exceptions ont été rapportées chez des nématodes (Lunt & Hyman 1997), des Arthropodes (Kondo *et al.* 1990; Meusel & Moritz 1993; Arunkumar *et al.* 2006; Sherengul *et al.* 2006; Fontaine *et al.* 2007), ainsi que des vertébrés (Gyllensten *et al.* 1991; Magoulas & Zouros 1993; Schwartz & Vissing 2002; Kvist *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2004). Toutefois, ces exemples généralement assimilés à des « fuites d'ADNmt paternel » (paternal leakage) ne sont pas considérés comme de réels contre-exemples, puisque ces « erreurs » de transmission sont corrigées par une forte dilution du génome paternel parmi la multitude de copies d'ADNmt d'origine maternelle (Wolff & Gemmell 2008). White *et al.* (2008) estiment cependant que la quantité croissante d'exemples de transmission d'ADNmt paternel nécessite une réévaluation des conséquences que cela peut entraîner.

Un exemple intéressant d'héritage d'ADNmt paternel, largement étudié, mérite néanmoins une attention particulière : c'est la transmission double-uniparentale (DUI) qui se produit chez de nombreux Mollusques bivalves (Skibinski *et al.* 1994; Hoeh *et al.* 1996; Zouros 2000; Passamonti & Scali 2001; Hoeh *et al.* 2002; Curole & Kocher 2005; Venetis *et al.* 2006; Passamonti 2007; Theologidis *et al.* 2007; Theologidis *et al.* 2008). Dans ce système particulier, il existe deux types d'ADNmt : celui des mâles (type M) et celui des femelles (type F), qui divergent selon des voies de transmissions différentes. Lors de la fécondation,

tous les embryons reçoivent les deux types d'ADNmt de leurs parents, mais dans les 24 heures qui suivent, le type M est quasiment éliminé des embryons femelles (Sutherland *et al.* 1998; Sano *et al.* 2007), tandis que chez les mâles, le type M ne se retrouve que dans la lignée germinale, laissant place au type F dans les tissus somatiques (Cao *et al.* 2004a; Breton *et al.* 2007; Passamonti & Ghiselli 2009). La présence de deux types d'ADNmt dans l'œuf et dans les cellules germinales des mâles crée alors une hétéroplasmie (mélange de mitotypes au sein d'un même individu), propice aux recombinaisons. C'est d'ailleurs au travers de recombinaisons que ce système a évolué, via la « masculinisation » du génome de type F, qui se manifeste par l'insertion d'une partie de la région non codante de type M dans un génome de type F, permettant le passage vers la voie de transmission masculine (Hoeh *et al.* 1997; Burzyński *et al.* 2003; Cao *et al.* 2004b; Everett *et al.* 2004; Rawson 2005; Breton *et al.* 2006; Burzyński *et al.* 2006; Venetis *et al.* 2007; Filipowicz *et al.* 2008).

#### **4. La recombinaison dans les génomes mitochondriaux des Métazoaires**

Mis à part ce type de transmission particulier et la recombinaison entre type M et type F, l'ADNmt des animaux est habituellement considéré comme non recombinant (Gillham 1994). Cependant, de récents travaux ont démontré la présence de recombinaisons chez un grand nombre de taxons (Lunt & Hyman 1997; Ladoukakis & Zouros 2001; Gantenbein *et al.* 2005; Guo *et al.* 2006; Armstrong *et al.* 2007; Ciborowski *et al.* 2007; Ujvari *et al.* 2007; Hua *et al.* 2008) et certains auteurs estiment que la recombinaison est plus courante que l'on ne pensait chez les Métazoaires (Rokas 2003; Tsaousis *et al.* 2005; White *et al.* 2008). La majorité des travaux faisant état de recombinaisons étant limitée aux tissus somatiques, l'impact de ces recombinaisons sur l'évolution des génomes mitochondriaux n'est pas encore connu (Slate & Gemmell 2004; White *et al.* 2008). De plus, Elson & Lightowers (2006) estiment que ces recombinaisons sont trop peu courantes pour avoir un réel impact. La faible fréquence de molécules recombinantes face aux molécules d'ADNmt non recombinantes, majoritaires dans un individu, fait qu'elles sont particulièrement sujettes à élimination lors des phénomènes de ségrégation des mitotypes, au cours de la mitose et de la méiose (voir paragraphe suivant).

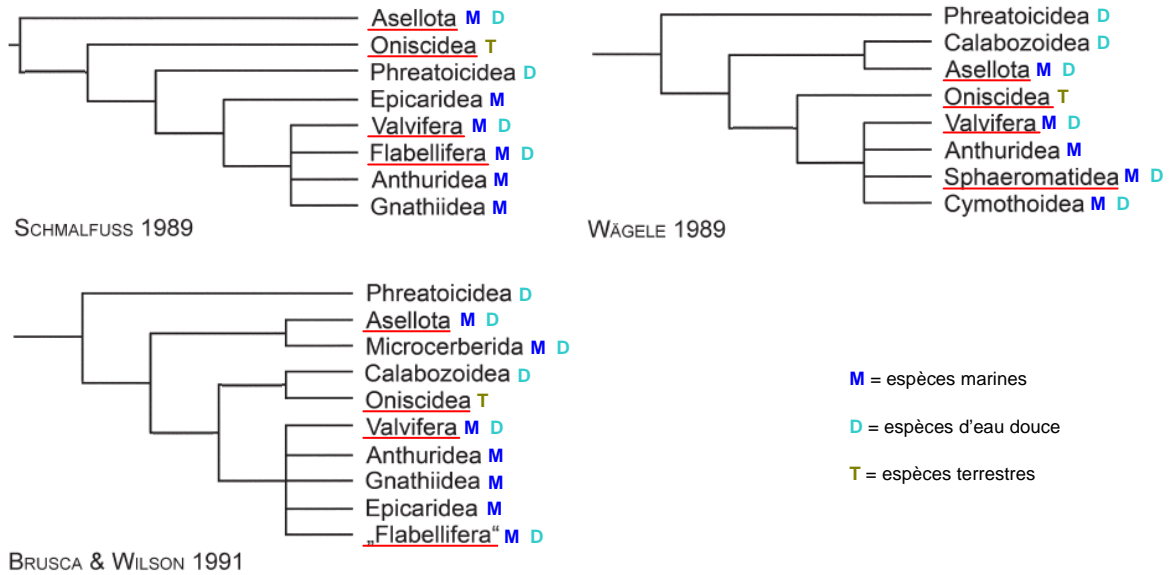
#### **5. L'hétéroplasmie chez les Métazoaires**

L'homogénéité de l'ADNmt au sein d'un individu se joue entre l'ovogenèse et la folliculogénèse post-natale. Il a été démontré chez des Mammifères une réduction du nombre de copies d'ADNmt qui investissent l'ovocyte lors de la méiose, ainsi qu'une réduction du

nombre de copies d'ADNmt qui participeront au « repeuplement » de la cellule œuf lors de folliculogénèse (Cree *et al.* 2008; Khrapko 2008; Wai *et al.* 2008). Ces deux phénomènes induisent alors une homogénéisation de la composition de l'ADNmt dans l'ovocyte. Ce phénomène connu sous le nom de goulot d'étranglement ou « bottleneck » (Bergstrom & Pritchard 1998), a donc un très fort impact sur la structuration génétique mitochondriale des générations suivantes (Cree *et al.* 2008). Cet impact est particulièrement important dans le cas d'une hétéroplasmie, lorsqu'une mère porte deux ADNmt divergents dans ces cellules germinales. Le goulot d'étranglement va rapidement gommer l'état hétéroplasmique en diminuant la probabilité de co-transmission de mitotypes variants. Les descendants ne porteront alors qu'un seul mitotype : ils seront donc homoplasmiques (Laipis *et al.* 1988; Ashley *et al.* 1989). Une telle réduction du nombre de molécule d'ADNmt peut engendrer un retour vers l'homoplasmie très rapidement. Des études réalisées chez des Mammifères (homme, souris, bovins) ont démontré que l'hétéroplasmie est rapidement transformée en homoplasmie en seulement deux ou trois générations (Bendall *et al.* 1997; Chinnery *et al.* 2000; Chinnery 2002; Cree *et al.* 2008).

Il existe d'autres facteurs intervenant dans l'homogénéisation de l'ADNmt : la sélection qui élimine les mitotypes dégénérés (Rand 2001), et la ségrégation des mitochondries lors de la mitose qui favorise aussi l'homoplasmie dans les cellules nouvellement formées (Birky 2001). Ces facteurs ont une incidence remarquable, tant il est vrai qu'en leur absence, l'hétéroplasmie serait la règle générale (White *et al.* 2008). En effet, le taux de mutation élevé du génome mitochondrial des animaux (Lynch *et al.* 2006), expliqué notamment par le fort potentiel mutagène des radicaux libres oxygénés (Beckman & Ames 1998), produit de la phosphorylation oxydative, devrait normalement favoriser l'apparition de mutant, et donc favoriser l'hétéroplasmie. White *et al.* (2008) soulignent néanmoins que de plus en plus de travaux rapportent des cas d'hétéroplasmie chez les animaux (Kann *et al.* 1998; Barr *et al.* 2005; Maté *et al.* 2007; Millar *et al.* 2008; Mjelle *et al.* 2008). Même si l'état temporaire de l'hétéroplasmie rend sa détection difficile, ce qui explique la relative rareté de ces observations, il semblerait donc que l'hétéroplasmie, à l'image de la recombinaison et de la transmission paternelle, soit plus courante dans le règne animal qu'on ne le pensait (Kmieciak *et al.* 2006; White *et al.* 2008).





**Figure II-3 :** Relations phylogénétiques des différents sous-ordres des Isopodes, selon les classifications publiées par Schmalzfuss (1989), Wägele (1989) et Brusca & Wilson (1991) à partir de critères morphologiques ; cf. revue de Schmidt (2008). Les sous-ordres soulignés en rouge sont abordés dans ce travail. Les écosystèmes des différents ordres sont notés par une lettre (M, D ou T). Le groupe des Flabellifera, mentionné par Schmalzfuss (1989) et Brusca & Wilson (1991), comprend les Sphaeromatidea.

## **B. Les Crustacés Isopodes terrestres**

Parmi l'ensemble des Crustacés, l'ordre des Isopodes est un exemple de transition évolutive entre les différents milieux aquatiques et le milieu terrestre. Selon les classifications récentes, il existe 8 principaux sous-ordres dont la plupart sont aquatiques, marins ou d'eau douce, et seuls les Oniscidea sont terrestres (Wägele 1989; Schmidt 2008). Les Isopodes ont des modes de vie très diversifiés, allant de la phytophagie au parasitisme en passant par la prédation et la décomposition. La classification de ces groupes est très discutée (figure II-3) : la monophylie de certains ordres, ainsi que leurs relations sont toujours débattues (Schmalfluss 1989; Wägele 1989; Brusca & Wilson 1991; Wilson 2009). Néanmoins, il est largement reconnu que les Isopodes représentent dans leur ensemble un groupe monophylétique, tant d'un point de vue morphologique (Brusca & Wilson 1991; Wilson 2009) que moléculaire (Jenner *et al.* 2009; Wilson 2009).

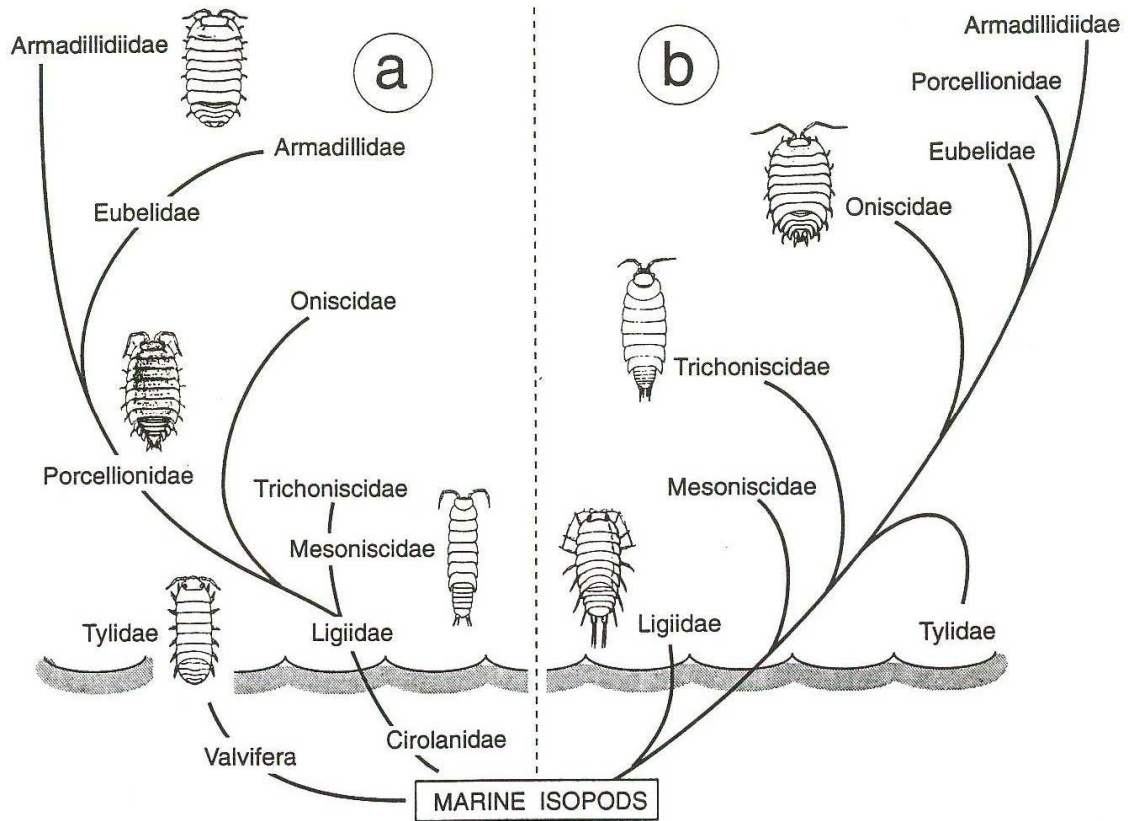
### **1. Les Oniscidea : Crustacés Isopodes terrestres**

Le sous-ordre des Oniscidea constitue le seul groupe de Crustacés réellement terrestre, comprenant des espèces adaptées à la vie hors de l'eau. Ces différentes espèces d'Oniscidea s'échelonnent des milieux péri-aquatiques aux milieux semi-arides. Parmi les espèces considérées comme celles « sorties de l'eau » se trouvent les Ligies (genre *Ligia*), même si celles-ci sont toujours capables de vivre immergées plusieurs minutes. Ce sont des modèles biologiques très étudiés pour leur adaptation à la vie terrestre et le concept de « terrestrialisation » (Carefoot & Taylor 1995; Taiti *et al.* 2003). La majorité des autres espèces d'Oniscidea s'est totalement affranchie des milieux aquatiques, grâce à de multiples adaptations morphologiques, physiologiques et comportementales, dont l'apparition d'une poche ventrale (le marsupium) portée par les femelles, recréant ainsi le milieu aqueux nécessaire au développement de la progéniture (Hoese 1984), ou l'acquisition d'un système de respiration aérien ventral maintenu humide (Schmidt & Wägele 2001). Toutefois, en tant que Crustacés, les Oniscidea recherchent activement des endroits au fort taux d'humidité avec un faible ensoleillement, car ils sont très sensibles à la dessiccation. Malgré ces contraintes, certaines espèces ont su coloniser des milieux très secs, comme l'espèce saharienne *Hemilepistus reaumuri* qui possède une physiologie (cuticule particulièrement imperméable) et un comportement adapté (vie en couple dans des terriers) à un écosystème semi-aride (Vandel 1960; Nasri *et al.* 1996).

Les Oniscidea constituent une part importante de la faune du sol. Ils se trouvent en très grand nombre dans la litière, avec parfois plusieurs centaines d'individus par m<sup>2</sup> (Araujo & Bond-Buckup 2005; Dias *et al.* 2005). Ils sont classés parmi les détritivores, puisqu'ils se nourrissent de matière organique morte et consomment plus de 10% de la matière végétale en décomposition (Hassall & Sutton 1978; Jambu *et al.* 1987; Mocquard *et al.* 1988). Ils hébergent une microfaune intestinale importante leur permettant la digestion de la cellulose (Vandel 1960; Zimmer 2002). Ils se nourrissent également des micro-organismes présents à la surface des feuilles mortes. Les cloportes jouent un rôle important dans les écosystèmes. En tant que détritivores, ils fragmentent la matière organique et participent ainsi à la fertilisation des sols (Curry 1994), mais ils représentent également un maillon essentiel de la chaîne trophique. Les cloportes sont en effet les proies de nombreux Arthropodes (Sunderland & Sutton 1980), ainsi que de vertébrés, dont notamment certains Oiseaux qui recherchent dans leur cuticule le calcium nécessaire à la constitution de la coquille de leurs œufs (Bureš & Weidinger 2003). Enfin, du fait de leur rôle important dans le recyclage de la matière organique, certains Oniscidea sont des espèces bio-indicatrices de la qualité des sols dans les écosystèmes agricoles (Souty-Grosset *et al.* 2005).

Il existe un peu plus de 3600 espèces d'Oniscidea connues à l'heure actuelle (Schmalfuss 2003; Schmidt 2008). Il est difficile de savoir quand seraient apparus les premiers Isopodes terrestres, cependant, compte tenu de la répartition mondiale de certaines espèces actuelles, il est très probable que leur émergence se soit faite avant la dislocation de la Pangée et la dérive des continents. De ce fait, Vandel (1960; 1965) a estimé l'apparition des Oniscidea au Carbonifère, soit environ -350 millions d'années. Cependant, le plus vieux fossile d'Isopode terrestre connu à ce jour, retrouvé à Álava dans le nord de l'Espagne, date du Crétacé inférieur, soit environ -100 millions d'années (Alonso *et al.* 2000). De même, Perrichot (2004) a détecté dans de l'ambre opaque d'Archingeay (Charente-maritime) datée de l'Albien (Crétacé inférieur : environ -100 millions d'années), plusieurs Isopodes fossilisés vraisemblablement terrestres, accompagnés d'autres animaux de la faune du sol, sans toutefois affirmer que ce sont bien des Oniscidea (V. Perrichot & M. Lak, comm. pers.). Enfin, l'émergence des familles actuelles semble être datée de l'Eocène supérieur, soit environ -34 millions d'années, comme l'attestent les plus anciens fossiles connus issus de ces groupes (Vandel 1960; Benton 1993; Schmidt 2008).

Le sous-ordre des Oniscidea est considéré comme monophylétique, néanmoins, l'hypothèse de deux événements de sortie de l'eau chez les Isopodes terrestres a régulièrement été évoquée. Vandel (1943; 1960) a proposé de séparer les Isopodes terrestres en deux sous-



**Figure II-4 :** Phylogénies et émergence des Oniscidea selon : (a) Vandel (1943) et (b) Schmalzfuss (1975; 1989). Illustration issue de Carefoot & Taylor (1995).

groupes : la *série Tylienne*, comprenant les espèces de la famille des Tyliidae, issue des Isopodes marins Valvifères selon l'auteur, et la *série Ligienne* comprenant tous les autres Oniscidea, issue d'un autre groupe marin (Figure II-4). L'auteur avait également préconisé le retrait de la famille des Trichoniscidae du sous-ordre des Oniscidea avec pour argument le caractère ancestral de la vie aquatique de quelques espèces de cette famille (Vandel 1964; 1965). Les récentes publications sur l'origine des Oniscidea proposent cependant une monophylie de ce groupe (revue dans Schmidt 2008). Les analyses phylogénétiques réalisées à partir du gène nucléaire *18SARNr* sur un échantillon d'Isopodes confirme cette monophylie des Oniscidea (Dreyer & Wägele 2002). En revanche, les phylogénies réalisées à partir de gènes mitochondriaux (*12S* et *16SARNr* et *COI*) ne montrent pas une monophylie des Oniscidea (Michel-Salzat 2000; Michel-Salzat & Bouchon 2000; Wetzer 2002). L'utilisation de ces gènes seuls ne semble cependant pas très informative (ces marqueurs n'étant pas appropriés à l'échelle de temps de ce groupe), et la monophylie des Oniscidea n'est plus sujette à débat.

Au sein des Oniscidea, la famille des Ligiidae semble bien être la plus ancienne. Cette hypothèse est soutenue par les analyses phylogénétiques réalisées avec le gène nucléaire *18SARNr* (Mattern & Schlegel 2001; Mattern 2003), qui placent les espèces des genres *Ligia* et *Ligidium* (Ligiidae) à la base des Oniscidea. De même, les travaux réalisés sur des gènes mitochondriaux montrent que les Ligiidae et les Tyliidae sont les deux familles les plus anciennes, même si elles ne se groupent pas avec les autres familles d'Oniscidea (Michel-Salzat 2000; Michel-Salzat & Bouchon 2000). Les auteurs interprètent ces résultats comme la conséquence d'une divergence ancienne de ces familles, suivie d'une radiation évolutive rapide des Oniscidea.

## **2. *Wolbachia pipientis*, parasite de la reproduction**

Beaucoup de ces Isopodes terrestres hébergent des bactéries endosymbiotiques, parasites de la reproduction. Ces bactéries du genre *Wolbachia* sont des  $\alpha$ -protéobactéries qui se situent dans le cytoplasme des cellules de leur hôte. Les *Wolbachia* sont les bactéries endosymbiotiques les plus répandues parmi les invertébrés, se retrouvant chez de nombreux Arthropodes (Hilgenboecker *et al.* 2008; Werren *et al.* 2008) ainsi que des nématodes (Taylor & Hoerauf 1999). Chez les Isopodes terrestres, elles infectent environ 61% des espèces (Bouchon *et al.* 1998; Cordaux *et al.* 2001; Ben Afia Hatira *et al.* 2008; Bouchon *et al.* 2008).

Ces bactéries intracellulaires sont transmises maternellement, de la même façon que les mitochondries (transmission cytoplasmique). Pour cela, elles se trouvent en grand nombre

dans les tissus germinaux, mais aussi dans certains tissus somatiques en particulier lorsque l'animal est fortement infecté (Cheng *et al.* 2000; Chen *et al.* 2005; Serbus *et al.* 2008; Bertaux *et al.* 2009; Martinez *et al.* 2009). Les *Wolbachia* induisent différents effets sur la reproduction de leurs hôtes, toujours dans le but d'augmenter la proportion de femelles dans une portée, ou de se rendre indispensable à son hôte, afin d'être transmises en grand nombre à la génération suivante (Stouthamer *et al.* 1999). Les différents effets qu'induisent les *Wolbachia* sur leurs hôtes sont : (i) la mort des mâles, ou male-killing qui provoque la mort des œufs génétiquement mâles dans une portée, en faisant profiter des ressources les femelles (sœurs), et en augmentant ainsi leur survie grâce à une plus faible compétition, ou à l'extrême, en se nourrissant de cadavres (Hurst 1991) ; (ii) la parthénogenèse thélytoque qui produit des femelles diploïdes (diploïdisation) à partir d'œufs non fécondés (haploïdes) normalement destinés à devenir des mâles chez les espèces haplo-diploïdes (Stouthamer *et al.* 1999) ; (iii) l'incompatibilité cytoplasmique qui favorise la reproduction des femelles porteuses de *Wolbachia* en entraînant la mort des embryons, lorsque un mâle infecté se reproduit avec une femelle non infectée (Yen & Barr 1973; Bordenstein & Werren 2007) ; (iv) la féminisation qui induit le développement d'un système reproducteur femelle fonctionnel chez des mâles génétiques (Legrand & Juchault 1970; Martin *et al.* 1973; Juchault *et al.* 1994; Rigaud *et al.* 1997; Negri *et al.* 2006; Bouchon *et al.* 2008) ; et (v) la réalisation de l'ovogenèse qui rend la présence de *Wolbachia* indispensable à la maturation des ovocytes et donc à la reproduction de l'hôte (Dedeine *et al.* 2001). Ce dernier phénotype est le seul effet où la symbiose avec *Wolbachia* est devenue obligatoire.

Ces manipulations de la reproduction dépendent à la fois de la souche bactérienne et de l'espèce hôte. Parmi ces phénotypes, seuls deux ont pour l'instant été observés chez les Isopodes terrestres : l'incompatibilité cytoplasmique, décrite seulement chez deux espèces, *Porcellio dilatatus* et *Cylisticus convexus* (Legrand & Juchault 1986; Moret *et al.* 2001), et la féminisation, observée chez une dizaine d'espèces (Martin *et al.* 1973; Juchault *et al.* 1994; Bouchon *et al.* 1998; Rigaud *et al.* 1999b; Bouchon *et al.* 2008; Nasr *et al.* 2009). Chez *Armadillidium vulgare*, la féminisation induit un biais de la sex-ratio atteignant parfois plus 80% de femelles dans la descendance (Rigaud *et al.* 1999b).

Toujours chez *A. vulgare*, il a également été observé la présence d'un facteur féminisant nommé *f*, qui proviendrait d'une portion de génome de *Wolbachia* intégrée de façon labile par le génome nucléaire de l'hôte (Legrand & Juchault 1984; Juchault & Mocquard 1993). Ce facteur *f* agit de la même manière en faisant pencher la sex-ratio en faveur des femelles. Cependant sa transmission est biparentale et son taux de transmission est

plus faible et plus fluctuant que celui de *Wolbachia*. Juchault & Mocquard (1993) ont par ailleurs démontré que l'association des deux facteurs féminisants, *Wolbachia* et *f*, peut entraîner la disparition des individus génétiquement femelles dans une population.

### 3. Influence de *Wolbachia* sur la diversité mitochondriale des *Oniscidea*

Par sa voie de transmission maternelle et le fort biais reproductif qu'elles induisent, les *Wolbachia* ont une forte influence sur la structuration génétique mitochondriale de ses hôtes, qui se fait par un effet d'entraînement appelé auto-stop (hitchhiking ; Hurst & Jiggins 2005). Ce phénomène a été observé chez de nombreux organismes hébergeant ces bactéries (Kambhampati *et al.* 1992; Ballard *et al.* 1996; Rokas *et al.* 2001; Baudry *et al.* 2003; DeWayne Shoemaker *et al.* 2003; Jiggins 2003; Marshall 2004; Narita *et al.* 2006; Rasgon *et al.* 2006; Nunes *et al.* 2008; Delgado & Cook 2009). Ces études ont mis en évidence une réduction du polymorphisme mitochondrial dans les populations infestées par *Wolbachia*, en comparaison avec les populations non-infestées. Ceci s'explique aisément par l'avantage reproductif donné par *Wolbachia* aux femelles infectées. La rapide propagation des bactéries entraîne également celles des mitochondries qui leur sont associées dans le cytoplasme. Cette association entre une souche de *Wolbachia* et un mitotype (type d'ADNmt) est appelée déséquilibre de liaison. L'effet d'auto-stop qu'il engendre peut toutefois être minimisé lors d'événements de transmission horizontale des bactéries (transmission d'hôte à hôte sans reproduction sexuée). Ces transmissions horizontales de *Wolbachia* sont courantes et peuvent jouer un rôle important dans la structuration génétique mitochondriale de l'hôte. Cela a été démontré chez plusieurs Arthropodes (Huigens *et al.* 2004; Baldo *et al.* 2008).

Chez les Isopodes terrestres, plusieurs études ont porté sur le polymorphisme mitochondrial lié à la présence de *Wolbachia* (Marcadé *et al.* 1999; Rigaud *et al.* 1999a; Verne 2007). Ces travaux ont ainsi démontré une absence de diversité génétique mitochondriale chez les populations de *Porcellionides pruinosus* infestées (Marcadé *et al.* 1999), ainsi que la présence de transferts horizontaux chez cette même espèce (Cordaux *et al.* 2001; Michel-Salzat *et al.* 2001). Chez *Armadillidium vulgare*, la baisse de diversité mitochondriale induite par l'effet auto-stop avec les *Wolbachia* semble cependant moins importante. Ceci a été interprété comme la conséquence d'un taux de transmission plus faible des *Wolbachia* chez cette espèce, ainsi qu'une possible transmission paternelle du facteur *f* cassant la liaison entre les *Wolbachia* et le mitotype, et rééquilibrant ainsi légèrement la diversité mitochondriale (Grandjean *et al.* 1993; Rigaud *et al.* 1999a).

#### **4. Présence d'autres parasites de la reproduction chez les Oniscidea**

Les Arthropodes hébergent également d'autres parasites de la reproduction, beaucoup moins connus et étudiés, mais tout aussi susceptibles d'influencer le polymorphisme mitochondrial de leurs hôtes (Hurst & Jiggins 2005; Duron *et al.* 2008b). Chez les Isopodes terrestres, des premiers travaux semblent attester la présence de bactéries du genre *Spiroplasma* (Lepelletier 2009). Même si certaines espèces sont connues pour induire la mort des mâles (Hurst & Jiggins 2000; Nakamura *et al.* 2005; Pool *et al.* 2006), aucune donnée n'est actuellement disponible sur la souche présente chez les Isopodes et sur son éventuel effet sur la sex-ratio. Quoi qu'il en soit, chez les Oniscidea comme chez d'autres organismes, leur prévalence reste très faible en comparaison avec celles des *Wolbachia* (Duron *et al.* 2008a; Lepelletier 2009), et le probable effet sur la sex-ratio des hôtes pourrait être masqué par ceux des *Wolbachia*.

### **C. Etat des connaissances sur l'ADN mitochondrial des Crustacés : le cas particulier des Isopodes**

#### **1. La taille des génomes mitochondriaux de Crustacés**

Les premières études réalisées sur l'ADNmt des Crustacés sont des analyses de polymorphisme de longueur des fragments de restriction, ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Ces analyses qui consistent à couper l'ADNmt par des enzymes de restriction renseignent sur la forme et la taille du génome. Chez les Crustacés, ces analyses sont peu nombreuses dans la littérature et ont été menées principalement sur des espèces de Décapodes qui présentent un important intérêt commercial (des langoustes : McLean *et al.* 1983; Brasher *et al.* 1992; des écrevisses : Grandjean & Souty-Grosset 1996; Grandjean & Souty-Grosset 1997; Grandjean *et al.* 1997; Souty-Grosset *et al.* 1997; des crevettes : Bouchon *et al.* 1994; Imai *et al.* 1999; Klinbunga *et al.* 1999; et des crabes : McMillen-Jackson & Bert 2004), ainsi que sur certains modèles biologiques comme l'artémie (Batuecas *et al.* 1988), et la daphnie (Stanton *et al.* 1991). Comme pour la majorité des animaux, les résultats de ces analyses RFLP ont démontré que les génomes mitochondriaux de ces Crustacés sont constitués d'un seul type de molécules circulaires et monomériques, d'une taille proche de 16 kb.

Depuis, les capacités de séquençage de génomes mitochondriaux entiers ont permis d'obtenir la séquence de plusieurs espèces. Chez les Crustacés, il existe actuellement 58

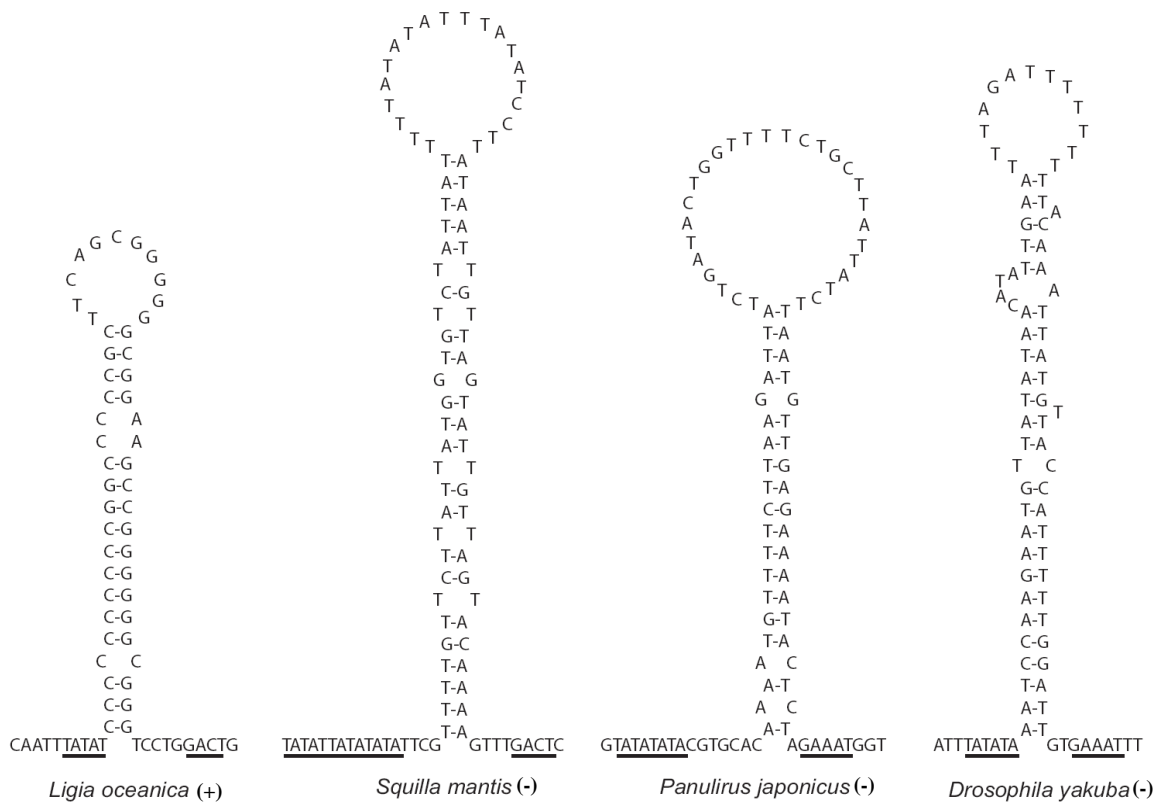


espèces dont le génome mitochondrial est entièrement séquencé et disponible sur NCBI (janvier 2010). Tous ces génomes sont uniquement constitués de molécules circulaires monomériques. La taille moyenne de ces génomes mitochondriaux est de 15,720 kb  $\pm$  0,431. Parmi ceux-ci, le plus petit fait 14,113 kb (l'Amphipode *Metacrangonyx longipes* ; Bauzà-Ribot *et al.* 2009) et le plus grand près de 24 kb (le crabe d'eau douce *Geothelphusa dehaani* ; Segawa & Aotsuka 2005) : en dehors de cette dernière exception, la taille des génomes mitochondriaux chez les Crustacés est donc relativement homogène (Gissi *et al.* 2008). Le séquençage a par ailleurs permis de préciser les tailles des génomes observées en RFLP pour certains taxons comme l'artémie (Valverde *et al.* 1994), la daphnie (Crease 1999) et plusieurs Décapodes (Wilson *et al.* 2000; Yamauchi *et al.* 2003).

## 2. La composition génique des génomes

Comme pour l'ensemble de Métazoaires, la composition en gènes est très conservée dans les génomes mitochondriaux des Crustacés. Parmi la soixantaine de génomes entièrement séquencés, une seule espèce montre l'absence d'un gène, celui de l'*ATPase 8* chez le Copépode *Paracyclops nana* (Ki *et al.* 2009b), tandis qu'aucune ne montre de gène codant supplémentaire. En revanche, l'ordre des gènes n'est pas stable chez les Crustacés (Roehrdanz *et al.* 2002; Lavrov *et al.* 2004; Viker *et al.* 2006; Gissi *et al.* 2008) et de nombreuses espèces présentent plusieurs réarrangements par rapport au génome mitochondrial hypothétique de l'Arthropode ancestral proposé par Shao *et al.* (2001) : c'est le cas des Copépodes (Machida *et al.* 2002; 2004a; Tjensvoll *et al.* 2005; Ki *et al.* 2009b), des Ostracodes (Ogoh & Ohmiya 2004), de Branchiures (Lavrov *et al.* 2004) et de plusieurs Malacostracés (Miller *et al.* 2004; Sun *et al.* 2005; Yang & Yang 2008; Bauzà-Ribot *et al.* 2009) dont les Isopodes qui seront traités dans cette étude (Roehrdanz *et al.* 2002; Podsiadlowski & Bartolomaeus 2006).

Les ARNt sont des gènes particulièrement mobiles dans les génomes mitochondriaux des Crustacés (Gissi *et al.* 2008). De nombreuses études montrent des changements de leur localisation entre les groupes (Lavrov *et al.* 2004; Machida *et al.* 2004b; Ogoh & Ohmiya 2004; Cook *et al.* 2005; Ki *et al.* 2009a; Ma *et al.* 2009; Shen *et al.* 2009; Shen *et al.* 2010) et parfois même entre espèces du même genre, comme chez les Copépodes du genre *Tigriopus* (Machida *et al.* 2002; Jung *et al.* 2006; Burton *et al.* 2007). La composition en ARNt des génomes mitochondriaux peut également varier. Généralement ils sont au nombre de 22, mais quelques espèces présentent des duplications de certains gènes d'ARNt (Lavrov *et al.* 2004; Ki *et al.* 2009b), alors que d'autres en manquent (Kilpert & Podsiadlowski 2006;



**Figure II-5 :** Structures en épingle à cheveux et possibles origines de réplication des régions de contrôle de l'ADNmt de trois Crustacés (à gauche) et de la drosophile (à droite). Les traits soulignent des motifs conservés. Le signe (+) montre que l'origine de réplication de *L. oceanica* se trouve sur le brin positif, alors que les origines de réplication des autres espèces se trouvent sur le brin négatif (-) : ceci est la conséquence de l'inversion de la région de contrôle chez *L. oceanica*. Illustration d'après Kilpert & Podsiadlowski (2006).

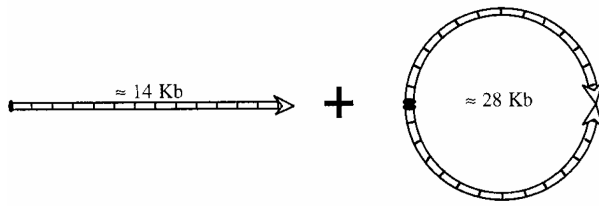
Bauzà-Ribot *et al.* 2009). Toutefois, il n'a pas été rapporté plus de quatre ARNt mitochondriaux manquants chez les Crustacés (Yang & Yang 2008).

### 3. *La région de contrôle chez les Crustacés*

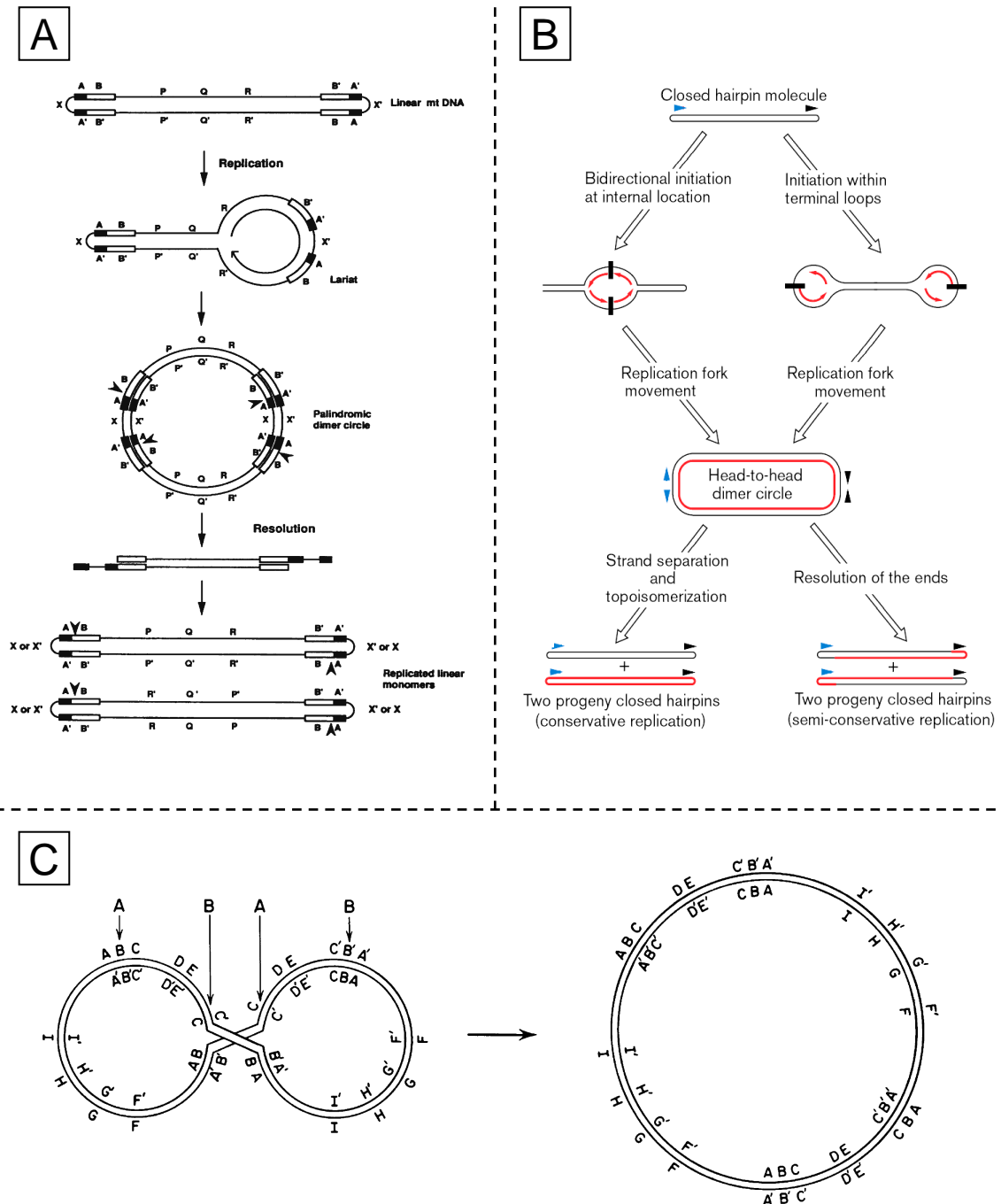
La région de contrôle est la principale zone non-codante de l'ADNmt. Elle est de longueur variable, modifiant parfois considérablement la taille de l'ADNmt (comme expliqué précédemment dans ce chapitre). Chez les Arthropodes, cette région très riche en nucléotides A et T est appelée « A+T-rich region » (Boyce *et al.* 1989). Chez les Crustacés sa composition en A et T est en moyenne de  $67,8\% \pm 4$  (Ki *et al.* 2009b). Cette région de contrôle est encore peu étudiée chez les Crustacés, en comparaison avec les Insectes. Toutefois, Kuhn *et al.* (2008) ont récemment recherché des motifs conservés chez 19 espèces de Crustacés, par analogie avec les 5 généralement identifiés chez les Insectes (Zhang *et al.* 1995; Zhang & Hewitt 1997). Les auteurs ont bien observé ces 5 motifs, mais leurs positions relatives varient entre les différents groupes de Crustacés. La conservation de ces motifs entre les taxons témoigne d'un rôle certain dans la réplication et l'initiation de la transcription, mais ces rôles restent inconnus. Parmi les motifs les plus facilement identifiables, l'origine de réplication se caractérise par une structure secondaire de l'ADN formant une structure en épingle à cheveux de quelques dizaines de bases. Kilpert & Podsiadlowski (2006) ont effectué une comparaison de cette boucle chez trois espèces de Crustacés, toujours en se référant au modèle Insecte, et plus particulièrement à la drosophile (Monforte *et al.* 1993). Ces auteurs ont démontré la conservation de motifs « TAT » et « G(A)nT » situés de part et d'autre de l'origine de réplication, et connus pour avoir une fonction importante dans l'initiation de la réplication (Zhang *et al.* 1995). Par ailleurs, ils ont observé que l'origine de réplication de l'Oniscidea *Ligia oceanica* avait subi une inversion de son orientation par rapport aux gènes mitochondriaux, en comparaison aux autres Crustacés (figure II-5).

### 4. *Le génome mitochondrial atypique d'Armadillidium vulgare*

Tous les Crustacés ne présentent pas un génome mitochondrial classique, de forme circulaire et monomérique. En effet, lors de travaux sur la diversité génétique mitochondriale de l'Isopode terrestre *Armadillidium vulgare*, Souty-Grosset *et al.* (1992) ont découvert la présence d'un génome mitochondrial de très grande taille, estimée entre 30 et 35 kb. L'analyse de ce génome par Raimond *et al.* (1999), grâce à la technique de RFLP, a cependant révélé que cette taille élevée ne semblait pas être due à l'insertion de séquences répétées, comme cela est couramment observé, mais plus certainement à une conformation



**Figure II-6 :** Représentation schématique de la structure atypique du génome mitochondrial d'*Armadillidium vulgare* (d'après Raimond *et al.* 1999).



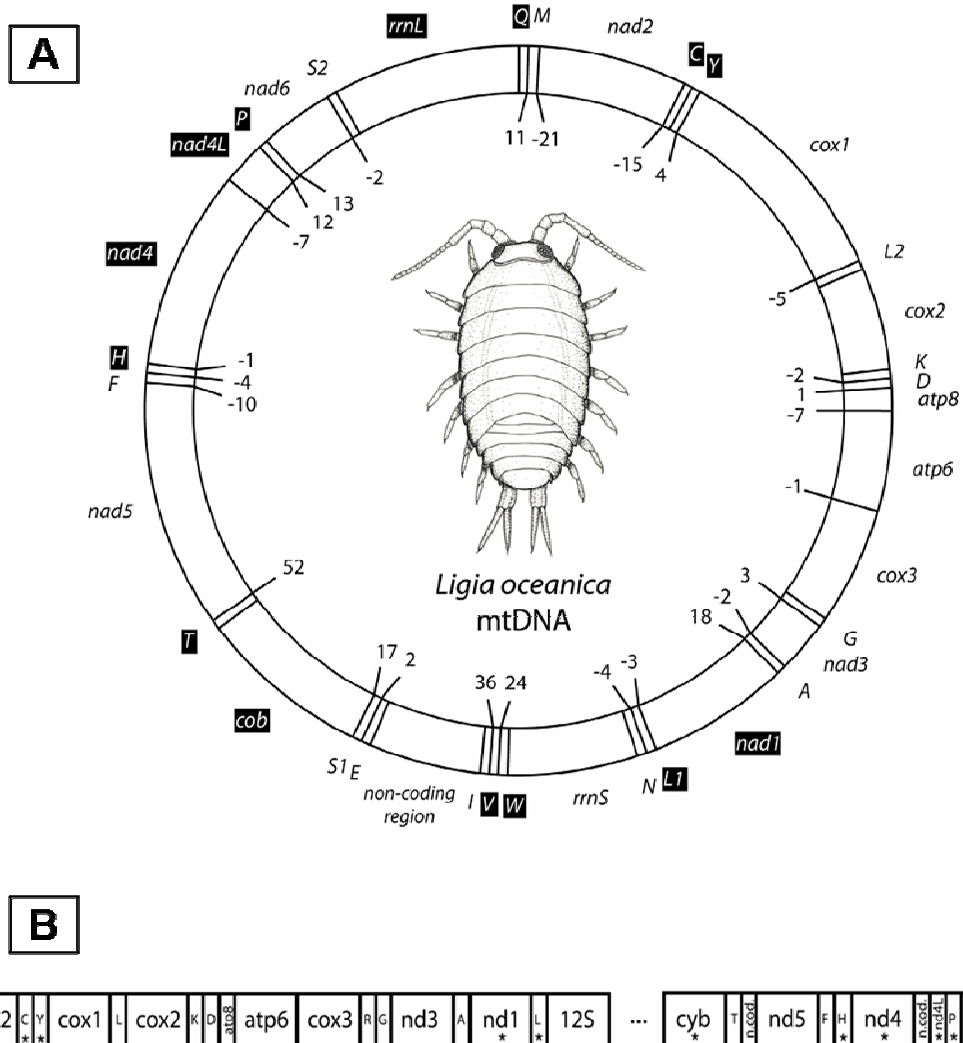
**Figure II-7 :** Modèles de formation de dimères d'ADN circulaires et palindromiques. (A) et (B) Formation de dimères lors de la réplication des monomères linéaires. Exemples de (A) l'ADNmt de levures (figure modifiée d'après Dinouël *et al.* 1993) et (B) des plasmides linéaires de Spirochètes du genre *Borrelia* (figure modifiée d'après Casjens 1999). Le modèle (C) présente la création de molécules circulaires palindromiques par recombinaison de deux molécules circulaires monomériques au niveau de séquences répétées inversées (Kolodner & Tewari 1979).

originale de l'ADNmt chez cette espèce. En effet, ce génome mitochondrial est composé de deux types de molécules : des monomères linéaires de ~14 kb couplés à des dimères circulaires de ~28 kb, elles-mêmes formées par l'association de deux monomères en opposition (liaisons « tête-tête » et « queue-queue »), créant ainsi des dimères parfaitement palindromiques (figure II-6). En dehors de ces deux types moléculaires, monomères linéaires et dimères circulaires, aucun monomère circulaire n'a été observé dans ce génome mitochondrial atypique (Raimond *et al.* 1999).

Ce génome mitochondrial qui présente deux molécules de formes différentes est un exemple unique parmi les Métazoaires. De plus, l'observation d'une molécule d'ADN dimérique avec des jonctions palindromiques est très rare. Seuls quelques exemples ont été rapportés dans les mitochondries de certaines levures (Locker *et al.* 1974; Lazowska & Slonimski 1976; Sor & Fukuhara 1983; Dinouël *et al.* 1993), dans le génome de bactéries Spirochetes du genre *Borrelia* (Casjens 1999), ainsi que dans l'ADN chloroplastique de laitues et d'épinards (Kolodner & Tewari 1979). Le mécanisme de formation de ces dimères n'est pas connu pour ces organismes. Toutefois, plusieurs hypothèses ont été formulées sous forme de modèles, présentées dans la figure II-7. Parmi ces modèles, Dinouël *et al.* (1993) ainsi que Casjens (1999) ont proposé que ces dimères soient le produit de réplication de monomères linéaires présents dans le génome (figures II-7A et B). Cette hypothèse, si elle n'a pas été vérifiée par ces auteurs, semble cependant être soutenue par la mise en évidence de la formation de dimères palindromiques lors de la réplication de formes linéaires dans le génome d'un bactériophage (Ravin *et al.* 2001). Chez ce phage, le dimère circulaire est une étape intermédiaire de la phase de replication de la forme linéaire. Ces dimères sont ensuite coupés en deux par une enzyme de type télomérase qui recrée ainsi des molécules linéaires monomériques.

En revanche, Kolodner & Tewari (1979) proposent une autre hypothèse pour expliquer la présence de dimères d'ADN palindromiques dans les chloroplastes de laitues et d'épinards, à savoir la formation de dimères par la recombinaison de molécules monomériques circulaires (figure II-7C). L'absence de molécules linéaires dans ces chloroplastes explique pourquoi ces auteurs ne proposent pas d'hypothèse liée à la réplication.

Chez *A. vulgare*, le système de formation des dimères palindromiques n'est pas connu, de même que la relation entre les monomères et les dimères. Cependant, les analyses RFLP effectuées par Raimond *et al.* (1999) ont mis en évidence une extrême conservation des sites de restriction entre les monomères et les dimères, ce qui pourrait témoigner d'une interaction entre ces deux molécules. En effet les auteurs estiment que si les deux types moléculaires



**Figure II-8** : Cartes des génomes mitochondriaux des Isopodes (**A**) *Ligia oceanica* (Oniscidea, Ligiidae), dont la séquence complète montre un génome de forme classique (monomère circulaire) ; d'après Kilpert & Podsiadlowski (2006), et (**B**) *Idotea baltica* (Valvifera, Idoteidae), dont la séquence est incomplète et la structure inconnue (probable structure atypique selon les auteurs) ; Podsiadlowski & Bartolomaeus (2006).

constituaient deux populations d'ADNmt distinctes, des mutations auraient dû apparaître dans chacune des formes de façon indépendante. Ceci aurait eu pour conséquence l'apparition de sites de restriction différents entre les deux types de molécules. Or, les monomères et les dimères présentent la même carte de restriction, il est donc fortement probable qu'un système dynamique existe entre les deux formes, permettant de passer de l'un à l'autre. Cela a déjà été décrit pour l'ADNmt des plantes, chez lesquelles les différentes formes observées sont liées entre elles (Atlan & Couvet 1993; Backert *et al.* 1997) et également proposé chez les levures où des dimères palindromiques semblables à ceux du génome mitochondrial atypique d'*A. vulgare* ont été observés (Sor & Fukuhara 1983; Dinouël *et al.* 1993 - figure II-7A).

### 5. L'ADNmt atypique est-il présent seulement chez *A. vulgare* ?

L'ADNmt atypique n'a pas seulement été observé chez *A. vulgare*. En effet, cette structure particulière du génome mitochondrial a aussi été démontrée chez une autre espèce d'Oniscidea : *Porcellionides pruinosus* (Marcadé *et al.* 1999). Cette espèce fait partie de la famille des Porcellionidae, relativement proche phylogénétiquement d'*A. vulgare*, suggérant ainsi une large distribution de l'ADNmt atypique chez les cloportes. Cependant, le récent séquençage du premier génome mitochondrial complet d'un Oniscidea (*Ligia oceanica*) n'a pas révélé la présence d'une structure atypique, mais au contraire la présence de molécules de type classique uniquement, de forme circulaires et monomériques et d'une taille de 15,289 kb (Kilpert & Podsiadlowski 2006; figure II-8A). En revanche, lors du séquençage du génome mitochondrial de l'Isopode marin *Idotea baltica* (sous-ordre des Valvifera, voir figure II-3, page 14), les auteurs, n'ayant pas réussi à obtenir la totalité du génome, ont émis l'hypothèse d'une possible conformation atypique de cet ADNmt (Podsiadlowski & Bartolomaeus 2006 ; figure II-8B).

Ainsi, en 2006, seules les séquences des génomes mitochondriaux de *Ligia oceanica* et d'*Idotea baltica* étaient disponibles chez les Isopodes. Mis à part la structure du génome qui, selon les auteurs, pourrait être différente, ces deux génomes partagent plusieurs particularités : un ordre et une orientation des gènes conservés (à l'exception du gène de l'ARNt<sup>Val</sup>) et une composition nucléotidique du génome globalement proche (pourcentage d'A et T, biais de composition en nucléotides des brins, cf. chapitre IV). Kilpert & Podsiadlowski (2006) ont alors défini ces différentes particularités comme caractéristiques des Isopodes. Le travail reporté ici permettra d'affirmer ou d'infirmer certaines de ces suppositions, et d'approfondir l'étude de l'évolution du génome mitochondrial chez les Isopodes.

### **III. Matériels et méthodes**

#### ***A. Matériel biologique***

Les espèces utilisées dans ce travail sont mentionnées dans le tableau III-1 (page suivante). Leur origine et leur matricule y sont notés.

#### ***B. Protocoles d'extraction d'ADN et d'ARN***

##### ***1. Dissection des animaux***

Les animaux destinés à la dissection pour en extraire l'ADN sont préalablement lavés à l'eau de Javel diluée (3%) puis rincés à l'eau déminéralisée afin de réduire les contaminations par des micro-organismes présents sur la cuticule des animaux. De même, lors de la dissection des animaux, le tube digestif et les cæcums digestifs sont écartés afin d'éliminer les contaminations par les nombreux micro-organismes présents dans le système digestif. Les tissus prélevés pour les extractions d'ADN chez les femelles sont les ovaires, la chaîne nerveuse et quelques tissus musculaires et adipeux. Lors de la dissection de mâles, le prélèvement des utricules (contenant le sperme) est généralement proscrit afin d'éviter une composition trop visqueuse du broyat, rendant difficile l'extraction d'ADN. Toutefois, l'extraction d'ADNmt des utricules s'est révélée indispensable pour certaines expériences de ce travail.

##### ***2. Extraction d'ADN total***

Le protocole d'extraction d'ADN total des animaux est adapté de Kocher *et al.* (1989). La totalité du protocole est en annexe 1.

##### ***3. Extraction d'ADN mitochondrial***

La transmission uniquement maternelle des mitochondries nous a permis de cumuler l'ADNmt de plusieurs individus (généralement des femelles) issues de la même lignée maternelle. Pour cela, nous avons élevé des lignées maternelles de plusieurs espèces dans le laboratoire UMR 6556 de l'Université de Poitiers.

Le protocole d'extraction de l'ADNmt des Isopodes terrestres est adapté de la lyse alcaline proposée par Sambrook *et al.* (1989). Le principe de cette méthode destinée à l'origine à l'extraction de plasmides est d'isoler l'ADNmt des autres molécules d'ADN provenant de l'animal (ADN nucléaire) et de ses éventuels endosymbiotes dont *Wolbachia*



**Tableau III-1** : Espèces d'isopodes utilisées dans ce travail. Les matricules correspondent à des lignées entretenues au laboratoire.

SOUS-ORDRE Famille	Espèces	Origine	Matricule
ASELLOTA			
Asellidae	<i>Asellus aquaticus</i>	Poitiers, Fr.	
FLABELLIFERA			
	<i>Dynamene bidentata</i>	La Rochelle, Fr.	
	<i>Sphaeroma serratum</i>	La Rochelle, Fr.	
ONISCIDEA			
Armadillidae	<i>Armadillo officinalis</i>	Tq.	Arm4
	<i>Cubaris murina</i>	Baie Mahault, Gp.	
Armadillidiidae	<i>Armadillidium depressum</i>	Ste Marie, Fr.	
	<i>Armadillidium maculatum</i>	Eze, Fr.	
	<i>Armadillidium nasatum</i>	Mignaloux, Fr.	
		Camarade, Fr.	
	<i>Armadillidium vulgare</i>	Tunis, Tu.	ZP
		Heraklion, Gr.	ZM
		Celles sur Belle, Fr.	ZN
		Nice, Fr.	BF
		Porto Alegre, Br.	RS
		São Paulo, Br.	ZG
		Ribadeo, Es.	AL
		Helsingør, Dk.	WX
		Chizé, Fr.	
	<i>Eluma purpurescens</i>	Chizé, Fr.	
Balloniscidae	<i>Balloniscus sellowii</i>	Caxias do Sul, Br.	
Cylisticidae	<i>Cylisticus convexus</i>	Villedaigne, Fr.	
Halophiloscidae	<i>Halophiloscia couchii</i>	La Rochelle, Fr.	
Ligiidae	<i>Ligia oceanica</i>	La Rochelle, Fr.	
Oniscidae	<i>Oniscus asellus</i>	Edinburgh, UK	
	<i>Oniscus lusitanus</i>	Fr.	
Philoscidae	<i>Atlantoscia floridana</i>	Porto Alegre, Br.	
	<i>Chaetophiloscia elongata</i>	Celles sur Belle, Fr.	
	<i>Philoscia muscorum</i>	La Mothe St Héray, Fr.	
Platyarthridae	<i>Platyarthrus hoffmannseggii</i>	Chizé, Fr.	
	<i>Platyarthrus caudatus</i>	Scopello, It.	
	<i>Trichorhina tomentosa</i>	Baie Mahault, Gp.	
Porcellionidae	<i>Porcellio laevis</i>	Fr.	
	<i>Porcellio scaber</i>	Le Havre, Fr.	
	<i>Porcellio gallicus</i>	Montpellier, Fr.	
	<i>Porcellio dilatatus dilatatus</i>	Rom, Fr.	
Trachelipodidae	<i>Trachelipus rathkii</i>	Cosnes sur Loire, Fr.	
Tylidae	<i>Helleria brevicornis</i>	Ste Marguerite, Fr.	

Br. : Brésil, Dk. : Danemark, Es. : Espagne, Fr. : France, Gp. : Guadeloupe, Gr. : Grèce, It. : Italie, Tq. : Turquie, Tu. : Tunisie, UK : Grande Bretagne.

---

(ADN bactérien estimé à plus de 1 Mb - voir Sun *et al.* 2001), grâce à sa taille nettement plus faible que les autres. La totalité du protocole est en annexe 2.

Après le prélèvement des tissus de l'animal, ceux-ci sont plongés dans un tampon d'extraction adapté aux Crustacés terrestres : le STE (Sodium Tris-EDTA ; voir sa composition en annexe 2). Le tube contenant le tampon d'extraction est placé dans la glace pour éviter la dégradation de l'ADN.

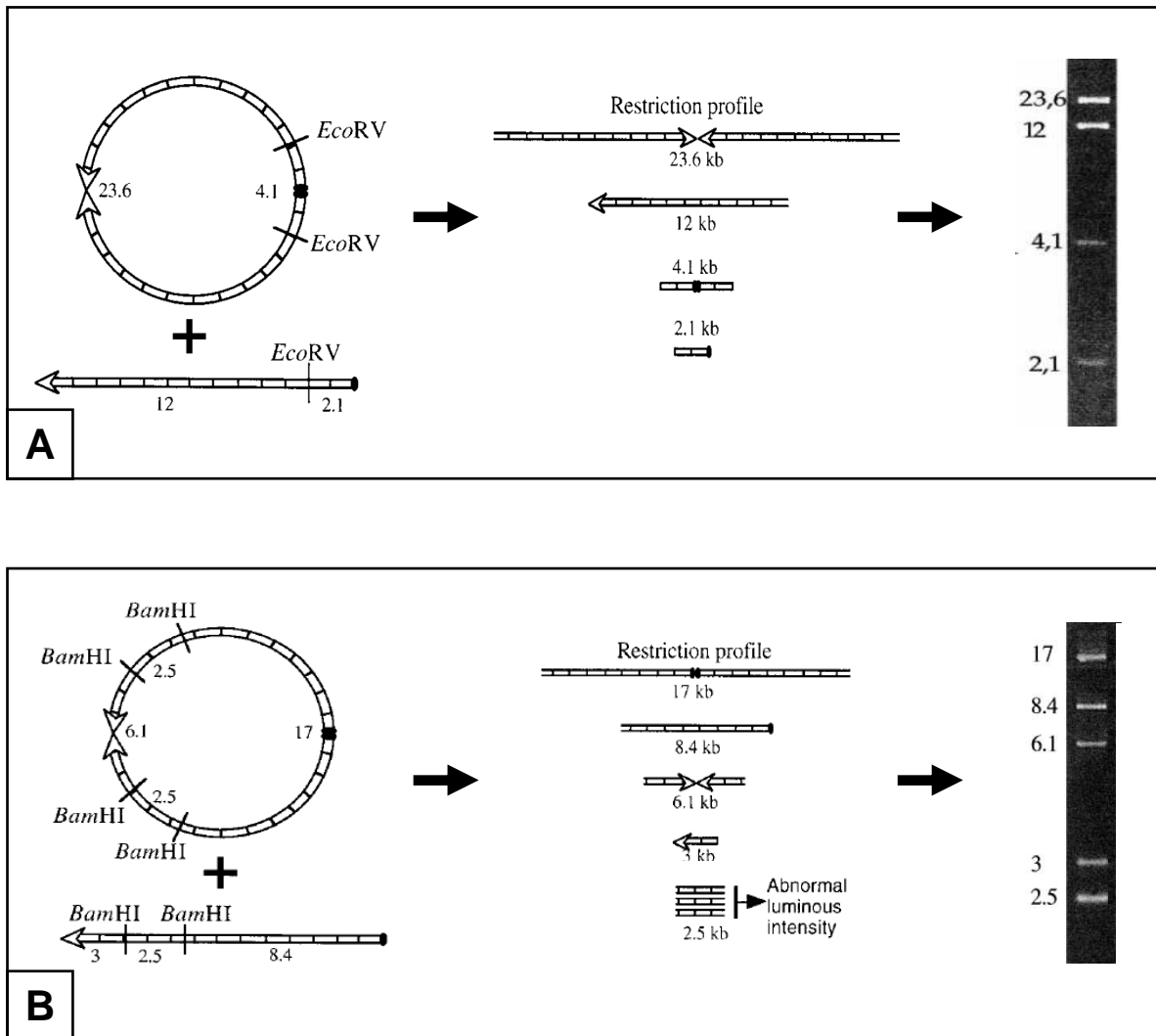
Les tissus sont ensuite broyés à l'aide d'un Dounce de type B auxquels on y ajoute par la suite le tampon de lyse (composition de ce tampon en annexe 2). L'ADNmt est ensuite lavé puis repris dans de l'eau bidistillée.

#### **4. Extraction d'ARN**

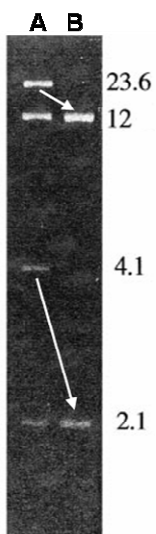
Un pool de plusieurs femelles issues de la même lignée maternelle est réalisé afin d'obtenir un maximum d'ARN. Les tissus gonadiques et nerveux des animaux sont broyés dans un mortier rempli d'azote liquide. La poudre obtenue est mélangée à un tampon de lyse, et un volume de phénol saturé en eau. La composition du tampon de lyse est :

- 10 mM Tris-HCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1% SDS

Après un deuxième lavage au phénol, afin d'éliminer le maximum de débris cellulaires, l'extraction d'ADN/ARN est précipité avec une solution 1 M d'Acétate de sodium (0,1 volume) et 2,5 volumes d'éthanol 100%. Après centrifugation, le culot d'ARN (contenant également de l'ADN) est repris dans de l'eau *RNAse free*.



**Figure III-1.** Interprétation des profils de restriction de l'ADNmt atypique d'*A. vulgare*. **A** : exemple de profil à quatre bandes issu d'une digestion sur un seul site de restriction (enzyme *EcoRV*). **B** : exemple de profil à cinq bandes issu d'une digestion sur deux sites de restriction (enzyme *BamHI*). D'après Raimond *et al.* (1999).



**Figure III-2.** Dénaturation du produit de digestion d'ADNmt atypique. La piste **A** présente le profil de restriction de l'ADNmt d'*A. vulgare* digéré par *EcoRV*. La piste **B** présente ce même profil ayant subi une dénaturation avant la migration. Les deux bandes issues des dimères migrent à une taille deux fois plus petite (flèches). D'après Raimond *et al.* (1999).

## **C. Protocole de RFLP et Southern Blot**

### **1. Digestion de l'ADNmt**

Après l'extraction de l'ADNmt issu de différentes lignées iso-femelles, l'ADNmt a été digéré par plusieurs enzymes de restriction afin d'en connaître la conformation. Pour cela, à chaque expérience de digestion, l'équivalent de l'ADNmt issu de 10 femelles (~5 µg d'ADNmt, dosé au NanoDrop – Thermo Scientific) a été digéré pendant 3 heures à 37°C avec 1,5µl d'enzyme + 0,5µl de RNase + 1,2µl de tampon de digestion + 0,8µl de BSA selon l'enzyme utilisée et en respectant les instructions du fournisseur.

Les profils de restriction des génomes mitochondriaux atypiques tel que celui d'*A. vulgare* sont aisément identifiables par rapport aux génomes mitochondriaux classiques et de forme circulaire. Alors que les génomes classiques de Métazoaires ne présentent en RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) qu'une bande lorsqu'il y a un seul site de restriction, deux bandes lorsqu'il y en a deux, *etc.*, la digestion des deux types moléculaires des génomes atypiques (monomères et dimères) produit des couples de bandes issus respectivement des monomères et des dimères, les bandes issues des dimères palindromiques étant de taille deux fois plus grandes que celles des monomères. Ainsi, lorsque l'ADNmt atypique est digéré avec une enzyme ne coupant que sur un seul site, quatre bandes sont obtenues (figure III-1A). En revanche, chaque site de restriction supplémentaire génère trois fragments supplémentaires de même taille, qui se superposent sur le gel en une seule bande lors de la migration. Cette bande qui possède une stœchiométrie anormale apparaît beaucoup plus fluorescente sur le gel. Ces profils présentent alors cinq bandes lorsqu'il y a deux sites de restriction, six bandes lorsqu'il y a trois sites et ainsi de suite (figure III-1B). Ainsi, pour les profils avec deux sites de restriction ou plus, les bandes avec une fluorescence plus élevée doivent être comptées trois fois pour obtenir une bonne estimation de la taille du génome.

### **2. Dénaturation des produits de digestion**

Des expériences de dénaturation par la chaleur des produits de digestion d'ADNmt ont été réalisées. Elles ont pour intérêt de vérifier le modèle atypique et la présence des dimères palindromiques. En effet, après la dénaturation de l'ADNmt digéré, les bandes comprenant les jonctions palindromiques se replient sur elles-mêmes et migrent deux fois plus loin dans un gel d'agarose, au même niveau que les bandes issues des monomères non dénaturés. En revanche, les bandes dénaturées issues des monomères restent à l'état de simple brin lors de la

migration et ne sont plus visibles sur le gel (figure III-2). Les dénaturations d'ADNmt se font après la digestion enzymatique, en plaçant les échantillons 5 minutes à 95°C, puis 5 minutes dans de la glace.

### 3. *Electrophorèses et Southern Blot*

Après la digestion des ADNmt par les enzymes de restriction, les produits de digestion ont été déposés dans des gels d'électrophorèses 1,2% d'agarose TEP 0,5X, et ont migré pendant 15 heures à 30V (après 30 minutes à 80V afin de faire pénétrer les grands fragments d'ADNmt dans le gel). Le marqueur de taille utilisé pour ces RFLP correspond à la digestion de l'ADN plasmidique du phage  $\lambda$  par l'enzyme de restriction *HindIII*. Après migration, les profils de restriction sont marqués au SYBR Green I (Lonza) puis révélés sous UV.

Après la séparation des fragments de restriction, les profils ont ensuite été transférés sur des membranes de nylon (Positive™ Membrane; Qbiogene) pour effectuer des southern blots. Pour cela les gels ont baigné dans trois bains successifs pendant 20 minutes :

1. Bain de dépurination (0,25 M HCl)
2. Bain de dénaturation (1,5 M NaCl ; 0,5 M NaOH)
3. Bain de neutralisation (1,0 M Tris ; 2,0 M NaCl ; pH 5)

Les profils ont ensuite été transférés grâce à une cuve à transfert sous vide (VacuGene XL from Pharmacia LKB Biotechnology ; Uppsala, Sweden) avec une solution de SSC 20X, pendant une heure et demi, puis l'ADNmt a été fixé sur la membrane à 80°C pendant 2 heures.

Les profils de restriction ont ensuite été hybridés en suivant le protocole présenté en annexe 3. La sonde utilisée est obtenue en amplifiant par PCR une partie du gène mitochondrial *16SARNr*. Cette partie du gène comportant des régions très variables entre les espèces (Michel-Salzat & Bouchon 2000), des sondes ont été faites de manière spécifique pour chaque famille d'Isopode étudiée. Pour amplifier cette portion de gène, des amorces spécifiques aux Isopodes ont été dessinées à partir des trois génomes mitochondriaux connus (*A. vulgare*, *L. oceanica* et *I. baltica*) :

- 16F : CGGTTTGA ACTCAAATCATGTG

- 16R : GCCTGTTTAACAAAACATC

Enfin, les Southern blots ont été révélés grâce à un phosphoimager (Storm from Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

## ***D. Amplification d'ADN et séquençage***

### ***1. Amplification par PCR***

Différentes réactions de PCR ont été réalisées au cours de ce travail. Ces réactions ont été réalisées en utilisant le mélange suivant : 5 µl de tampon 5X de GoTaq (Promega), 1,25 µl de désoxyribonucléotides (dNTPs - 8,6 mM), 0,125 µl d'amorces (100 mM) et 0,125 µl d'enzyme polymérase GoTaq, pour un volume final de 25 µl.

Les programmes de PCR ainsi que les amorces utilisées pour chacune des amplifications sont notés en annexe 4.

Lorsque les produits PCR étaient destinés à être séquencés, ces produits ont été purifiés en suivant la méthode de digestion ExoSAP. Cette méthode nécessite deux enzymes : l'Exonucléase I et la SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) pour éliminer les amorces et les désoxynucléotides non utilisés. Le protocole est le suivant : pour un produit de PCR, il est ajouté 1 µl de tampon SAP, 0,1 µl d'enzyme SAP et 0,1 µl d'enzyme ExoI. Le mélange est chauffé à 37°C pendant une heure, puis les enzymes sont désactivées en plaçant les échantillons 20 minutes à 80°C.

### ***2. Amplification par RT-PCR***

Préalablement à l'amplification par RT-PCR, les extractions d'ARN sont purifiées en procédant à un traitement à la DNase. Ce traitement permet d'éliminer toute trace d'ADN qui fausserait l'analyse de RT-PCR. Ainsi, pour 2-3 µg d'ARN est ajouté 1 µl de tampon DNase (10X), 1 µl RQ1 RNase free DNase (Promega) qsp 10 µl d'eau bidistillée. Le mélange est ensuite placé au bain marie pendant une heure à 37°C pour l'action de l'enzyme, puis 5 minutes à 70°C. Ensuite, l'ARN est précipité dans 2 volumes d'éthanol 100% et 0,1 volume d'Acétate de Sodium, centrifugé, et repris dans 4 µl d'eau RNase free.

La réaction de Reverse Transcriptase (RT) est ensuite réalisée avec le kit SuperScript III (Invitrogen). Pour cela nous avons utilisé 2-3 µg d'ARN, auxquels sont ajoutés 12,5 µl d'eau bidistillée et 0,5 µl (100 mM) d'amorce complémentaire du gène ciblé. Le mélange est placé 10 minutes à 70°C, puis directement placé dans de la glace. Toujours dans la glace, sont ajoutés 0,5 µl de RNase OUT, 4 µl de tampon RT 5X, 1 µl de DTT et 1 µl de dNTPs. Ce mélange est ensuite réparti en deux tubes : un premier tube dans lequel est ajouté 0,5 µl de RT SuperScript (Invitrogen) et un second tube témoin, dans lequel est ajouté de l'eau bidistillée. Les deux mélanges sont enfin déposés au bain-marie pendant une heure à 52°C.

Les réactions de PCR ont ensuite été réalisées à partir de l'ADNc (ADN complémentaire) obtenu. Pour 2 µl d'ADNc, 1 µl de dNTPs et 1 µl de chaque amorce (100 mM) ont été ajoutés (voir les séquences des amorces utilisées en annexe 5), ainsi que 0,25 µl d'enzyme GoTaq (Promega), 10 µl de tampon de réaction et 3 µl de MgCl<sub>2</sub> à 20 mM, pour un volume final de 50 µl. Le protocole de réaction était le suivant : 3 minutes à 95°C, suivie de 27 cycles de 20 secondes à 92°C, de 20 secondes à ~50°C (selon les amorces) et de 20 secondes à 72°C. Les produits de RT-PCR ont ensuite été clonés puis séquencés.

### **3. Clonage**

Les produits de RT-PCR ont donc été clonés avant leur séquençage. Pour cela, la ligation de ces produits a été effectuée avec le kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) suivant le protocole du fournisseur. Ces produits de ligation ont ensuite été transférés dans des bactéries super-compétentes par choc thermique (incubation 30 minutes dans la glace, suivie d'un choc thermique de 1 minute 30 dans un bain-marie à 42°C, puis replacés une minute dans la glace).

Ces bactéries ont ensuite été placées dans un milieu de culture (LB) sans ampicilline pendant 1 heure, puis finalement déposées dans une boîte de pétri contenant un milieu de culture, ainsi que de l'ampicilline, du XGal et de l'IPTG pour une incubation toute une nuit.

### **4. Séquençage**

Le séquençage des produits de PCR ou de clonage a été réalisé en suivant le protocole de Big Dye Terminator, présenté en annexe 6. Il a été réalisé sur un séquenceur ABI 3130 (Applied Biosystems).

## ***E. Utilisation de programmes bioinformatiques***

### ***1. Analyses des séquences nucléotidiques***

Les séquences nucléotidiques ont été analysées via le logiciel BioEdit (Hall 1999). Les séquences consensus des résultats de séquençage *forward* et *reverse* ont été réalisées grâce au logiciel Staden (Staden 1996).

### ***2. Programmes de recherche d'ARNt : tRNAscan-SE et ARWEN***

Ces logiciels qui proposent une recherche des gènes d'ARNt dans les génomes, nécessitent seulement une analyse en ligne, réalisable sur le site

---

<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/> pour le programme tRNAscan-SE (Lowe & Eddy 1997), et sur le site <http://130.235.46.10/ARWEN/> pour le programme ARWEN (Laslett & Canbäck 2008).

### **3. Programme de prédiction de code génétique : GenDecoder**

Ce logiciel permet l'analyse du code génétique des génomes mitochondriaux de Métazoaires. Dans notre étude nous avons réalisé l'analyse du code génétique des génomes complet ou incomplet des espèces d'Isopodes *Armadillidium vulgare*, *Ligia oceanica* et *Idotea baltica*. Ces analyses ont été réalisées en ligne sur le site <http://darwin.uvigo.es/software/gendecoder.html> (Abascal *et al.* 2006b) à partir des génomes disponibles en ligne sur GenBank. Pour exécuter ces analyses, le programme GenDecoder effectue automatiquement les alignements des 13 gènes mitochondriaux codant pour des protéines du génome à analyser avec de multiples génomes mitochondriaux d'autres espèces, disponibles dans GenBank. Il vérifie alors la présence des bons codons en fonction des acides aminés attendus. Ce programme assigne alors à chaque codon l'acide aminé le plus probable, ainsi que la fréquence d'utilisation de chaque codon dans le génome.

### **4. Programme de recherche de structures secondaires : RNAfold**

Ce logiciel permet une analyse de séquence pour retrouver les potentielles structures secondaires qui peuvent se former. Dans le cas de notre étude, l'analyse a été réalisée sur un fragment d'ADNmt et traitée avec les paramètres par défaut liés à l'ADN. Cette analyse a été réalisée en ligne, sur le site de Vienna RNA WebServers <http://rna.tbi.univie.ac.at/> (Hofacker 2003).



## **IV. Structure et évolution du génome mitochondrial atypique d'*Armadillidium vulgare* (Isopoda, Crustacea)**

### ***A. Organisation et composition de la région codante de l'ADNmt d'*A. vulgare****

#### **1. *Structure and Evolution of the Atypical Mitochondrial Genome of Armadillidium vulgare (Isopoda, Crustacea) - Marcadé et al. (2007) J. Mol. Evol. 65:651-659***

L'ADNmt des Métazoaires est généralement constitué d'une molécule double brin circulaire d'une taille comprise entre 15 et 20 kb. Chez le Crustacé Isopode *Armadillidium vulgare*, l'ADNmt est caractérisé par une taille particulièrement grande de ~42 kb, constitué par deux types moléculaires : des molécules circulaires de ~28 kb formées par association de deux monomères de ~14 kb, et des molécules linéaires de ~14 kb. Dans ce travail, nous avons séquencé après clonage la portion codante de l'unité monomérique fondamentale du génome mitochondrial d'*A. vulgare* (soit 13,858 kb, ce qui représente environ 99% du génome). Cette taille d'environ 14 kb du monomère place le génome mitochondrial d'*A. vulgare* parmi les plus petits ADNmt des Crustacés.

Les 13 gènes codant pour des protéines ainsi que les deux sous-unités ribosomales ordinairement observés dans les génomes mitochondriaux des Métazoaires ont été retrouvés, toutefois seuls 9 gènes d'ARNt (sur les 22 généralement décrits) ont pu être identifiés. Le génome mitochondrial d'*A. vulgare* montre une différence importante dans l'ordre des gènes par rapport au génome mitochondrial hypothétique de l'Arthropode ancestral. En revanche, il montre une extrême conservation de l'ordre et de l'orientation des gènes avec les Isopodes *Idotea baltica* et *Ligia oceanica*. L'absence de la région de contrôle (zone non-codante majeure de l'ADNmt) dans la partie séquencée du génome suggère sa présence au niveau des jonctions des dimères, ainsi qu'aux extrémités des monomères.

Le séquençage direct d'environ 20% du génome (réalisé sur sept portions distantes du génome et prises au hasard) montre que les différents monomères qui composent ce génome possèdent la même séquence nucléotidique. Ceci suggère qu'un système de conversion génique et/ou de dynamique de réplication entre dimères et monomères joue un rôle dans l'homogénéisation de la composition nucléotidique de ce génome. Néanmoins, un unique site polymorphique a été observé lors du séquençage direct. Il correspond à la deuxième base d'un

anticodon d'un gène d'ARNt, donnant ainsi un ARNt bivalent, alloaccepteur pour deux acides aminés : l'Alanine (UGC) et la Valine (UAC). Cette bivalence assure potentiellement la présence dans la mitochondrie de ces deux ARNt sur le même locus mitochondrial chez *A. vulgare*, sachant qu'aucun autre ARNt<sup>Ala</sup> et ARNt<sup>Val</sup> n'a été retrouvé ailleurs dans le génome. Cet exemple est le premier de ce type rapporté jusqu'ici et apporte une preuve empirique du modèle de « recrutement d'ARNt » : phénomène d'émergence d'un nouvel ARNt après mutation de l'anticodon d'un ARNt préexistant. Cette hétéroplasmie (présence de deux mitotypes au sein d'un même individu) a été retrouvée chez tous les individus d'*A. vulgare* testés, issus de populations d'origines différentes (Brésil, France, Grèce, Tunisie). Ceci indique certainement l'existence d'une force sélective maintenant au même locus ces deux ARNt nécessaires à la traduction mitochondriale.

Afin d'établir la répartition et la voie de transmission des deux types de molécules dans les tissus, nous avons analysé par RFLP la structure de l'ADNmt dans différents organes, en séparant les mâles et les femelles. Les dimères et les monomères ont été observés dans l'ensemble des échantillons, tant dans les tissus somatiques que dans les tissus gonadiques (ovaires et utricules) et pour les deux sexes (voir également les résultats complémentaires obtenus). Ces observations semblent confirmer la transmission uniparentale des deux molécules d'ADNmt d'*A. vulgare*.

## Structure and Evolution of the Atypical Mitochondrial Genome of *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Crustacea)

Isabelle Marcadé · Richard Cordaux · Vincent Doublet · Catherine Debenest ·  
Didier Bouchon · Roland Raimond

Received: 11 June 2007 / Accepted: 17 August 2007 / Published online: 29 September 2007  
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

**Abstract** The crustacean isopod *Armadillidium vulgare* is characterized by an unusual ~42-kb-long mitochondrial genome consisting of two molecules co-occurring in mitochondria: a circular ~28-kb dimer formed by two ~14-kb monomers fused in opposite polarities and a linear ~14-kb monomer. Here we determined the nucleotide sequence of the fundamental monomeric unit of *A. vulgare* mitochondrial genome, to gain new insight into its structure and evolution. Our results suggest that the junction zone between monomers of the dimer structure is located in or near the control region. Direct sequencing indicated that the nucleotide sequences of the different monomer units are virtually identical. This suggests that gene conversion and/or replication processes play an important role in shaping nucleotide sequence variation in this mitochondrial genome. The only heteroplasmic site we identified predicts an alloacceptor tRNA change from tRNA<sup>Ala</sup> to tRNA<sup>Val</sup>. Therefore, in *A. vulgare*, tRNA<sup>Ala</sup> and tRNA<sup>Val</sup> are found at the same locus in different monomers, ensuring that both tRNAs are present in mitochondria. The presence of this heteroplasmic site in all sequenced individuals suggests that the polymorphism is selectively maintained, probably because of the necessity of both tRNAs for maintaining proper mitochondrial functions. Thus, our results provide empirical evidence for the tRNA gene recruitment model of tRNA evolution. Moreover, interspecific comparisons showed that the *A. vulgare* mitochondrial gene order is highly derived compared to the putative ancestral arthropod

type. By contrast, an overall high conservation of mitochondrial gene order is observed within crustacean isopods.

**Keywords** Atypical mitochondrial genome · *Armadillidium vulgare* · Trimeric structure · Linear monomer · Gene conversion · Heteroplasmy · tRNA gene recruitment · Gene rearrangements · Isopod

### Introduction

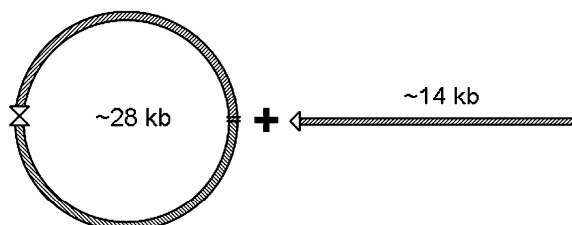
The role and function of mitochondrial products are well conserved across taxa but recent data from mitochondrial genomics research demonstrate that this conservation contrasts with an often-perplexing diversity in mitochondrial structure and gene order. In metazoans, the mitochondrial genome usually consists of a double-stranded circular DNA molecule that ranges in size from 15 to 20 kb and encodes a reduced number of essential mitochondrial products (Boore 1999). However, linear structures have been reported in various species, including unicellular eukaryotes, the liverwort *Marchantia polymorpha*, and several cnidarian species (Nosek and Tomaska 2003; Nosek et al. 1998; Oldenburg and Bendich 2001; Suyama and Miura 1968; Vahrenholz et al. 1993). Other structural exceptions include placozoan mitochondrial genomes that are 32–37 kb in length, owing to extensive length variation in intergenic spacer regions, open reading frames, and the presence of introns (Signorovitch et al. 2007). Although large animal mitochondrial genomes have been discovered, they are relatively rare and owe their large size to secondary expansions such as duplications, AT-rich regions, and multiple short tandem repeats (Boyce et al. 1989).

I. Marcadé (✉) · R. Cordaux · V. Doublet · C. Debenest ·  
D. Bouchon · R. Raimond  
Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de  
Crustacés, UMR CNRS 6556, Université de Poitiers,  
40 Avenue du Recteur Pineau, F-86022 Poitiers, France  
e-mail: isabelle.marcade@univ-poitiers.fr

Most mitochondrial genomes have retained only 13 polypeptide genes, all of which encode essential components of the oxidative phosphorylation metabolic pathway (Boore 1999). Notable exceptions include the absence of *Atp8* in nematodes and some mollusks (Boore 1999). The mitochondrial genome also encodes the *12S* and *16S rRNA* genes and the 22 tRNA genes required for mitochondrial protein synthesis (Boore 1999). In vertebrates, mitochondrial gene order remains practically invariant, but there is substantial variation in invertebrate phyla. In arthropods, complete or partial mitochondrial DNA (mtDNA) sequences have been determined for 69 hexapods, 23 chelicerates, 6 myriapods, and 34 crustaceans as of June 2007 (NCBI at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Gene organization substantially varies both among (Boore and Brown 1998; Boore et al. 1995) and within major arthropod groups. Hence, many gene rearrangements relative to the putative arthropod primitive mitochondrial gene order have been reported within crustaceans (Hickerson and Cunningham 2000; Machida et al. 2002; Miller et al. 2004, 2005; Ogoh and Ohmiya 2004; Sun et al. 2005; Tjensvoll et al. 2005), including the two isopods *Ligia oceanica* and *Idotea baltica* (Kilpert and Podsiadlowski 2006; Podsiadlowski and Bartolomaeus 2006).

The isopod *Armadillidium vulgare* presents yet another kind of unusual mitochondrial genome, consisting of a remarkable length of ~42 kb that is not consistent with amplification of sequence fragments or additional copy number of repeated sequences (Raimond et al. 1999). Instead, the *A. vulgare* mitochondrial genome consists of two molecules co-occurring in mitochondria: a circular ~28-kb dimer formed by two ~14-kb monomers fused in opposite polarities and a linear ~14-kb monomer (Fig. 1) (Raimond et al. 1999). It has been hypothesized that the linear and circular molecules are not at equilibrium, and that the circular state might repeatedly be generated from the linear state, although the actual replication mechanism of this atypical mitochondrial genome currently is unknown (Raimond et al. 1999).

Another distinctive feature of *A. vulgare* is that mitochondria collocate within the cytoplasm with obligate



**Fig. 1** Schematic representation of the atypical structure of *Armadillidium vulgare* mitochondrial genome proposed by Raimond et al. (1999)

intracellular *Wolbachia* bacteria that are responsible for the feminization of genetic males into functional females (Bouchon et al. 1998; Cordaux et al. 2004; Rigaud et al. 1997). There is evidence that mtDNA variability is influenced by the presence of *Wolbachia* in *A. vulgare* populations (Cordaux et al. 2004; Grandjean et al. 1993; Rigaud et al. 1999; Souty-Grosset et al. 1992), which raises the question about a possible link between the presence of *Wolbachia* and the atypical structure of the mitochondrial genome in *A. vulgare*.

To gain new insight into the structure and evolution of the atypical mitochondrial genome of *A. vulgare* and the extent of its association with *Wolbachia*, we sequenced the fundamental monomeric unit of the *A. vulgare* mitochondrial genome. We show that nucleotide sequences of the monomers constituting *A. vulgare* mitochondrial genome are virtually identical. This suggests that gene conversion and/or replication processes play an important role in shaping nucleotide sequence variation in this mitochondrial genome. We also identified an unusual dual tRNA locus in which tRNA<sup>Ala</sup> and tRNA<sup>Val</sup> genes are found at the same locus in different monomers. Thus, our results provide empirical evidence for the tRNA gene recruitment model of tRNA evolution (Higgs et al. 2003; Lavrov and Lang 2005). Furthermore, our results highlight several gene rearrangements relative to the putative ancestral arthropod mitochondrial gene order. However, comparisons with *I. baltica* and *L. oceanica* (Kilpert and Podsiadlowski 2006; Podsiadlowski and Bartolomaeus 2006) suggest that the mitochondrial gene order found in *A. vulgare* is conserved among isopods.

## Materials and Methods

### Samples and mtDNA Extraction

*A. vulgare* individuals used for mitochondrial genome sequencing were obtained from an isofemale line (i.e., a lineage of individuals all descended from a single female) maintained in our laboratory (strain ZN 540; originally collected in Celles-sur-Belle, western France). Individuals used for restriction profile analyses were obtained from an isofemale line maintained in our laboratory (strain WX 1107; originally collected in Helsingor, Denmark). By using isofemale lines, we are able to pool mtDNA extracts from various individuals of each isofemale line to obtain sufficient amounts of mtDNA for analyses. The six individuals used for nucleotide sequence heteroplasmy analyses originated from four different sources: three individuals from lab strain ZN 540, one individual from lab strain ZU (originally collected in Nice, southeastern France), and two wild-caught individuals collected in

Chizé (western France) and Porto Alegre (Brazil). Mitochondrial DNA was extracted from ovaries (for genome sequencing) and gonads, fat tissues, and nervous system (for restriction profile and heteroplasmy analyses) using an alkaline lysis protocol, as previously described (Souty-Grosset et al. 1992).

#### Mitochondrial Genome Sequencing

MtDNA was digested separately with the two restriction endonucleases, *Bgl*II and *Hinc*II. Restriction fragments were inserted in the dephosphorylated pUC 19 vector opened by an adequate enzyme: *Bam*HI (complementary to *Bgl*II) and *Hinc*II (generating blunt ends). Next, we subcloned the large cloned fragment obtained from *Bgl*II digestion (~9.6 kb) by digesting the insert with the restriction enzyme *Hind*III to create smaller fragments. All ligation products were then used to transform competent bacteria (*Escherichia coli* Xblue1 F' Eurogentec) and colonies were grown overnight.

Plasmid DNA was extracted and purified with Wizard plus miniprep Kit (Promega) and then sequenced using the dideoxy terminator method. Inserts were sequenced using the universal sequencing primers M13F and M13R. For long restriction fragments, intermediate primers were designed by hand as part of a primer-walking strategy (Table 1). Sequencing products were precipitated with sodium acetate and absolute ethanol and resolved on an ABI Prism 310 automated DNA sequencer (Applied Biosystems).

#### Genome Annotation

Sequence assemblage and alignments were performed using the BioEdit software (Hall 1999). Gene identity was determined by BLAST searches of GenBank (Altschul et al. 1997). Start and stop codons of protein-coding genes were identified as previously described (Podsiadlowski and Bartolomaeus 2006). tRNAs were identified using the program tRNAscan-SE (Lowe and Eddy 1997) or by visual inspection of suspected regions after alignment with previously annotated isopod mitochondrial genomes. The partial DNA sequence (13,858 bp) of the monomer unit of *A. vulgare* mitochondrial genome was deposited in GenBank under accession number EF643519.

#### Sequence Conservation of the Monomer Unit

Based on the monomer sequence of *A. vulgare* mitochondrial genome, seven genomic regions were randomly

**Table 1** List of PCR primers used to determine *Armadillidium vulgare* mitochondrial genome sequence

Start position (bases)	Primer sequence (5' > 3')	Direction
13641	GAGATAAGTCGTAACAAAGTAG	Forward
13392	TATCGCTTATGAGACAGGTC	Reverse
12937	GAGGCGGGCCTCTGTTACAGGC	Forward
12565	AACCCTAGCTGATAGACAGC	Forward
12122	CACAGAGTATACGCAAGTGG	Reverse
11714	CCCACATTCAAATGGGAGAG	Reverse
11474	GTCAATACCAAGCTGCTGCTC	Reverse
10934	GCACCACATCACGCCATCATTG	Reverse
9912	GAGAGTTCCACAAATAGGTCC	Forward
8833	CCTCAACACTTCTAGGATTAG	Forward
8404	GGTTTTGTAGTATGAGCCAC	Forward
7965	CTCACAGAGGTGCATCTGTA	Forward
7656	TCTAAGGCAGTCCCAACAG	Reverse
6451	GAACCCACCAGCTTAATTAGC	Reverse
5785	GCTACCTTAGCACAGTTAGG	Forward
5459	GAGGGCTGCCTAAAATAG	Forward
5381	GATAGAAACCAACCTGGCTC	Forward
4893	GGGTTGCTAGGGAGTATGATATGC	Forward
4304	GGAAACAATCTTGATCGTG	Forward
3982	GGAAGAGATGCTATTACTGTG	Forward
3493	CCAGAAGAGCAAAATCCATGACCG	Forward
2860	AGAAGTATTTAGAGGTGCTGG	Forward
2273	CCCTATTTTTTCGGGCATCTTG	Reverse
980	ACCATTTGCGTGAGCAGTGCG	Forward
223	GCGCTAAACCAGTTGAAGCACC	Reverse

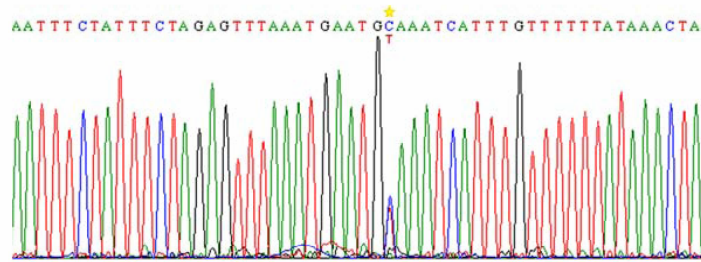
selected and primer pairs were designed using the software Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000). PCR reactions were performed on total DNA and the PCR products were directly sequenced to reveal heteroplasmic sites arising from nucleotide substitutions on different monomers of the mitochondrial genome.

#### mtDNA Digestions and Restriction Profiles

Total mtDNA from germinal and somatic tissues of both male and female individuals (1–3 µg in 12 µl) were digested with three endonucleases: *Bam*HI, *Eco*RI, and *Xho*I. All digestions were carried out using 5 units of enzyme incubated at 37°C for 3 h. Samples were then mixed with a gel-loading buffer and digested mtDNA was run on a 1.2% agarose gel in Tris EDTA phosphate buffer for 15 h at 30 V. Gels were stained with SYBR Green I and examined under UV light.



**Fig. 2** Partial sequence trace file obtained after direct sequencing of a portion of *Armadillidium vulgare* mtDNA. Above the peaks are the deduced nucleotides. The heteroplasmic site (C/T) is highlighted by the yellow star



## Results and Discussion

### Atypical Genome Structure and Size

We determined 13,858 bp of the fundamental monomer sequence of the mitochondrial genome of *A. vulgare*. Given an expected global monomer size of ~14 kb (Raimond et al. 1999), we estimate that our sequence covers ~99% of the entire monomer sequence. We were not able to determine the nucleotide sequence between *12S rRNA* and *Cytb* despite several attempts. We interpret this result as further evidence for the atypical structure of *A. vulgare* mitochondrial genome (Raimond et al. 1999). Indeed, this genome is thought to consist of a circular ~28-kb dimer, formed by two ~14-kb monomers fused in opposite polarities, and a linear ~14-kb monomer (Raimond et al. 1999). Under this model, palindromic sequences are predicted to occur at the junction zones of monomers constituting the circular dimer structure (Fig. 1). Along with the unknown open ends of the linear monomer structure, it is not surprising under this model of mitochondrial structure that determination of the sequence located at the extremities of the monomer unit may be problematic. Correlatively, these results suggest that the junction zone between monomers of the dimer structure is located in or near the control region. This view is supported by two lines of evidence: (i) the control region is not included in the ~13.9-kb mitochondrial sequence we obtained, and (ii) the control region is located between *12S rRNA* and *Cytb* in the circular mitochondrial genome of the isopod *L. oceanica* (Kilpert and Podsiadlowski 2006).

With a fundamental unit ~14 kb in length, *A. vulgare* mtDNA falls in the lower range of crustacean mitochondrial genomes that generally range between ~14.6 and ~18.4 kb (Lavrov et al. 2004; Machida et al. 2002), while the smallest-sized mitochondrial genome known in arthropods is that of the collembolan *Onychiurus orientalis* with ~13.0 kb (Cook et al. 2005). Even within isopod crustaceans, there appears to be mitochondrial genome size variation, since the complete mitochondrial genome of *L. oceanica* is ~15.3 kb long (Kilpert and Podsiadlowski 2006). Overall, these results suggest that the functional unit

of *A. vulgare* mtDNA has experienced size reduction compared to other species.

### Extreme Nucleotide Conservation Among Monomer Unit Sequences

The coexistence of various monomer units as constituents of the mitochondrial genome of *A. vulgare* raises the question of the extent of their relatedness. To address this issue, we directly sequenced seven randomly selected regions along the monomer unit, amplified by PCR from total DNA. This approach allowed us to simultaneously sequence homologous regions from both molecule types (i.e., linear monomers and circular dimers) and identify polymorphic sites among monomers. Overall, 2709 bp was sequenced using this strategy, which covers ~20% of the monomer sequence. A single nucleotide position was found to be polymorphic, as shown by a double signal apparent at one position in a sequence trace file (Fig. 2). Therefore, the different monomers appear to exhibit extremely low nucleotide divergence. This conclusion is further supported by the fact that no nucleotide polymorphism among monomers was detected based on (i) an RFLP analysis of the mitochondrial genome of *A. vulgare* (Raimond et al. 1999) and (ii) direct sequencing of ~400 bp of the *16S rRNA* gene within each of several *A. vulgare* individuals (Cordaux et al. 2004; Michel-Salzat and Bouchon 2000).

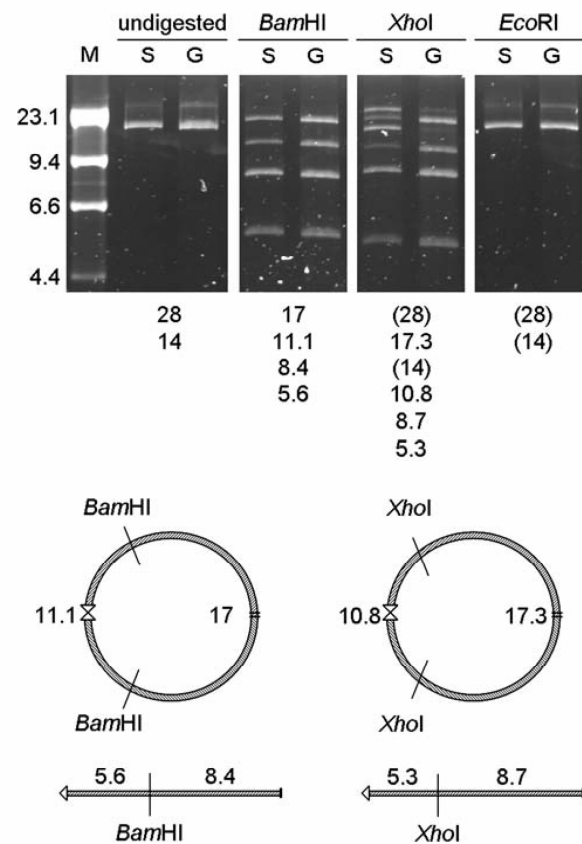
The extreme nucleotide conservation among monomer sequences suggests that recurrent gene conversion events may contribute to maintain sequence homogeneity among monomers. This process of concerted evolution has recently been suggested to represent an important evolutionary force in animal mtDNA (Tatarenkov and Avise 2007). Alternatively, it is possible that replication preferentially takes place on a particular structure (e.g., the monomer in the linear state) and that the other structure (e.g., the dimeric circular state) is repeatedly generated from the structure that replicates (Raimond et al. 1999). The two aforementioned explanations (gene conversion and structure-biased replication) are not mutually exclusive.

Interestingly, the heteroplasmic site we detected by direct sequencing of the monomer units displays two signals of roughly equal intensity, each of which is roughly half the intensity of the surrounding positions showing single signals (Fig. 2). Quantitatively, this observation suggests that monomer units exhibiting nucleotide C or T at the heteroplasmic site were in equal or nearly equal quantities in the sequencing reaction. This could be explained if the proportions of monomers and dimers are different, as previously suggested based on densitometry results following *A. vulgare* mtDNA digestion (Raimond et al. 1999). Alternatively, our sequencing results could be explained by two coexisting populations of mtDNA sequences, each with equal proportions of monomer and dimer structures in *A. vulgare* individuals. Also, analogous to the doubly uniparental mitochondrial inheritance in mussels in which males are normally heteroplasmic and females homoplasmic (Zouros 2000), it is conceivable that the monomer and dimer structures are characterized by different inheritance patterns, for example, in germinal vs. somatic tissues and/or in male vs. female individuals.

To gain new insight into tissue- and sex-specific inheritance patterns of mtDNA in *A. vulgare*, we extracted mtDNA separately from gonads and somatic tissues in both male and female individuals. Then we performed single digestions with three different restriction enzymes (*EcoRI*, *BamHI*, and *XhoI*) and compared the restriction profiles of the different samples. Two bands of expected ~28- and ~14-kb sizes were observed in all undigested mtDNA control samples, as well as in *EcoRI*-digested samples (suggesting that there is no *EcoRI* restriction site in these samples), whatever tissue and sex type (Fig. 3). *BamHI* and *XhoI* digestions confirmed these results since (i) identical profiles were obtained whatever tissue and sex type digested with each enzyme, and (ii) the profiles obtained with each enzyme were both consistent with the expected atypical mitochondrial structure (Fig. 3). These results indicated that the ~28-kb dimer and ~14-kb monomer are both present in germinal and somatic tissues, in both males and females, thus ruling out a mussel-like system of mitochondrial inheritance in *A. vulgare*.

#### Dual tRNA Locus

Strikingly, the heteroplasmic site identified in Fig. 2 happens to correspond to the position that specifies a tRNA anticodon. Specifically, the C/T nucleotide polymorphism predicts an alloacceptor tRNA change involving tRNA<sup>Val</sup> and tRNA<sup>Ala</sup>. In comparison, tRNA<sup>Ala</sup> is present at the corresponding site in the two isopods *I. baltica* and *L. oceanica* (Kilpert and Podsiadlowski 2006; Podsiadlowski and Bartolomeaus 2006), suggesting that the ancestral



**Fig. 3** Digestion profiles of *Armadillidium vulgare* mtDNA using female somatic (S) and germinal (G) tissues. Results for males were identical (data not shown). M: molecular ladder (sizes in kb shown on the left). Approximate band sizes (kb) are shown below profiles (see Raimond et al. 1999); values in brackets indicate incompletely digested bands. Schematics at the bottom: interpretations of the *BamHI* and *XhoI* digestion profiles, consistent with the atypical structure of the *A. vulgare* mitochondrial genome (see Fig. 1)

tRNA at this locus in *A. vulgare* was tRNA<sup>Ala</sup>. Subsequently, a mutation occurred at this site in an *A. vulgare* monomer, resulting in the presence of tRNA<sup>Val</sup> and tRNA<sup>Ala</sup> at the same locus in different monomers, ensuring that both tRNAs are present in mitochondria.

To test whether the substitution is specific to the sequenced individual or shared with other *A. vulgare* individuals, we directly sequenced the tRNA<sup>Val/Ala</sup> locus in five additional *A. vulgare* individuals of different origins. All individuals were found to be heteroplasmic at the previously identified heteroplasmic position. Because it is highly unlikely that an identical mutation would have occurred independently at the same site in all individuals analyzed, we conclude that the mutation most likely occurred in the ancestor of these individuals. The simplest explanation for the sharing of an ancestral polymorphism in all these individuals drawn from different populations is

that it is selectively maintained, probably because of the necessity of both tRNAs for maintaining proper mitochondrial functions.

Because no other tRNA<sup>Val</sup> locus was identified by the program tRNAscan-SE (Lowe and Eddy 1997), we visually inspected *A. vulgare* mitochondrial genome. No tRNA<sup>Val</sup> gene could be identified, suggesting that it has been lost or that it is degraded beyond recognition. Overall, our results provide empirical evidence for the tRNA gene recruitment model of tRNA evolution (Higgs et al. 2003; Lavrov and Lang 2005). Indeed, this model proposes that novel tRNA genes may evolve after duplication of pre-existing tRNA genes and point mutations subsequently occurring at anticodon positions that change tRNA amino acid identity. In *A. vulgare*, not only can duplications occur within monomers, but the presence of a three-monomer atypical mitochondrial structure actually triples the number of available tRNA genes in each mitochondrial genome, making *A. vulgare* an ideal system for gene recruitment. This is because a point mutation occurring in a tRNA gene of a given monomer and giving rise to a new tRNA can be generated without prior requirement for tRNA gene duplication, since other monomers that lack the mutation can continue to encode the ancestral tRNA gene. In *A. vulgare*, the mutation resulting in the dual tRNA<sup>Val/Ala</sup> was probably selectively advantageous since it has presumably been maintained for a long evolutionary period, at least long enough to lead to deletion or advanced degradation of the putative ancestral tRNA<sup>Val</sup> of *A. vulgare*. On the long term, such dual tRNA structure may in turn justify the evolutionary conservation of the two molecules types (i.e., linear monomer and circular dimer) at appropriate proportions in *A. vulgare*.

These results have interesting implications with respect to the processes that maintain extreme nucleotide conservation among monomer sequences, involving gene conversion and/or replication mechanisms (see above). Indeed, if replication was preferentially taking place on a particular structure (e.g., the monomer in the linear state) and that the other structure (e.g., the dimeric circular state) was repeatedly generated from the structure that replicates (Raimond et al. 1999), no ancestral polymorphism could be maintained in *A. vulgare* mitochondria. On the other hand, if gene conversion is responsible for the homogeneity of monomer sequences, then it is conceivable that strong selective constraints maintaining a polymorphism required for tRNA functionality could overcome the effects of gene conversion in this region of the mitochondrial monomer. In any event, further investigations are needed to elucidate the evolutionary processes governing *A. vulgare* mitochondrial nucleotide sequence evolution. For example, it would be desirable to sequence the control region, junction zones of the dimer structure, and ends of the linear structure of *A.*

*vulgare* mitochondrial genome, as this could yield new insight into replication mechanisms. Other future directions include generation of additional mitochondrial sequence data to better understand patterns of nucleotide sequence evolution and inheritance in *A. vulgare* mtDNA.

#### Genome Base Composition

Analysis of nucleic acid composition indicated a strong bias in *A. vulgare* mitochondrial genome toward A+T nucleotides, which represent 71.2% of the bases, vs. 28.8% of G+C nucleotides. This high A+T value is at the upper range among crustaceans, where values for complete mtDNA sequence range from 60.8% in *L. oceanica* to 74.9% in *Geothelphusa dehaani* (Ivey and Santos 2007; Kilpert and Podsiadlowski 2006; Segawa and Aotsuka 2005). The most frequent nucleotide was the purine T (37.1%). This overall A+T richness in *A. vulgare* mitochondrial genome may also explain why we could not detect the mtDNA origin of replication, as it is known to be a single, large, A+T-rich noncoding region of the mtDNA genome (Wolstenholme 1992).

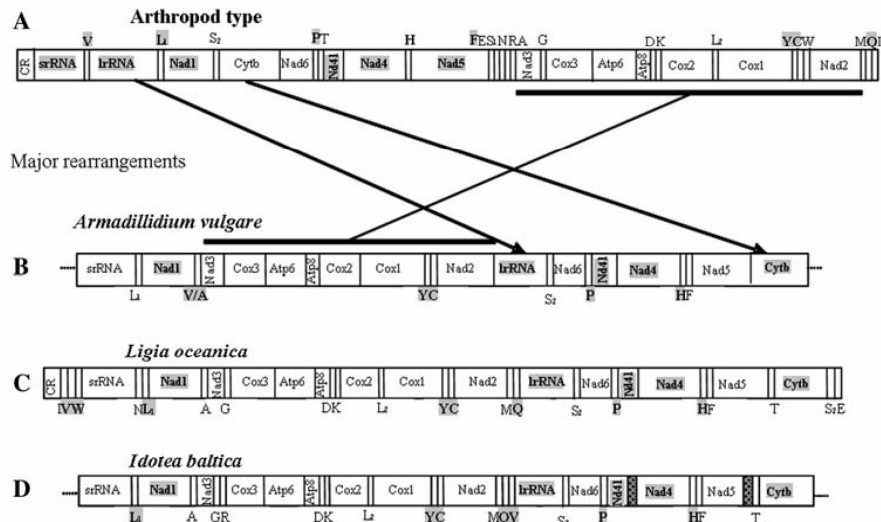
#### Mitochondrial Gene Rearrangements

The gene order of *A. vulgare* mitochondrial monomer is shown in Fig. 4. Comparison with the putative ancestral arthropod mitochondrial genome (Shao et al. 2003) revealed several gene rearrangements in *A. vulgare*. The first rearrangement involved the *16S rRNA* gene which in *A. vulgare* is translocated between *Nad2* and *Nad6*, whereas it is located between *12S rRNA* and *Nad1* in the arthropod type (Fig. 4). The latter gene arrangement is considered ancestral for insects and crustaceans (Boore et al. 1998; Hwang et al. 2001). Similarly, a bloc of seven contiguous genes (*Nad3*, *Cox3*, *Atp6*, *Atp8*, *Cox2*, *Cox1*, and *Nad2*) has been translocated between *Nad1* and *16S rRNA* in *A. vulgare* (Fig. 4). Another rearrangement involved *Cytb* which has been translocated near *Nad5* in *A. vulgare* (Fig. 4). Furthermore, a bloc including *Nad5*, *Cytb*, and tRNA<sup>Phe</sup> has been inverted to the opposite strand of the usual strand. Therefore, the mitochondrial gene order of *A. vulgare* appeared highly derived compared to the putative ancestral arthropod type.

By contrast, comparison of *A. vulgare* genome structure with that of *L. oceanica* and *I. baltica* (Kilpert and Podsiadlowski 2006; Podsiadlowski and Bartolomeaus 2006) indicated an overall high conservation of mitochondrial gene order within crustacean isopods (Fig. 4). In fact, all gene rearrangements noted above in *A. vulgare* relative to the arthropod type are shared with *I. baltica* and *L.*



**Fig. 4** Comparison of mitochondrial gene order in various species: putative ancestral arthropod type (A) and the isopods *Armadillidium vulgare* (B), *Ligia oceanica* (C), and *Idotea baltica* (D). Lines and arrows indicate the major gene order rearrangements between the different species. Gene names encoded on the (–) strand are shown in gray



*oceanica*. However, *A. vulgare* apparently differs from the two other isopods in the position of tRNA<sup>Val</sup>, which is located between *Nad1* and *Nad3* in *A. vulgare*, whereas tRNA<sup>Ala</sup> is present at the corresponding site in *I. baltica* and *L. oceanica*. The position of tRNA<sup>Val</sup> appears quite variable in isopods, as it turns out to be located on three different positions in the three isopod mitochondrial genomes from *A. vulgare*, *I. baltica*, and *L. oceanica*. Therefore, it may represent a character of interest for resolving phylogenetic questions related to isopod crustaceans.

#### Concluding Remarks

Mitochondrial genome sequence information for the three isopod species *A. vulgare* (this study), *L. oceanica* (Kilpert and Podsiadlowski 2006), and *I. baltica* (Podsiadlowski and Bartolomaeus 2006) indicates that they all share globally similar gene orders. This suggests a relatively well-conserved gene order in isopod mtDNA, distinct from the mitochondrial gene order reported in Decapoda and other Malacostraca. However, isopod mitochondrial genomes differ in their organization, since *A. vulgare* possesses an unusual mitochondrial genome consisting of a ~14-kb linear monomer and a ~28-kb circular dimer (Raimond et al. 1999). By contrast, *L. oceanica* is characterized by a typical ~15.3-kb circular mitochondrial genome (Kilpert and Podsiadlowski 2006), although both *A. vulgare* and *L. oceanica* belong to the same suborder Oniscidea (Table 2). On the other hand, the mitochondrial genome of *I. baltica* (suborder Valvifera) is suspected to exhibit an atypical structure that may resemble that of *A. vulgare* (Podsiadlowski and Bartolomaeus 2006). These

**Table 2** Comparison of the classification, mitochondrial genome structure and *Wolbachia* infection status (Bouchon et al. 1998) of three isopod species

Isopod species	<i>Armadillidium vulgare</i>	<i>Ligia oceanica</i>	<i>Idotea baltica</i>
Suborder	Oniscidea	Oniscidea	Valvifera
Mitochondrial genome structure	Atypical	Typical	Probably atypical
<i>Wolbachia</i> infection	Yes	Yes	No

observations suggest that atypism of mitochondrial genome structure is not correlated with species phylogeny. If so, one might speculate that mitochondrial genome structure may have evolved multiple times independently toward atypical organizations in various isopod species. However, further studies of the taxonomic distribution of atypical mitochondrial structures among isopod species will be necessary before this question can be resolved.

Given that structural atypism of the mitochondrial genome such as observed in *A. vulgare* apparently so far seems restricted to isopod species, the question arises as to what factor(s) may cause this atypism to occur in unrelated isopod species such as *A. vulgare* and *I. baltica*. Interestingly, many isopod species are known to be infected by the intracellular endosymbiont *Wolbachia* which collocate with mitochondria in host cytoplasm (Bouchon et al. 1998; Cordaux et al. 2001; Rigaud et al. 1997). Based on these observations, it could be hypothesized that the presence of *Wolbachia* might somehow be linked to atypical mitochondrial genome organization. However, according to the three isopod species for which information is available on both mitochondrial genome organization and *Wolbachia* infection status, there apparently is no correlation between

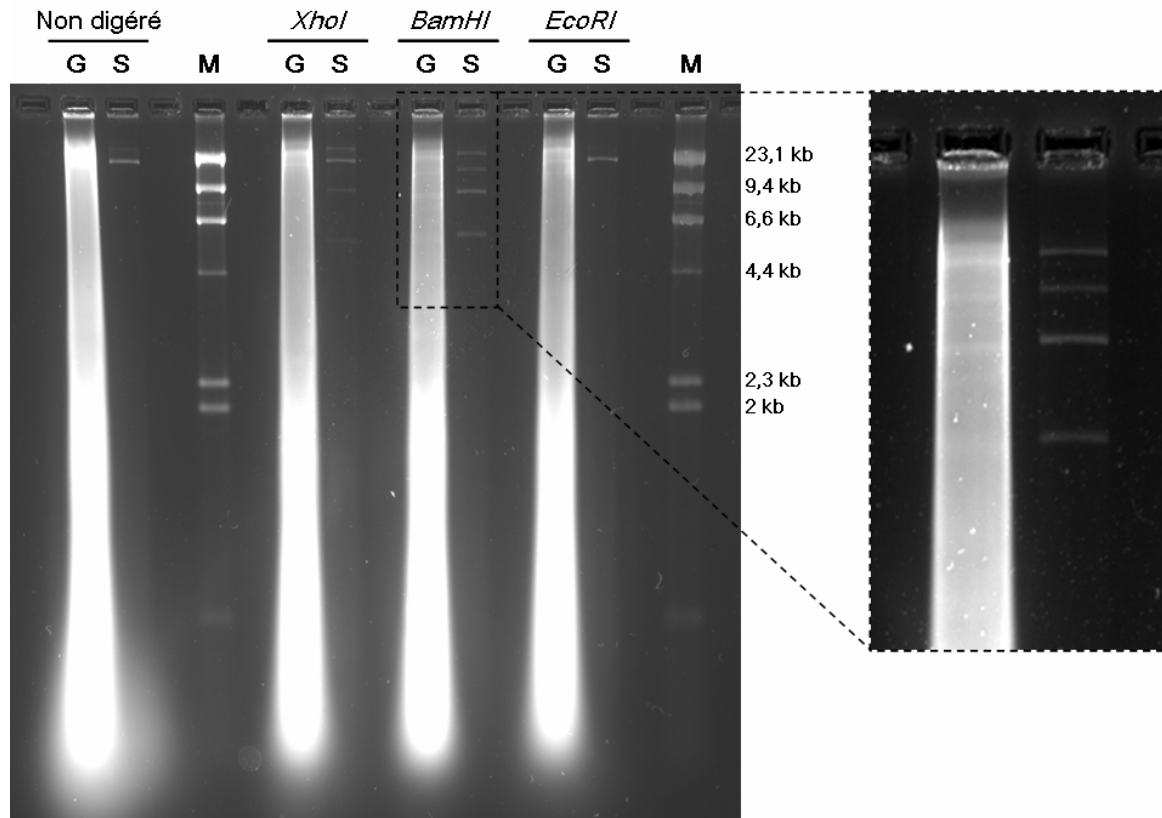
the two factors (Table 2). Moreover, other arthropods infected by *Wolbachia* do not exhibit atypical mitochondrial genomes. Thus, a contribution of *Wolbachia* to isopod mitochondrial atypism seems questionable. In any event, our results highlight the relevance of conducting further investigations of isopod mitochondrial evolution, with the aim of uncovering the evolutionary forces that make this crustacean group to be so prone to mitochondrial genome structure plasticity.

**Acknowledgments** We thank Nicolas Galtier and two anonymous reviewers for comments on an early version of the manuscript, Pierre Grève and Mathieu Sicard for constructive discussions, Yves Caubet and Sébastien Verne for providing samples, and Daniel Guyonnet for technical assistance. This research was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27:1767–1780
- Boore JL, Brown WM (1998) Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr Opin Genet Dev* 8:668–674
- Boore JL, Collins TM, Stanton D, Daehler LL, Brown WM (1995) Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature* 376:163–165
- Boore JL, Lavrov DV, Brown WM (1998) Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392:667–668
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc Biol Sci* 265:1081–1090
- Boyce TM, Zwick ME, Aquadro CF (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics* 123:825–836
- Cook CE, Yue Q, Akam M (2005) Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic. *Proc Biol Sci* 272:1295–1304
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Bouchon D (2001) *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J Evol Biol* 14:237–243
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D (2004) Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity* 93:78–84
- Grandjean F, Rigaud T, Raimond R, Juchault P, Souty-Grosset C (1993) Mitochondrial DNA polymorphism and feminizing sex factors dynamics in a natural population of *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Genetica* 92:55–60
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hickerson MJ, Cunningham CW (2000) Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, anomura). *Mol Biol Evol* 17:639–644
- Higgs PG, Jameson D, Jow H, Rattray M (2003) The evolution of tRNA-Leu genes in animal mitochondrial genomes. *J Mol Evol* 57:435–445
- Hwang UW, Friedrich M, Tautz D, Park CJ, Kim W (2001) Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* 413:154–157
- Ivey JL, Santos SR (2007) The complete mitochondrial genome of the Hawaiian anchialine shrimp *Halocaridina rubra* Holthuis, 1963 (Crustacea: Decapoda: Atyidae). *Gene* 394:35–44
- Kilpert F, Podsiadlowski L (2006) The complete mitochondrial genome of the common sea slater, *Ligia oceanica* (Crustacea, Isopoda) bears a novel gene order and unusual control region features. *BMC Genomics* 7:241
- Lavrov DV, Lang BF (2005) Transfer RNA gene recruitment in mitochondrial DNA. *Trends Genet* 21:129–133
- Lavrov DV, Brown WM, Boore JL (2004) Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan)crustacean relationships. *Proc Biol Sci* 271:537–544
- Lowe TM, Eddy SR (1997) tRNAscan SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* 25:955–964
- Machida RJ, Miya MU, Nishida M, Nishida S (2002) Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda). *Mar Biotechnol (NY)* 4:406–417
- Michel-Salzat A, Bouchon D (2000) Phylogenetic analysis of mitochondrial LSU rRNA in oniscids. *CR Acad Sci III* 323:827–837
- Miller AD, Nguyen TT, Burrige CP, Austin CM (2004) Complete mitochondrial DNA sequence of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Crustacea: Decapoda: Parastacidae): a novel gene order revealed. *Gene* 331:65–72
- Miller AD, Murphy NP, Burrige CP, Austin CM (2005) Complete mitochondrial DNA sequences of the decapod crustaceans *Pseudocarcinus gigas* (Menippidae) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae). *Mar Biotechnol (NY)* 7:339–349
- Nosek J, Tomaska L (2003) Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Curr Genet* 44:73–84
- Nosek J, Tomaska L, Fukuhara H, Suyama Y, Kovac L (1998) Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends Genet* 14:184–188
- Ogoh K, Ohmiya Y (2004) Complete mitochondrial DNA sequence of the sea-firefly, *Vargula hilgendorffii* (Crustacea, Ostracoda) with duplicate control regions. *Gene* 327:131–139
- Oldenburg DJ, Bendich AJ (2001) Mitochondrial DNA from the liverwort *Marchantia polymorpha*: circularly permuted linear molecules, head-to-tail concatemers, and a 5' protein. *J Mol Biol* 310:549–562
- Podsiadlowski L, Bartolomeaus T (2006) Major rearrangements characterize the mitochondrial genome of the isopod *Idotea baltica* (Crustacea: Peracarida). *Mol Phylogenet Evol* 40:893–899
- Raimond R, Marcade I, Bouchon D, Rigaud T, Bossy JP, Souty-Grosset C (1999) Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* 151:203–210
- Rigaud T, Juchault P, Mocquard JP (1997) The evolution of sex determination in isopod crustaceans. *Bioessays* 19:409–416
- Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C, Raimond R (1999) Mitochondrial DNA polymorphism, sex ratio distorters and population genetics in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* 152:1669–1677
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–386
- Segawa RD, Aotsuka T (2005) The mitochondrial genome of the Japanese freshwater crab, *Geothelphusa dehaani* (Crustacea:

- Brachyura): evidence for its evolution via gene duplication. *Gene* 355:28–39
- Shao R, Dowton M, Murrell A, Barker SC (2003) Rates of gene rearrangement and nucleotide substitution are correlated in the mitochondrial genomes of insects. *Mol Biol Evol* 20:1612–1619
- Signorovitch AY, Buss LW, Dellaporta SL (2007) Comparative genomics of large mitochondria in placozoans. *PLoS Genet* 3:e13
- Souty-Grosset C, Raimond R, Tourte M (1992) Déterminisme épigénétique du sexe et divergence génétique de l'ADN mitochondrial chez *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé Oniscoïde): variabilité inter et intrapopulations. *CR Acad Sci Paris* 314:119–125
- Sun H, Zhou K, Song D (2005) Mitochondrial genome of the Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis* (Brachyura: Thoracotremata: Grapsoidae) reveals a novel gene order and two target regions of gene rearrangements. *Gene* 349:207–217
- Suyama Y, Miura K (1968) Size and Structural Variations of Mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 60:235–242
- Tatarenkov A, Avise JC (2007) Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA. *Proc Biol Sci* 274:1795–1798
- Tjensvoll K, Hodneland K, Nilsen F, Nylund A (2005) Genetic characterization of the mitochondrial DNA from *Lepeophtheirus salmonis* (Crustacea; Copepoda). A new gene organization revealed. *Gene* 353:218–230
- Vahrenholz C, Riemen G, Pratje E, Dujon B, Michaelis G (1993) Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr Genet* 24:241–247
- Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol* 141:173–216
- Zouros E (2000) The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae. *Genes Genet Syst* 75:313–318



**Figure IV-1 :** Profils de restriction de l'ADNmt de mâles d'*A. vulgare* (population WX) sur des tissus gonadiques (G) et des tissus somatiques (S). A droite : zoom sur le profil de restriction *Bam*HI permettant de voir les deux types moléculaires présents dans les tissus germinaux des mâles. Les traces présentes sur les pistes contenant l'ADNmt issue des tissus gonadiques sont dues à des résidus d'ADN génomique contenus dans le sperme. M = marqueur de taille  $\lambda$ -*Hind*III.

## **2. Résultats complémentaires sur la région codante de l'ADNmt**

### **a) Présence des deux types moléculaires dans les différents tissus et les deux sexes**

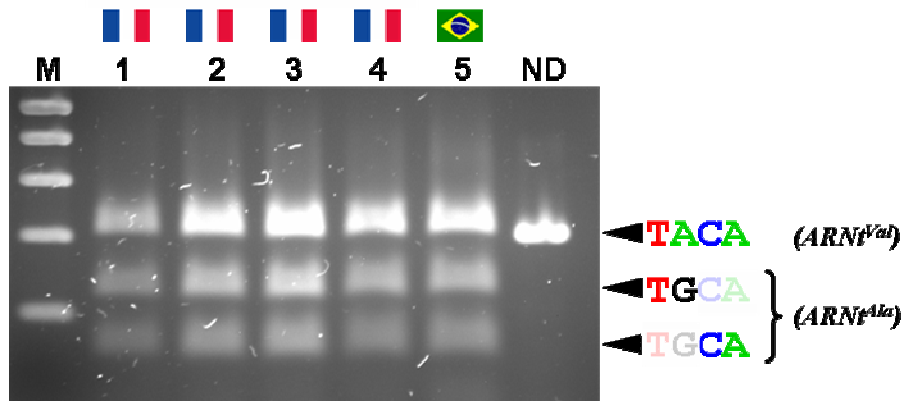
Il existe chez les Métazoaires quelques exemples de génomes divisés en plusieurs parties. Ces parties correspondent à des molécules différentes, ne portant pas les mêmes informations génétiques. Parmi ces exemples, les cas des Mollusques bivalves (Cao *et al.* 2004a; Breton *et al.* 2007; Passamonti & Ghiselli 2009) et du Mésozoaire *Dyciema japonica* (Watanabe *et al.* 1999; Awata *et al.* 2005) sont originaux, car ces animaux présentent dans leurs cellules germinales des molécules d'ADNmt différentes de celles des autres tissus.

Chez *A. vulgare*, nous savons que l'ADNmt est composé de deux types de molécules : des dimères et des monomères. Dans l'article de Marcadé *et al.* (2007) présenté dans ce chapitre, nous avons testé la présence de ces deux molécules dans les deux types de tissus, somatiques et gonadiques. L'objectif était de vérifier que les dimères et les monomères d'ADNmt sont présents dans tous les tissus et transmis ensemble.

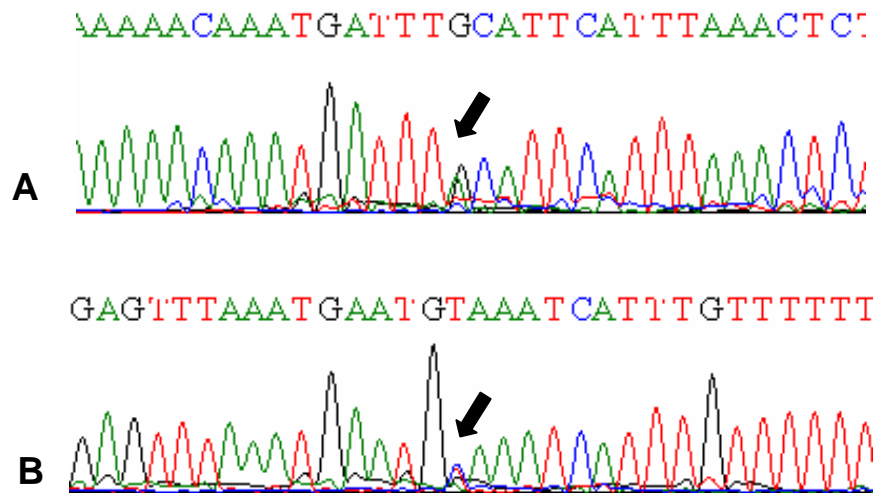
Pour cela, des analyses par RFLP ont été menées sur l'ADNmt extrait de tissus gonadiques (les ovaires chez les femelles, et les utricules chez les mâles) et de tissus somatiques (tissus musculaires, vasculaires et nerveux). Ces analyses ont été réalisées en cumulant l'ADNmt de plusieurs sœurs d'une part et de plusieurs frères d'autre part, issus de la même lignée iso-femelle (population provenant d'Helsingør au Danemark).

Les résultats obtenus à partir des femelles ont été présentés précédemment (figure 3 dans Marcadé *et al.* 2007). Ils ne montraient aucune différence entre les tissus gonadiques et les tissus somatiques. Ces analyses également réalisées sur l'ADNmt des mâles ne montrent pas non plus de différence entre les tissus (figure IV-1). En effet, même si les profils de restriction de l'ADNmt des tissus gonadiques sont difficilement observables, les quatre bandes appartenant aux deux types moléculaires sont bien présentes dans chacune des pistes du gel. De même, en comparant les profils de restriction des femelles et des mâles, il n'apparaît aucune différence entre les deux sexes.

Ces profils similaires montrent que la transmission des deux molécules d'ADNmt se fait conjointement, de façon uniparentale, et non pas séparée comme chez les bivalves. Selon toute vraisemblance, la transmission des molécules de l'ADNmt atypique est maternelle, comme chez la majorité des Métazoaires.



**Figure IV-2 :** PCR-RFLP réalisées sur l'ARNt bivalent Alanine/Valine de différents individus d'*A. vulgare*. Les chiffres correspondent aux cinq individus testés. Ces individus sont issus des populations suivantes : 1 et 2 = Nice (France), 3 = Chizé (Fr.), 4 = Saint Cyr (Fr.) et 5 = Porto Alegre (Brésil). M est le marqueur de taille (Smart Ladder - Eurogentec) et ND correspond au contrôle non-digéré.



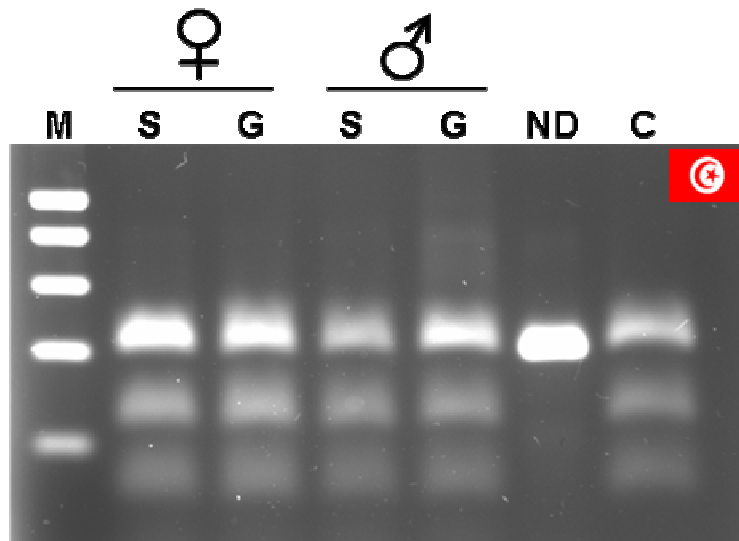
**Figure IV-3 :** Exemple de chromatogrammes *forward* (A) et *reverse* (B) présentant le double pic correspondant à l'hétéroplasmie observée sur l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> chez *A. vulgare*.

Une critique peut toutefois être faite sur cette démonstration, en ce qui concerne l'ADNmt observé dans les tissus gonadiques. Ces tissus contiennent en effet un grand nombre de cellules diploïdes qui n'interviennent pas directement dans la fécondation, à savoir des cellules nourricières, présentes dans les ovaires, ainsi que de nombreuses cellules des tissus conjonctifs dans les organes mâles et femelles. L'extraction d'ADNmt de l'ensemble de ces organes revient donc à un mélange d'ADNmt issu de cellules somatiques et de cellules germinales (ovocytes pour les femelles et spermatozoïdes pour les mâles). Toutefois, le choix de l'utilisation des tissus gonadiques s'explique d'une part par la fécondation interne de ces animaux, qui ne permet pas de récolter une semence émise par l'animal, et d'autre part par la très petite taille des cellules germinales, rendant difficile l'obtention d'une quantité suffisante d'ADNmt pour effectuer cette expérience. Néanmoins, il est très probable que dans nos extractions d'ADNmt issu des cellules gonadiques il y ait une très forte proportion d'ADNmt issu de cellules germinales. De plus, si l'un des deux types moléculaires formant l'ADNmt atypique était absent des cellules germinales d'un des sexes, cela aurait pu être décelé par une différence de luminosité des bandes sur les gels d'agarose.

#### **b) Répartition de l'hétéroplasmie ARNt<sup>Ala/Val</sup> chez différentes populations**

Dans l'article de Marcadé *et al.* (2007), nous avons également mentionné la découverte d'une hétéroplasmie induisant un ARNt bivalent alloaccepteur pour les deux acides aminés Alanine et Valine. Cette hétéroplasmie, observée tout d'abord chez un individu issu d'une population française de Celles-sur-Belle (population ZN), a également été observée chez des individus d'*A. vulgare* d'origines géographiques différentes. Pour cette démonstration, deux méthodes ont été utilisées : (i) le séquençage *forward* et *reverse* du fragment PCR obtenu à l'aide des amorces « 2138ND » et « 1737ND », sur lequel l'hétéroplasmie est illustrée par un double pic, et (ii) une digestion enzymatique de ces produits de PCR par l'endonucléase *HpyCH4 V*. Cette enzyme coupe les séquences TGCA lorsque c'est un ARNt<sup>Ala</sup> et ne coupe pas les séquences TACA lorsque c'est ARNt<sup>Val</sup>. Cette expérience de PCR-RFLP permet donc de visualiser la présence de l'un des deux ARNt, ou des deux (protocoles disponibles au chapitre suivant, dans Doublet *et al.* 2008).

La figure IV-2 montre les profils de restriction de ces PCR-RFLP pour les cinq individus issus de quatre origines géographiques différentes (Nice, Saint Cyr et Chizé en France, et de Porto Alegre au Brésil). Pour chacun de ces individus, trois bandes sont visibles : la plus haute est la bande non digérée (TACA, soit l'ARNt<sup>Val(UAC)</sup>) et les deux



**Figure IV-4** : PCR-RFLP réalisées sur l'ARNt bivalent Alanine/Valine, à partir de tissus somatiques (S) et de tissus gonadiques (G) de deux individus (une femelle à gauche et un mâle à droite) issus d'une population Tunisienne. M est le marqueur de taille (Smart Ladder), ND correspond au contrôle non-digéré, et C correspond au contrôle ADN issue d'un animal entier de la même population.



suivantes sont les bandes digérées (TGCA, soit l'ARNt<sup>Ala(UGC)</sup>). Ce gel montre donc que ce gène d'ARNt bivalent est présent chez tous ces individus. La figure IV-3 présente deux exemples de chromatogrammes obtenues lors du séquençage direct *forward* et *reverse* de ses individus.

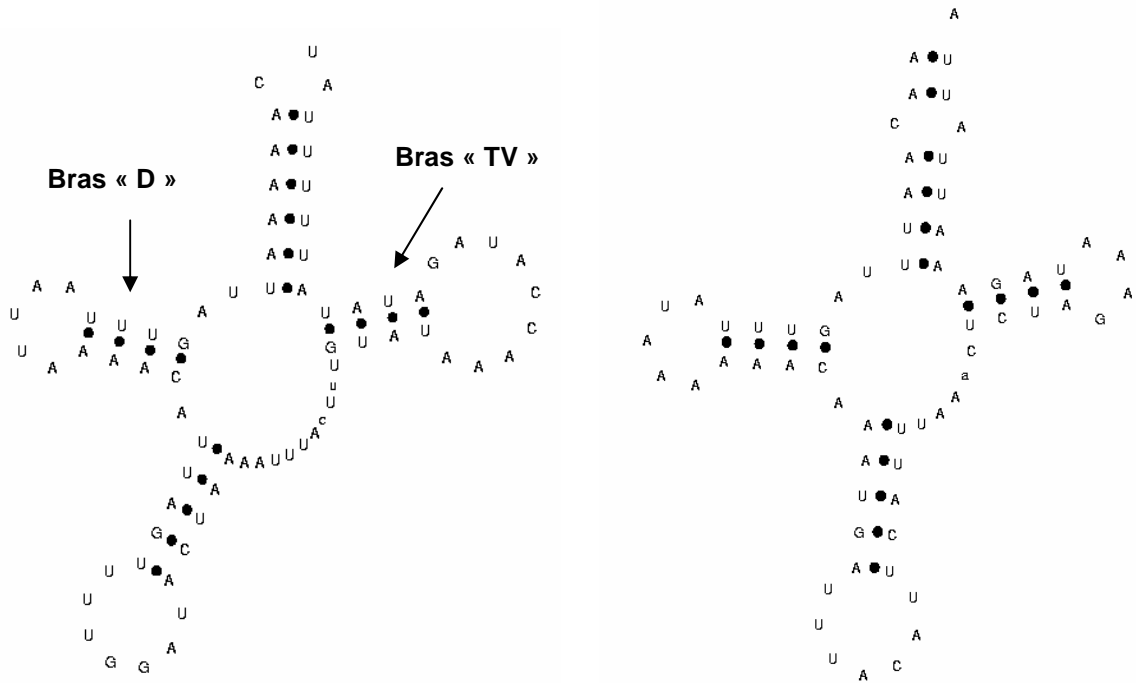
### c) Présence de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> dans les différents tissus et les deux sexes

Après avoir démontré que cet ARNt bivalent est présent dans l'ensemble des populations testées d'*A. vulgare*, nous avons vérifié, comme pour les dimères et les monomères, que les deux gènes d'ARNt sont transmis ensemble. Pour cela nous avons donc contrôlé leur présence dans les tissus somatiques et gonadiques chez les deux sexes. Ainsi, nous avons réalisé la même expérience de PCR-RFLP que précédemment sur un mâle et une femelle issus d'une population de Tunis en Tunisie.

Les résultats de ces PCR-RFLP sont présentés dans la figure IV-4. Sur ce gel nous pouvons voir la présence de trois bandes pour les deux types de tissus et chez les deux sexes. Ceci confirme la présence de ces deux gènes d'ARNt dans tous ces échantillons. Il est donc très probable que ces deux gènes se transmettent également de façon conjointe, par héritage maternel. De plus, ces deux gènes d'ARNt semblent être présents en quantité relativement semblable, si l'on considère la luminosité des bandes, bien que cette expérience ne soit pas quantitative.

### 3. Recherche des gènes d'ARNt dans le génome mitochondrial

Les génomes mitochondriaux des Métazoaires comptent ordinairement 22 ARNt, soit un ARNt pour chacun des 20 acides aminés, à l'exception de la Leucine et de la Sérine généralement représentés par deux ARNt : ARNt<sup>Leu-1(UAA)</sup>, ARNt<sup>Leu-2(UAG)</sup>, ARNt<sup>Ser-1(UCU)</sup> et ARNt<sup>Ser-2(UGA)</sup>. Cette réduction du nombre d'ARNt à 22 dans les génomes mitochondriaux par rapport aux génomes nucléaires est due à deux facteurs. Le premier est la redondance (ou dégénérescence) du code génétique qui associe plusieurs codons à un même acide aminé : ces codons sont dits synonymes. Le deuxième facteur est la souplesse des associations anticodon/codon dans les mitochondries animales qui permet à un seul ARNt de reconnaître l'ensemble des codons synonymes (Barrell *et al.* 1980; Bonitz *et al.* 1980). Ainsi, par exemple, l'anticodon UGC de l'ARNt<sup>Ala</sup> peut reconnaître les codons GCU, GCG, GCC et GCA (voir le code génétique mitochondrial des Arthropodes, annexe 7). Ce système de reconnaissance permet à la première base « U » de l'anticodon de se coupler avec la troisième



**Figure IV-5 :** Structures secondaires de l'ARNt<sup>Pro</sup> (à gauche) et de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> (à droite) obtenues avec le logiciel tRNAscan-SE (Lowe & Eddy 1997).

base des codons des ARN messagers, quel que soit le nucléotide (U, G, C ou A). Ce type d'appariement est qualifié de « bancal » (« wobble pair »).

Lors du séquençage du génome mitochondrial d'*A. vulgare* nous nous attendions donc à trouver ces 22 gènes d'ARNt. Or, dans l'article de Marcadé *et al.* (2007), seuls 9 ARNt ont été présentés. Depuis la publication du génome nous avons pu identifier d'autres ARNt grâce à différentes techniques : l'utilisation de logiciels de recherche et une inspection visuelle. Nous allons voir ici leurs résultats.

#### a) Utilisation d'un logiciel de reconnaissance d'ARNt « canonique » :

##### tRNAscan-SE

Pour identifier les séquences des gènes d'ARNt dans un génome, la technique la plus simple est l'utilisation de logiciels capables de les reconnaître automatiquement. Parmi les différents programmes disponibles en ligne, le plus couramment utilisé est le logiciel tRNAscan-SE (Lowe & Eddy 1997). Ce programme repère les ARNt présents dans un génome en recherchant les motifs recréant des structures secondaires en forme de feuille de trèfle dites « canoniques », caractéristiques des ARNt. Ce programme performant a notamment permis de retrouver la majorité des ARNt mitochondriaux des Isopodes *Ligia oceanica* et *Idotea baltica* (Kilpert & Podsiadlowski 2006; Podsiadlowski & Bartolomaeus 2006).

L'analyse du génome mitochondrial complet d'*A. vulgare* (après l'obtention de la région non-codante : cf. sous-chapitre suivant) avec le logiciel tRNAscan-SE n'a permis de trouver que trois ARNt : l'ARNt<sup>Pro</sup> (également noté P) et l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> (A/V) (figure IV-5). Ce résultat paraît très surprenant, car même si l'absence d'ARNt mitochondriaux est relativement courante chez les Métazoaires, ordinairement il ne concerne pas la quasi totalité des ARNt d'un génome. En prenant l'exemple des Crustacés, il a été rapporté au maximum l'absence de quatre ARNt mitochondriaux chez la Galathée *Shinkaia crosnieri* (Yang & Yang 2008). Toujours à titre de comparaison, dans les génomes mitochondriaux des Pécararides *Ligia oceanica* et *Metacrangonyx longipes* relativement proche d'*A. vulgare*, il n'a été rapporté qu'un seul ARNt manquant (Kilpert & Podsiadlowski 2006; Bauzà-Ribot *et al.* 2009).

Ce déficit de 19 ARNt dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare* semble plus probablement dû à une difficulté du logiciel tRNAscan-SE de détecter les séquences d'ARNt, qu'à une réelle absence de ces gènes. Ce programme a en effet été conçu pour identifier les ARNt dit « canoniques », respectant parfaitement les structures secondaires et tertiaires attendues pour ces gènes. En revanche, il est incapable d'identifier des ARNt dont les

structures secondaires se trouvent modifiées. Or, chez de nombreux organismes animaux, les ARNt mitochondriaux ont été rapportés avec des structures étonnantes, non canoniques, avec parfois la perte des bras « D » ou « TV » (voir figure IV-5 page 55 pour la nomenclature des bras). Ces ARNt, observés chez une grande variété d'organismes, ont été qualifiés de « bizarres » (de Bruijn *et al.* 1980; Wolstenholme *et al.* 1987; Garey & Wolstenholme 1989; Wolstenholme *et al.* 1994; Helm *et al.* 2000; Masta & Boore 2004; Klimov & Oconnor 2009).

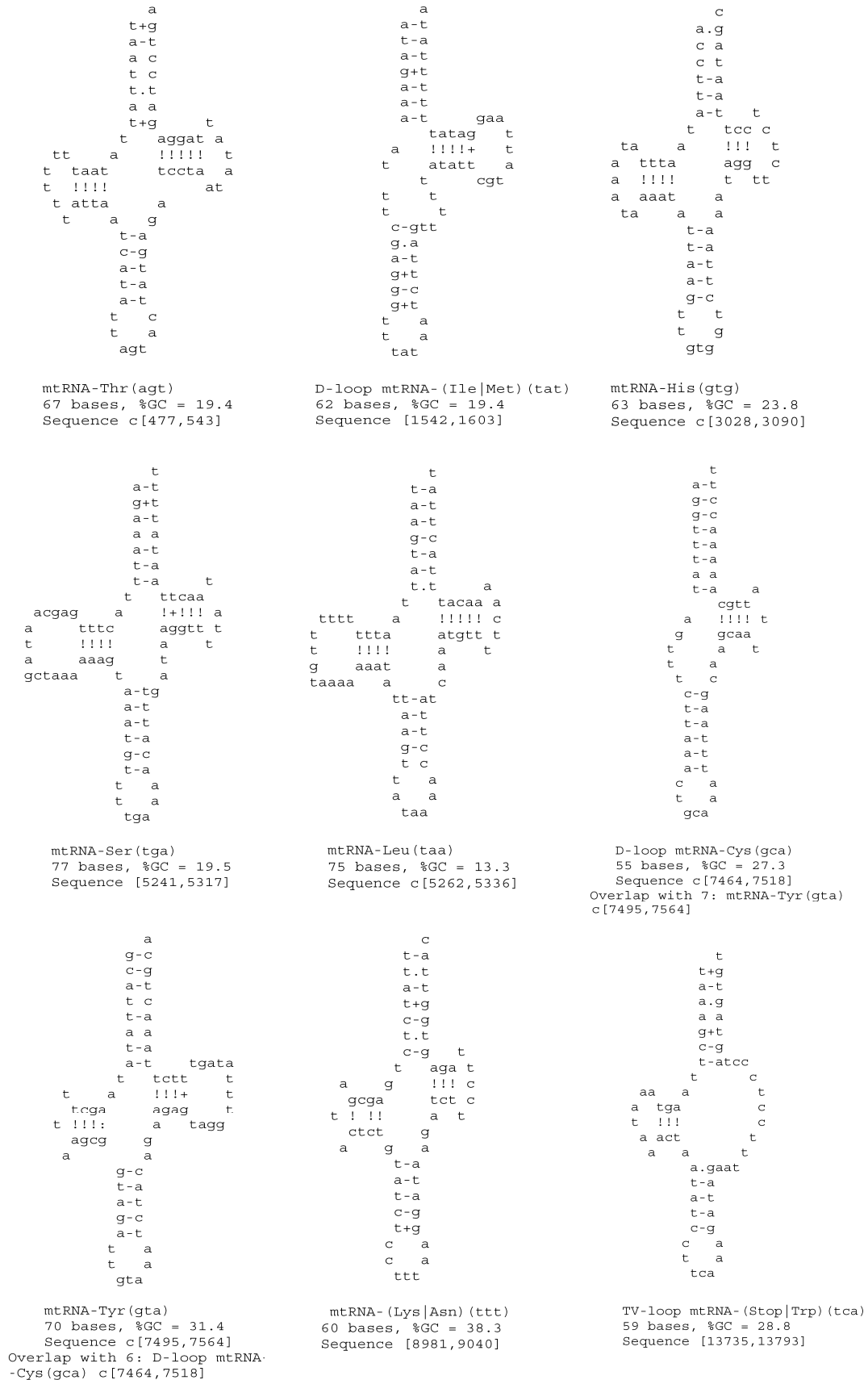
Ainsi, avec seulement trois ARNt détectés par le logiciel tRNAscan-SE, il est très probable que le génome mitochondrial d'*A. vulgare* possède de nombreux ARNt non canoniques difficiles à détecter. Pour les retrouver, nous avons alors envisagé une recherche visuelle directement sur la séquence d'ADNmt d'*A. vulgare*. Cette technique est régulièrement utilisée pour compléter l'annotation des génomes mitochondriaux. C'est d'ailleurs par cette technique que les génomes mitochondriaux des Isopodes *L. oceanica* et *I. baltica* ont été complétés (Kilpert & Podsiadlowski 2006; Podsiadlowski & Bartolomaeus 2006).

#### **b) Recherche visuelle d'ARNt**

Afin de rendre cette recherche visuelle moins fastidieuse, nous avons orienté nos recherches vers les zones intergéniques non codantes du génome. Les génomes mitochondriaux des Isopodes *L. oceanica* et *I. baltica* partageant le même ordre des gènes qu'*A. vulgare*, nous avons concentré nos recherches dans les zones présentant des ARNt dont l'emplacement est conservé. Pour définir un ARNt par cette méthode, nous devons retrouver au minimum deux structures secondaires formant une boucle de quatre à six paires de bases, dont une portant un anticodon.

Grâce à cette méthode, 10 ARNt potentiels ont été trouvés. Parmi ceux-ci neuf ont été identifiés aux mêmes emplacements que dans les autres génomes mitochondriaux d'Isopodes, ce qui suggère que ces ARNt sont plus ou moins conservés, et donc fonctionnels. Ces neuf ARNt sont :

- ARNt<sup>Phe</sup> (F) et ARNt<sup>His</sup> (H) entre les gènes *Nad4* et *Nad5* ;
- ARNt<sup>Ser-2</sup> (S<sub>2</sub>) entre la sous-unité ribosomale *16SARNr* et le gène *Nad6* ;
- ARNt<sup>Gln</sup> (Q) et ARNt<sup>Met-1</sup> (M<sub>1</sub>) entre la sous-unité ribosomale *16SARNr* et le gène *Nad2* ;
- ARNt<sup>Cis</sup> (C) et ARNt<sup>Tyr</sup> (Y) entre les gènes *Cox1* et *Nad2* ;
- ARNt<sup>Leu-2</sup> (L<sub>2</sub>) entre les gènes *Cox1* et *Cox2* ;
- ARNt<sup>Asn</sup> (N) entre le gène *Nad1* et la sous unité ribosomale *12SARNr*.



**Figure IV-6 :** Structures secondaires des ARNt du génome mitochondrial d'*A. vulgare* obtenues avec le programme ARWEN (Laslett & Canbäck 2008) : de gauche à droite, ARNt<sup>Thr</sup>, ARNt<sup>Met-3</sup>, ARNt<sup>His</sup>, ARNt<sup>Ser-2</sup>, ARNt<sup>Leu-1</sup>, ARNt<sup>Cys</sup>, ARNt<sup>Tyr</sup>, ARNt<sup>Lys</sup> et ARNt<sup>Trp</sup>. Les anticodons TAT et TTT correspondent bien à la Méthionine et la Lysine respectivement, en se référant au code génétique mitochondrial des Arthropodes (annexe 7).

Enfin, le dixième ARNt identifié est l'ARNt<sup>Met-2</sup> (M<sub>2</sub>), observé entre les gènes *Nad1* et la sous unité ribosomale *16SARNr*. Son emplacement ne correspond pas à ceux des ARNt<sup>Met</sup> des autres génomes mitochondriaux d'Isopodes.

Suite à cette recherche visuelle, nous avons identifié 13 gènes d'ARNt au total (en comptant les trois identifiés par tRNAscan-SE). Ce nombre encore insuffisant peut s'expliquer par notre méthode visuelle qui ne serait pas assez efficace pour retrouver la majorité des ARNt manquants et principalement ceux dont l'emplacement a dû changer, si l'on compare le génome mitochondrial d'*A. vulgare* avec celui des Isopodes *L. oceanica* et *I. baltica*.

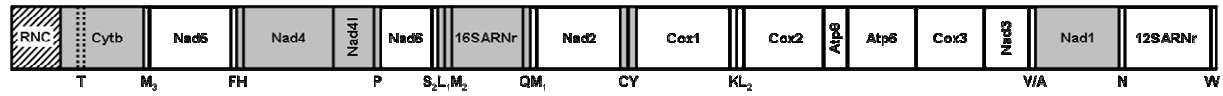
Heureusement, peu de temps après que nous ayons publié la séquence du génome mitochondrial d'*A. vulgare*, un nouveau logiciel de recherche d'ARNt a été mis en ligne. Ce programme, nommé ARWEN, est similaire au logiciel tRNAscan-SE, mais il est moins exigeant sur la structure secondaire et semble adapté aux ARNt « bizarres » (Laslett & Canbäck 2008). En effet, ce programme spécialement développé pour les ARNt mitochondriaux des Métazoaires, propose un grand nombre de séquences pouvant théoriquement former des ARNt, même si leurs structures secondaires sont peu conventionnelles. Dans notre analyse, nous avons donc utilisé ce logiciel pour compléter notre recherche d'ARNt.

### **c) Utilisation d'un logiciel de reconnaissance d'ARNt mitochondriaux non-canoniques : ARWEN**

Selon les auteurs de ce programme, en tenant compte des particularités des ARNt mitochondriaux des animaux, ce logiciel peut identifier près de 100% des gènes d'ARNt d'un génome mitochondrial. Cependant, ce logiciel propose également de nombreux « faux positifs ». Laslett & Canbäck (2008) estiment toutefois que ces faux positifs sont facilement identifiables si l'on se réfère à la composition nucléotidique des ARNt proposés et que l'on vérifie leur emplacement dans le génome.

Dans le cas d'*A. vulgare*, l'utilisation de ce logiciel avait un double intérêt : celui de continuer notre recherche d'ARNt, mais également de vérifier les ARNt identifiés visuellement. Finalement, ce logiciel ARWEN a identifié 11 séquences susceptibles de former des ARNt (voir figure IV-6). Parmi ces 11 séquences se trouvent :

- les deux ARNt identifiés précédemment par le programme tRNAscan-SE, les ARNt<sup>Pro</sup> et ARNt<sup>Ala/Val</sup>. Toutefois ARWEN propose une structure différente pour l'ARNt<sup>Pro</sup>, avec le bras « TV » en moins (structures présentées en annexe 8) ;



**Figure IV-7** : Cartographie de l'unité monomérique qui compose l'ADNmt d'*A. vulgare*. Les gènes grisés sont encodés sur le brin négatif de l'ADNmt. L'ensemble des ARNt potentiels est reporté sur ce schéma. Les ARNt sont désignés, en bas de ce schéma, par des lettres correspondant aux conventions (cf. ci-dessous). L'ARNt<sup>Thr</sup> (T), localisé au centre du gène *Cytb*, est représenté en pointillé. RNC correspond à la principale région non codante.

Liste des acides aminés :

A = Alanine  
 C = Cystéine  
 F = Phénylalanine  
 H = Histidine  
 K = Lysine  
 L = Leucine  
 M = Méthionine  
 N = Asparagine  
 P = Proline  
 Q = Glutamine  
 S = Sérine  
 T = Thréonine  
 V = Valine  
 W = Tryptophane  
 Y = Tyrosine

- quatre des ARNt que nous avons identifiés par inspection visuelle : les ARNt<sup>His</sup>, ARNt<sup>Ser-2</sup>, ARNt<sup>Cys</sup> et ARNt<sup>Tyr</sup> (en revanche, il n'a pas confirmé les ARNt<sup>Phe</sup> et ARNt<sup>Asn</sup> : leur séquence sont présentées en annexe 9) ;
- cinq nouveaux ARNt qui n'avaient pas été découverts par inspection visuelle : les ARNt<sup>Thr</sup> (T), ARNt<sup>Met-3</sup> (M<sub>3</sub>), ARNt<sup>Leu-1</sup> (L<sub>1</sub>), ARNt<sup>Lys</sup> (K) et ARNt<sup>Trp</sup> (W).

En cumulant les résultats de toutes ces analyses, 18 gènes d'ARNt ont été identifiés (figure IV-7). Cependant l'analyse de ces résultats indique que ces 18 séquences ne correspondent pas toutes à d'authentiques ARNt. Tout d'abord, nous pouvons voir que trois gènes d'ARNt<sup>Met</sup> ont été identifiés. Ordinairement, les génomes mitochondriaux des Métazoaires n'en comprennent qu'un seul. Sur ces trois gènes, deux ont été identifiés à vue. Le premier, que nous avons noté M<sub>1</sub>, se trouve au même emplacement que le gène d'ARNt<sup>Met</sup> des Isopodes *L. oceanica* et *I. baltica*. Le second (M<sub>2</sub>) a été identifié au début du gène de la grande sous-unité ribosomale *16SARNr* et possède une séquence très riche en AT. Il n'a pas été identifié par le logiciel ARWEN et il semble probable que cette séquence ne soit pas un ARNt mais plutôt une partie du gène *16SARNr* formant également des structures secondaires. Enfin, le troisième (M<sub>3</sub>) a été identifié par le logiciel ARWEN, mais ne présente pas de boucle « D ». Sur ces trois ARNt<sup>Met</sup>, nous pouvons écarter le numéro M<sub>2</sub>, mais il est difficile de savoir lequel de M<sub>1</sub> ou de M<sub>3</sub> est le bon ARNt<sup>Met</sup>. Il est également probable que ces deux séquences soient celles de réels ARNt.

Ensuite, nous avons le cas du gène de l'ARNt<sup>Thr</sup> qui a été identifié au centre du gène *Cytb*. Dans cette condition, nous pouvons douter de la possibilité que cet ARNt soit transcrit. De plus, cet ARNt présente un bras accepteur (bras du haut de l'ARNt) avec de nombreuses paires de bases non complémentaires (de type T-G, A-C et T-T). Sans bases complémentaires, la structure secondaire de l'ARNt n'est pas bonne. Il est alors fortement probable que ce ne soit pas un réel ARNt.

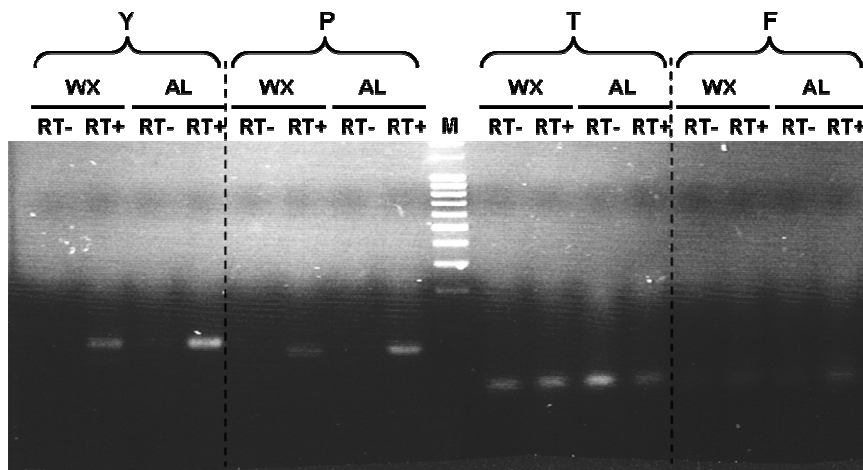
Enfin, nous avons les cas des gènes ARNt<sup>Trp</sup> et ARNt<sup>Cys</sup> pour lesquels le logiciel ARWEN prédit une structure secondaire avec un bras en moins, et nous pouvons nous interroger sur leur réelle fonctionnalité.

La présence de faux positif dans cette analyse semble donc probable. Cependant, l'affirmation que tel ou tel ARNt est faux, sur les seuls critères cités précédemment, est trop subjective. Dans la littérature, il existe de nombreux exemples d'ARNt ne présentant pas une forme classique. Par exemple, chez les Isopodes *L. oceanica* et *I. baltica*, certains de leurs ARNt ont été prédits avec un bras en moins (Kilpert & Podsiadlowski 2006; Podsiadlowski &



**Tableau IV-1 :** Bilan des RT-PCR réalisées sur les ARNt identifiés dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*. RT+ signifie un résultat positif, RT- un résultat négatif. Seul l'ARNt<sup>Met-2</sup> n'a pas été testé. Les ARNt sont classés selon la méthode qui nous a permis de les identifier.

	RT+	RT-	Non testés
tRNAscan-SE	Ala/Val (A/V), Pro (P)		
Inspection visuelle	His (H), Met-1 (M <sub>1</sub> ), Gln (Q), Ser-2 (S <sub>2</sub> ), Tyr (Y)	Cys (C), Phe (F), Leu-2 (L <sub>2</sub> ), Asn (N)	Met-2 (M <sub>2</sub> )
ARWEN	Lys (K), Met-3 (M <sub>3</sub> )	Leu-1 (L <sub>1</sub> ), Thr (T), Trp (W)	
Non trouvés	Asp (D), Glu (E), Gly (G), Ile (I), Arg (R), Ser-1 (S <sub>1</sub> )		



**Figure IV-8 :** RT-PCR sur les ARNt<sup>Tyr</sup> (Y), ARNt<sup>Pro</sup> (P), ARNt<sup>Thr</sup> (T) et ARNt<sup>Phe</sup> (F) chez deux populations d'*A. vulgare* (du Danemark - WX - et d'Espagne - AL -). M correspond au marqueur de taille (Smart Ladder – Eurogentec).

Bartolomaeus 2006). Plusieurs études ont par ailleurs démontré que ces ARNt tronqués peuvent être fonctionnels (Okimoto & Wolstenholme 1990; Sakurai *et al.* 2006; Ohtsuki & Watanabe 2007; Klimov & Oconnor 2009). De même, chez des invertébrés, il a été démontré que les ARNt ne possédant pas de bras accepteur correctement appareillé peuvent être « réparés » par des phénomènes d'édition (Yokobori & Pääbo 1995b; Lavrov *et al.* 2000). Tout ceci montre qu'il est difficile de savoir à partir des prédictions des logiciels si les ARNt identifiés sont réellement fonctionnels.

Au vu de ces résultats difficiles à analyser, il est utile d'accompagner notre recherche *in silico* d'une étude de fonctionnalité des ARNt. Ce travail, rarement réalisé dans les études de génomes mitochondriaux des Métazoaires, est indispensable pour compléter les prédictions faites par les logiciels ou par recherche visuelle. Dans la littérature, aucun travail de ce type ne semble avoir été fait chez les Crustacés.

#### d) Fonctionnalité des ARNt du génome mitochondrial d'*A. vulgare*

Pour vérifier l'expression des ARNt identifiés, nous avons réalisé des RT-PCR sur chacun de ces gènes grâce à des couples d'amorces dessinées pour chaque ARNt à partir des séquences prédites (annexe 5). Ce travail a été mis en place en collaboration avec Laurence Maréchal-Drouard de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) de Strasbourg et continué par la suite au Laboratoire d'Ecologie Evolution Symbiose de l'Université de Poitiers. Ces expériences ont été réalisées sur des individus issus de plusieurs populations (Nice en France [BF], Ribadeo en Espagne [AL] et Helsingør au Danemark [WX]).

Les résultats de ces expériences d'expression sont présentés dans le tableau IV-1. Dans ce tableau, nous pouvons voir que les trois ARNt identifiés par le logiciel tRNAscan-SE (ARNt<sup>Pro</sup> et ARNt<sup>Ala/Val</sup>) ont été obtenus par RT-PCR (les résultats obtenus pour l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> seront vus plus en détail dans le chapitre suivant). Pour les ARNt identifiés visuellement, nous avons confirmé l'expression des ARNt<sup>His</sup>, ARNt<sup>Met-1</sup>, ARNt<sup>Gln</sup>, ARNt<sup>Ser-2</sup> et ARNt<sup>Tyr</sup>. En revanche, nous n'avons pas réussi à amplifier les transcrits des ARNt<sup>Cys</sup>, ARNt<sup>Phe</sup>, ARNt<sup>Leu-2</sup> et ARNt<sup>Asn</sup>. Enfin, pour les ARNt identifiés avec le logiciel ARWEN, nous avons confirmé l'expression des ARNt<sup>Lys</sup> et ARNt<sup>Met-3</sup>, mais nous n'avons pas réussi à amplifier les transcrits des ARNt<sup>Leu-1</sup>, ARNt<sup>Thr</sup> et ARNt<sup>Trp</sup> (exemples présentés dans la figure IV-8).

Grâce à ces RT-PCR nous avons donc vérifié l'expression de dix ARNt. Parmi ceux-ci, nous avons confirmé l'expression de deux ARNt<sup>Met</sup> (M<sub>1</sub> et M<sub>3</sub>) – nous avons volontairement exclu l'ARNt<sup>Met-2</sup> de ces expériences, puisqu'il est peu probable qu'il soit un réel ARNt. Même si cela semble étonnant qu'il y ait deux gènes d'ARNt<sup>Met</sup> dans le même

génomique, c'est une situation qui a déjà été décrite. Chez les Crustacés, l'espèce *Euphausia superba* présente deux gènes d'ARNt différents pour le même acide aminé : l'Asparagine (Shen *et al.* 2010). Cela arrive généralement grâce à une simple mutation sur l'anticodon, ce qui est couramment appelé un recrutement d'ARNt (Lavrov & Lang 2005). Dans le cas d'*A. vulgare*, il est possible que le gène de l'ARNt<sup>Met-3</sup> soit issu d'un autre gène d'ARNt présent à cet endroit avant la mutation de son anticodon. Si l'on compare son emplacement chez *A. vulgare* et chez *L. oceanica*, cet ARNt<sup>Met-3</sup> est à la même place que l'ARNt<sup>Thr</sup>. Il est donc possible que l'ARNt<sup>Met-3</sup> d'*A. vulgare* provienne de l'ARNt<sup>Thr</sup> présent initialement chez les premiers Oniscidea. Pour cela, une mutation de la deuxième base de l'anticodon de G vers A permettrait de passer d'un anticodon Thréonine à un anticodon Méthionine. Cependant, si l'on compare les séquences de ces deux gènes d'ARNt entre *A. vulgare* et *L. oceanica*, ils ne semblent rien avoir en commun.

#### e) Bilan de la présence d'ARNt mitochondriaux chez *A. vulgare*

Après ces recherches de séquences et ces vérifications d'expression, nous pouvons dresser un premier bilan de la composition en gènes d'ARNt du génome mitochondrial d'*A. vulgare*. Tout d'abord, six gènes d'ARNt n'ont pas été identifiés dans ce génome : les ARNt<sup>Asp</sup> (D), ARNt<sup>Arg</sup> (R), ARNt<sup>Glu</sup> (E), ARNt<sup>Gly</sup> (G), ARNt<sup>Ile</sup> (I) et ARNt<sup>Ser-1</sup> (S<sub>1</sub>). Ensuite, sept ARNt, dont nous avons identifié la séquence (visuellement ou par le logiciel ARWEN), n'ont pas été confirmés par les expériences d'expression. Au total cela fait 13 gènes d'ARNt potentiellement absents du génome mitochondrial d'*A. vulgare*. Bien évidemment, tous ne sont peut-être pas absents. Il est possible que les ARNt non identifiés présentent des structures secondaires si peu communes que nous n'avons pas d'outil assez sensible pour les détecter. De même, il est possible que les résultats négatifs de RT-PCR soient tout simplement dus à des difficultés rencontrées lors des amplifications, notamment à cause de la mauvaise spécificité de certaines amorces riches en AT (voir la séquence des amorces en annexe 5). Cela pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas réussi à amplifier les transcrits de certains ARNt qui se localisent pourtant aux mêmes endroits dans le génome des trois Isopodes *A. vulgare*, *L. oceanica* et *I. baltica* : c'est le cas des ARNt<sup>Phe</sup>, ARNt<sup>Cys</sup>, ARNt<sup>Leu-2</sup>, ARNt<sup>Asn</sup> et ARNt<sup>Trp</sup>.

Néanmoins, il semble évident qu'il manque des gènes d'ARNt dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*. L'absence d'ARNt est relativement fréquente dans les génomes mitochondriaux des Métazoaires (Boore 1999; Gissi *et al.* 2008). Chez les Crustacés, cela a été rapporté chez plusieurs espèces dont l'Oniscidea *L. oceanica*. Chez cette espèce, il a été

rapporté l'absence de l'ARNt<sup>Arg</sup> (Kilpert & Podsiadlowski 2006), également absent dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*. Ces gènes, même s'ils sont absents des génomes, ne sont pas moins essentiels à la traduction mitochondriale. Ils assurent les liens entre les codons et les acides aminés qui permettent la production des protéines : il est donc important que chaque acide aminé soit représenté au moins par un ARNt dans les mitochondries. En cas d'absence de certains ARNt dans un génome mitochondrial, deux hypothèses sont généralement évoquées pour l'expliquer : l'édition post-transcriptionnelle d'ARNt ou leur import depuis le génome nucléaire vers les mitochondries. L'édition post-transcriptionnelle est assez rare et très peu décrite dans les mitochondries de Métazoaires. Le seul exemple connu à ce jour est le cas de l'ARNt<sup>Gly</sup> de certains marsupiaux dont la moitié des transcrits subit une substitution d'un C en U sur la deuxième base de l'anticodon pour devenir un ARNt<sup>Asp</sup> (Janke & Pääbo 1993; Börner *et al.* 1996; Janke *et al.* 1997). En revanche, l'import d'ARNt nucléaire semble être un phénomène plus courant (Schneider & Maréchal-Drouard 2000). Cependant, ce phénomène est encore peu décrit chez les Métazoaires. Il n'a été décrit également que chez des marsupiaux (Dörner *et al.* 2001). Toutefois, ce mécanisme semble être le plus probable pour expliquer l'absence d'ARNt chez de nombreuses espèces animales (A. Schneider, comm. pers.). C'est notamment ce qu'ont évoqué Kilpert & Podsiadlowski (2006) pour expliquer l'absence du gène de l'ARNt<sup>Arg</sup> dans le génome mitochondrial de l'Oniscidea *L. oceanica*.

Une troisième alternative pour compléter le set d'ARNt dans le génome mitochondrial atypique d'*A. vulgare* serait la présence d'autres ARNt bivalents comme l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>. C'est un moyen efficace de réduire la taille du génome mitochondrial en combinant deux gènes d'ARNt sur le même locus. Cependant, au cours de nos recherches sur les ARNt d'*A. vulgare*, nous n'avons pas rencontré d'autres ARNt bivalents. Le clonage et le séquençage des produits de RT-PCR ne nous ont pas donné de tels résultats. Il reste néanmoins des ARNt que nous n'avons pas réussi à amplifier et qui semblent pourtant être présents dans le génome. Cette hypothèse d'ARNt bivalents supplémentaires n'est donc pas à écarter totalement.

## **B. La région de contrôle de l'ADNmt d'*A. vulgare***

### **1. Séquençage de la région de contrôle**

Lors de la publication de la séquence codante du génome mitochondrial d'*A. vulgare*, la région de contrôle n'avait pas été obtenue (Marcadé *et al.* 2007). Plusieurs expériences

avaient été menées pour cela (clonage des extrémités des monomères linéaires et séquençage par PCR des jonctions palindromiques des dimères) mais elles n'avaient pas donné de résultats.

Depuis la publication du génome, d'autres expériences ont été tentées. En reprenant le concept d'une amplification par PCR des jonctions palindromique des dimères, en utilisant une amorce unique supposée s'hybrider de chaque coté, nous avons dessiné une amorce longue de 28 bases, riche en GC et présentant une température de fusion de 72°C. Cette amorce (FTM2R : CCTACGCACTGCTCACGCAAATGGTGCC), destinée à des amplifications à haute température d'hybridation, nous a permis d'élever cette température lors des PCR à 72°C : c'est-à-dire à la même température que l'étape d'élongation. Le but était d'éviter le repliement des jonctions dimériques sur elles-mêmes après chaque étape de dénaturation. Malheureusement cette technique n'a pas donné de résultat. Les jonctions palindromiques des dimères sont des zones très délicates à manipuler et chaque étape de dénaturation de l'ADN semble être irrémédiablement suivie d'un repliement de l'ADN sur lui-même.

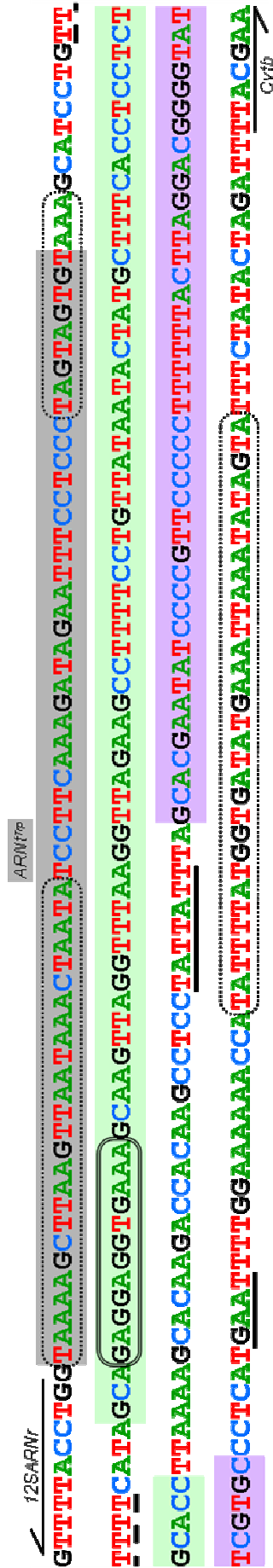
Dans un second temps, nous avons envisagé de tester l'amplification entre les gènes *12SARNr* et *Cytb* chez plusieurs échantillons. Ces gènes, situés aux extrémités des molécules linéaires du génome d'*A. vulgare*, ne sont pas supposés être l'un à coté de l'autre (figure IV-7 page 60). A notre grande surprise, nous avons réussi à amplifier certains de nos échantillons issus de plusieurs populations (de Celles-sur-Belle en France [ZN], de Tunis en Tunisie [ZP] et de São Paulo au Brésil [ZG] ; programme d'amplification et amorces en annexe 4). Nous avons ainsi obtenu une séquence non codante de 258 pb comprise entre les gènes de l'ARNt<sup>Trp</sup> (identifié par ARWEN) et du *Cytb*. Ceci nous a permis de compléter la séquence du génome mitochondrial d'*A. vulgare*. Dans sa totalité, l'unité monomérique fondamentale de ce génome mesure 13,949 kb. Ainsi, sans prendre en compte la formation des dimères, cela en fait le plus petit génome mitochondrial actuellement séquencé chez les Crustacés et parmi les plus petits chez les Arthropodes.

Une telle amplification de la région de contrôle entre les gènes *Cytb* et *12SARNr* ne correspond pas aux observations de la structure atypique de l'ADNmt obtenues en RFLP (Raimond *et al.* 1999; Marcadé *et al.* 2007). Une liaison entre ces deux gènes nécessite en effet la présence de molécules aux jonctions « tête-queue », tels que des monomères circulaires ou des dimères composés de monomères associés en tandem (de type « tête-queue »). Or, aucune de ces molécules n'a auparavant été observée dans l'ADNmt d'*A. vulgare*. Néanmoins, nous savons que les monomères circulaires sont les molécules qui

constituent généralement l'ADNmt des Métazoaires. En revanche, les dimères en tandem n'ont été rapportés que de façon exceptionnelle chez des rats et des drosophiles (Wolstenholme *et al.* 1973; Shah & Langley 1977), ainsi que dans le cas de cellules leucémiques chez l'homme (Clayton & Vinograd 1969). Il semble donc plus probable que nous ayons détecté la présence de molécules monomériques circulaires dans l'ADNmt d'*A. vulgare*.

Cette observation remet en cause notre idée de la structure de l'ADNmt atypique d'*A. vulgare*. Existe-t-il une autre forme de molécule dans ce génome mitochondrial ? C'est une possibilité. Nous avons constaté que la structure atypique de l'ADNmt (avec les dimères circulaires et les monomères linéaires) a été décrite à partir d'extraction d'ADNmt seul (via le protocole de lyse alcaline). En revanche, la jonction *12SARNr-Cytb* que nous décrivons ici, a été obtenue lors d'une amplification issue d'une extraction d'ADN total. Deux hypothèses sont alors à prendre en compte : (i) soit cette structure est présente naturellement mais en si faible quantité qu'elle n'est observable que lors d'une amplification par PCR – et indétectable en RFLP – (ii) soit les molécules linéaires jusqu'alors observées sont plus simplement le produit de molécules circulaires ayant subi une coupure lors du traitement drastique de l'extraction d'ADNmt par lyse alcaline. L'hypothèse d'une petite quantité de molécules présentant une jonction *12SARNr-Cytb* nous semble la plus probable. Elle pourrait expliquer par ailleurs les difficultés d'amplification de cette zone pour certains échantillons. De plus, cette hypothèse a déjà été proposée chez la plante *Marchantia polymorpha* où la forme monomérique circulaire ne compose que 5% de l'ADNmt, le reste étant représenté par des formes linéaires et des multimères (Oldenburg & Bendich 1998).

Quoi qu'il en soit, cette séquence obtenue entre les gènes *12SARNr* et *Cytb* comprend la région de contrôle de l'ADNmt d'*A. vulgare*. Cette principale région non-codante du génome est susceptible de présenter des éléments propres à la réplication et à la transcription du génome, telle que l'origine de réplication, ainsi que des petits motifs répétés, potentiellement impliqués dans des facteurs de régulation (Kuhn *et al.* 2008). De plus, nous savons que c'est également dans cette région de contrôle que se génèrent les formes linéaires et dimériques du génome mitochondrial atypique. Dans ce but, nous avons analysé cette région de contrôle de l'ADNmt d'*A. vulgare* et recherché les éléments qui lui sont caractéristiques.



**Figure IV-9 :** Séquence de la région de contrôle du génome mitochondrial d'*A. vulgare*, comprise entre les gènes 12SARNr et *Cytb* (individu de la population ZP de Tunisie). Le rectangle gris présente l'ARN<sup>17p</sup> identifié par ARWEN, le rectangle vert présente la grande structure secondaire et le rectangle mauve l'origine de réplication (voir figure IV-10). Les motifs « poly-T » (souligné en pointillé), « T(A)n » (entourés par des lignes en pointillés) et « G(A)n » (entouré par une double ligne) y sont notés, de même que les séquences « TATT » et « GAAT » flanquant l'origine de réplication (souligné par des traits noirs continues).

## 2. Recherche des petits motifs répétés

La région de contrôle de l'ADNmt est composée par de nombreux éléments de régulation nécessaires à la maintenance du génome. Chez les Arthropodes, cinq motifs sont généralement observés dans cette région (Zhang & Hewitt 1997; Kuhn *et al.* 2008) :

- des petits motifs : (i) une zone poly-T, (ii) des régions riches en « TA(n) », (iii) des régions riches en « GA(n) » ;
- et (iv) une origine de réplication, accompagnée par (v) deux motifs flanquants de type « TAT » et « GA(n)T ».

Récemment, Kuhn *et al.* (2008) ont réalisé la première étude comparative de cette région chez des Crustacés. Ils ont montré que ces cinq motifs ne sont pas toujours observés chez ces animaux. C'est notamment le cas de l'Oniscidea *L. oceanica* pour lequel Kilpert & Podsiadlowski (2006) n'ont décrit aucun de ces petits motifs répétés (zone poly-T ou régions en « TA(n) » ou « GA(n) »). En revanche, ils ont observé la présence de longues séquences répétées, contribuant à l'augmentation de la taille de la région de contrôle de cette espèce (737 pb).

Pour connaître les caractéristiques de la région de contrôle de l'ADNmt atypique d'*A. vulgare*, nous avons donc recherché ces motifs. Avant cela, nous avons délimité cette région de contrôle. Nous la situons entre le gène *Cytb* d'un côté, et l'ARNt<sup>Trp</sup> identifié par ARWEN de l'autre. Sur cette séquence nous avons tout d'abord recherché visuellement les petits motifs répétés. Nous y avons identifié une zone poly-T potentielle (constituée de seulement 6 bases), trois régions riches en « TA(n) », dont deux appartenant à l'ARNt<sup>Trp</sup> et une région « GA(n) » (figure IV-9). Ces motifs « TA(A)n » et « GA(A)n », retrouvés dans de nombreux génomes mitochondriaux d'autres Crustacés, n'ont pas une fonction bien connue. Elles sont toutefois soupçonnées d'intervenir dans le mécanisme de réplication (Zhang *et al.* 1995). En revanche, la zone poly-T qui est connue pour intervenir dans la réplication, n'est pas souvent observée chez les Crustacés (Kuhn *et al.* 2008). Celle que nous avons identifiée chez *A. vulgare* semble trop courte, en comparaison à celles des Insectes généralement composées de plus de 10 bases. Selon Saito *et al.* (Saito *et al.* 2005), dans ce genre de cas, il est alors possible que la réplication ne soit initiée que par la boucle de l'origine de réplication.





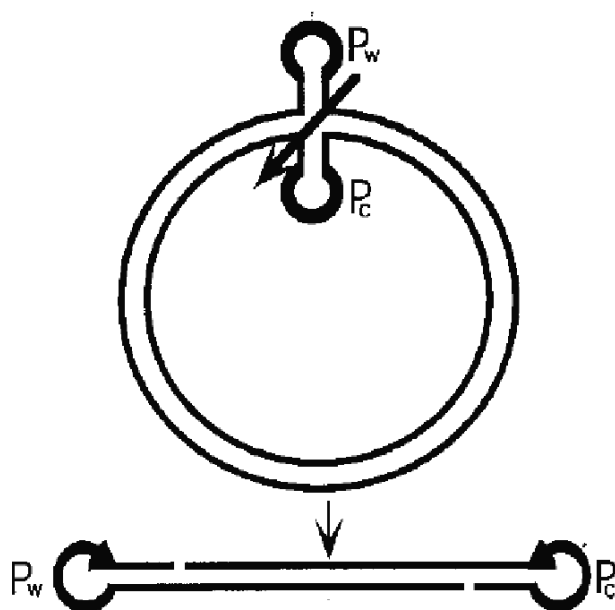
### 3. Recherche de l'origine de réplication

Outre ces petits motifs répétés, la région de contrôle de l'ADNmt comprend également l'origine de réplication. Cette origine se caractérise par une séquence répétée inversée qui forme une structure secondaire en épingle à cheveux. Elle est généralement accompagnée de deux séquences flanquantes de type « TATA » ou « TATT » d'un côté, et « GA(n)T » de l'autre côté (Kilpert & Podsiadlowski 2006). Ces motifs sont régulièrement observés chez les Arthropodes, même si là encore, on ignore leurs réelles fonctions.

Afin d'identifier l'origine de réplication de l'ADNmt d'*A. vulgare*, nous avons soumis la séquence de la région de contrôle à un programme de recherche de structures secondaires : RNAfold (Hofacker 2003). Cette analyse est présentée dans la figure IV-10A. Deux grandes structures secondaires y ont été identifiées. La première se trouve aux abords du gène *Cytb*. Elle est composée majoritairement de nucléotides GC, mesure 17 pb et possède une forte probabilité de formation (couleur rouge sur la figure). Elle présente de plus les motifs flanquants de type « TATT » en position 5' et « G(A)nT » en position 3' (figure IV-10B). La seconde structure secondaire a été identifiée du côté du gène *12SARNr*. Elle est plus longue que la première (avec une branche de 33 pb), également composée majoritairement de GC, mais elle ne présente pas les séquences flanquantes à sa base (figure IV-10C).

Entre ces deux structures secondaires, il semble plus probable que la première soit l'origine de réplication du génome. Elle présente les séquences flanquantes conservées et ressemble beaucoup à celles qui a été décrite chez *L. oceanica* en termes de taille et de composition nucléotidique (figure II-5 page 23 ; Kilpert & Podsiadlowski 2006). La seconde est beaucoup moins proche de ce qui est généralement décrit : elle semble trop longue (même si certains Crustacés présentent des origines de réplication de cette taille ; cf. Pie *et al.* (2008)) et surtout ne présente pas les séquences flanquantes de l'origine de réplication.

A quoi peut servir cette seconde structure secondaire ? La présence de deux origines de réplication différentes a été assez rarement décrite dans l'ADNmt des animaux. Néanmoins, cela s'est déjà rencontré chez les Crustacés (Kuhn *et al.* 2008). Arunkumar & Nagaraju (2006) ont par ailleurs démontré que ces séquences répétées inversées sont très courantes dans les régions de contrôle des Arthropodes, sans pour autant connaître leurs fonctions. Cependant, il est probable, selon les auteurs, que de telles structures soient impliquées dans la réplication, en tant que seconde origine de réplication. En effet, la réplication de l'ADNmt des animaux s'effectue en deux étapes. L'ADNmt réplique tout d'abord son premier brin – le brin lourd – sur une certaine distance, jusqu'à



**Figure IV-11** : Formation de molécules linéaires à partir de molécules circulaires présentant une structure secondaire « cruciforme ». D'après Lin *et al.* (1997).

rencontrer la seconde origine de réplication, qui enclenchera la réplication du second brin – le brin léger – (Shadel & Clayton 1997; Taanman 1999). Chez les Arthropodes, ou tout du moins chez les Insectes, les deux origines de réplifications se trouvent l'une à côté de l'autre, séparées par seulement 3% du génome (Goddard & Wolstenholme 1980; Saito *et al.* 2005). Il est possible alors que cette seconde structure secondaire soit la seconde origine de réplication du génome mitochondrial d'*A. vulgare*.

#### **4. Linéarisation et dimérisation du génome atypique**

Si nous comparons les régions de contrôle des Oniscidea *A. vulgare* (au génome atypique) et *L. oceanica* (au génome classique), nous pouvons voir que *L. oceanica* ne possède pas de seconde structure secondaire de ce type. Or, nous savons que la linéarisation et la dimérisation du génome atypique d'*A. vulgare* se passe au niveau de cette région de contrôle. Il pourrait donc y avoir un lien entre cette structure secondaire et la conformation du génome atypique.

De telles structures secondaires ont en effet déjà été décrites pour être à l'origine de la dimérisation de génomes (Lin *et al.* 1997; Lyu *et al.* 1999; Lin *et al.* 2001). Dans leurs modèles les auteurs de ces travaux ont démontré que la présence d'éléments répétés inversés formant une structure secondaire en épingle à cheveux pouvait provoquer la linéarisation puis la dimérisation d'une molécule d'ADN circulaire. Parmi ces modèles, Lin *et al.* (1997) ont montré qu'à partir d'une molécule circulaire (monomérique), un élément répété inversé formant une structure secondaire « cruciforme » peut conduire, lors de sa coupure, à la création d'une molécule linéaire portant à ses extrémités ces mêmes séquences répétées inversées (figure IV-11). Ces extrémités forment alors des structures fermées appelées télomères. Celles-ci sont régulièrement rencontrées aux extrémités des molécules d'ADNmt linéaires. Cela a été décrit dans l'ADNmt d'une grande variété d'espèces : les Cnidaires Medusozoa (Shao *et al.* 2006; Kayal & Lavrov 2008; Voigt *et al.* 2008), des algues vertes (Vahrenholz *et al.* 1993; Fan & Lee 2002; Forget *et al.* 2002), des levures (Dinouël *et al.* 1993; Fukuhara *et al.* 1993; Nosek *et al.* 1995), une amibe (Burger *et al.* 2003a) et un champignon unicellulaire (Sesterhenn *et al.* 2010). Nosek & Tomáška (2003) estiment que ces éléments répétés inversés auraient une origine externe aux génomes, comme des transposons ou des plasmides, ce qui aurait permis, de façon indépendante entre tous ces taxons, la linéarisation des molécules d'ADNmt.

Actuellement, nous ne pouvons pas affirmer que cette grande structure secondaire observée dans la région de contrôle de l'ADNmt atypique d'*A. vulgare* puisse intervenir dans

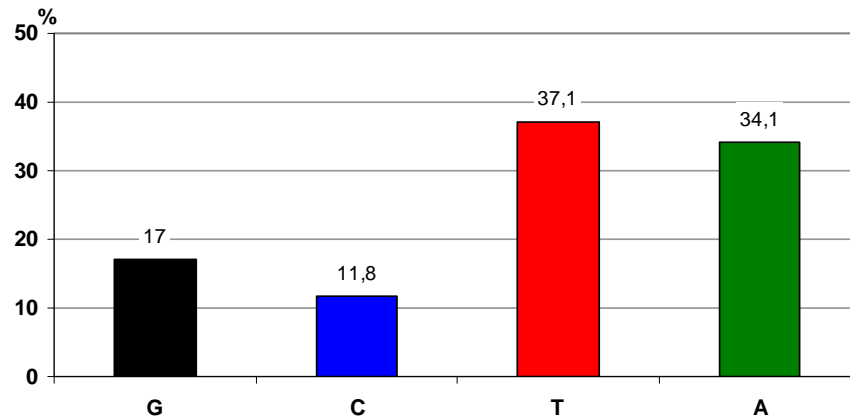
la linéarisation et la dimérisation du génome. Pour confirmer cela, les séquences des jonctions dimériques et des extrémités des molécules linéaires sont indispensables. Ces séquences pourraient nous confirmer la présence ou non de structures télomériques fermées au niveau des extrémités des molécules linéaires de l'ADNmt atypique. De telles structures télomériques expliqueraient alors les difficultés que nous avons rencontrées pour cloner les extrémités des monomères linéaires chez *A. vulgare* (Marcadé *et al.* 2007).

### 5. *Orientation de l'origine de réplication*

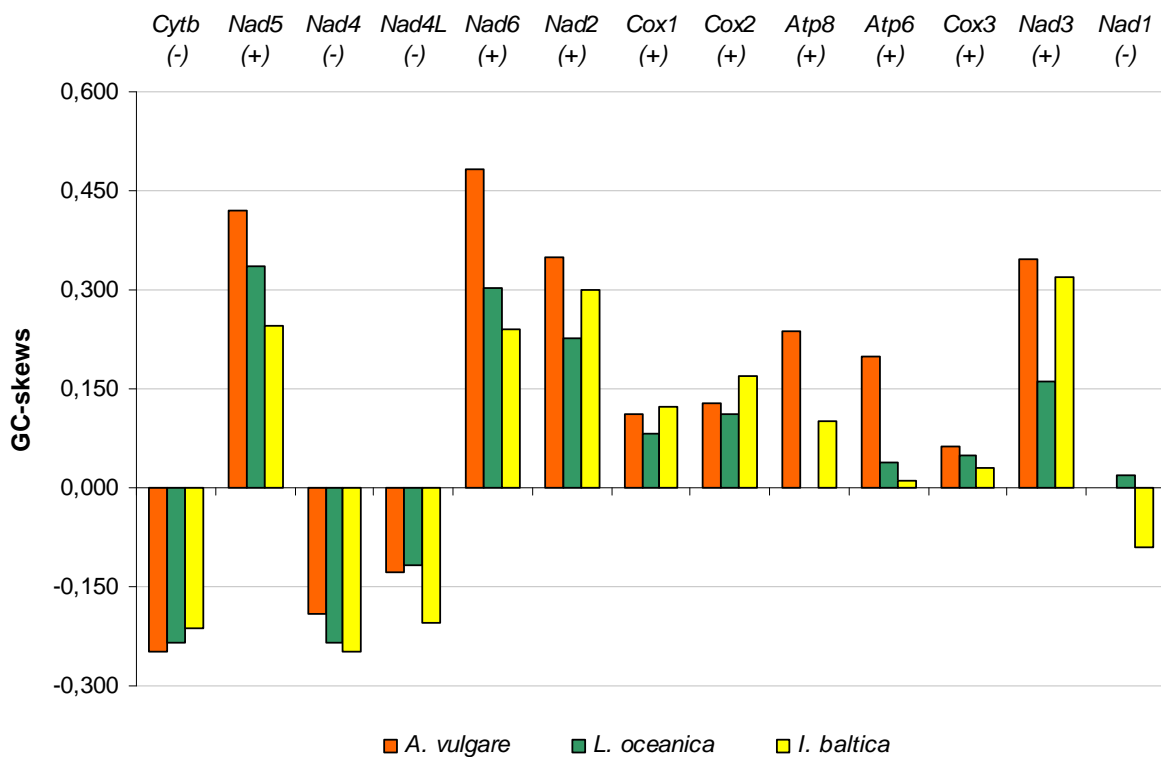
Nous venons de voir que la région de contrôle de l'ADNmt est la région du génome où sont initiées la réplication et la transcription. Nous allons voir à présent que l'emplacement de cette région influence également la composition nucléotidique des génomes mitochondriaux. Chez les Métazoaires, l'ADNmt présente ordinairement une asymétrie entre les deux brins de la molécule. Cette différence de composition nucléotidique entre les brins est appelée biais de composition en base « brin-spécifique ». Elle se traduit par la présence d'un brin lourd (ou positif) riche en nucléotides A et C, et d'un brin léger (ou négatif) riche en G et T (Perna & Kocher 1995; Saccone *et al.* 1999). En l'absence d'un tel biais, la composition nucléotidique en G par rapport aux C, ainsi qu'en A par rapport aux T devrait être homogène entre les deux brins. Il existe donc des mécanismes qui agissent sur cette composition et qui induisent un biais. Parmi ces mécanismes, deux sont régulièrement cités : la réplication et la transcription de l'ADNmt (Francino & Ochman 1997). Lors de ces deux événements, le brin léger est temporairement sous la forme simple brin et devient plus exposé aux mutations que le brin lourd. Le brin lourd est lui apparié au brin néoformé et donc sous la forme double brin. Durant cette période sous la forme simple brin, certaines substitutions vont devenir plus courantes que d'autres sur le brin léger. C'est le cas des substitutions des pyrimidines (C et T) par des purines (G et A), générant ainsi des biais de composition brin-spécifique (Frederico *et al.* 1990).

Afin de les évaluer, il existe des indices qui calculent ces biais à partir de la composition nucléotidique des deux brins (Perna & Kocher 1995). Parmi ces indices, le « GC-skew » est le plus couramment utilisé. Il se base sur le simple calcul  $(G - C)/(G + C)$ . Ainsi, une valeur de GC-skew positive met en évidence une plus forte proportion de G, alors qu'une valeur négative indique une plus forte proportion de C.

Nous avons analysé le génome mitochondrial d'*A. vulgare*, d'une part en rapportant la fréquence des nucléotides sur le brin lourd et d'autre part en calculant le GC-skew de chacun des gènes codants. Tout d'abord, l'analyse de la composition nucléotidique de son ADNmt



**Figure IV-12 :** Fréquence des nucléotides du brin lourd de l'ADNmt d'*A. vulgare*. Les valeurs de l'axe des ordonnées sont exprimées en pourcentage.



**Figure IV-13 :** Comparaison des GC-skews calculés pour l'ensemble des gènes codant des protéines du génome mitochondrial d'*Armadillidium vulgare*, avec ceux des gènes mitochondriaux de deux autres Isopodes : l'Oniscidea *Ligia oceanica* et l'Isopode marin *Idotea baltica* (d'après Kilpert & Podsiadlowski 2006). Les gènes présents sur le brin lourd sont notés par (+) et les gènes présents sur le brin léger sont notés par (-). N.B. : les valeurs brutes sont présentées en annexe 10. L'indice GC-skew présente une valeur de 0 pour le gène *Nad1* chez *A. vulgare* et le gène *Atp8* chez *L. oceanica*.

montre une inversion de cette asymétrie par rapport aux autres Métazoaires. Cela se traduit par une plus grande fréquence des nucléotides G et T sur le brin lourd (respectivement 17% et 37,1% ; figure IV-12). Cette inversion s'observe également en calculant l'indice GC-skew pour chacun des gènes mitochondriaux codant des protéines. Sur le graphique de la figure IV-13, nous pouvons voir que cet indice est positif pour les gènes du brin lourd (qui présentent plus de G que de C) et négatif pour les gènes du brin léger (qui présentent plus de C que de G), exception faite du gène *Nad1* qui présente une valeur nulle.

Chez les Crustacés, plusieurs études récentes ont montré des valeurs de GC-skew inverses de ce que nous avons trouvé chez *A. vulgare* (Hassanin *et al.* 2005; Hassanin 2006; Ki *et al.* 2009a). Il semble donc que le génome mitochondrial d'*A. vulgare* ait subi une inversion du biais de composition nucléotidique. Ce phénomène a déjà été observé chez des Métazoaires (Scouras *et al.* 2004; Hassanin *et al.* 2005; Hassanin 2006; Scouras & Smith 2006; Fonseca *et al.* 2008; Masta *et al.* 2009). Il est généralement associé à une inversion de la région de contrôle elle-même par rapport au reste du génome (Hassanin *et al.* 2005). C'est en effet ce qui s'observe dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*, pour lequel l'orientation de l'origine de réplication est inversée par rapport aux autres Crustacés non Isopodes.

Ce phénomène n'est pas limité à *A. vulgare*. Comme nous pouvons le voir sur la figure IV-13, l'ADNmt d'*A. vulgare* partage cette inversion de biais de composition nucléotidique avec l'ADNmt des deux Isopodes *L. oceanica* et *I. baltica* (Kilpert & Podsiadlowski 2006). De plus, l'inversion de l'origine de réplication a également été observée dans le génome mitochondrial de *L. oceanica*. Il apparaît donc que cette inversion de la région de contrôle observée chez *A. vulgare* soit antérieure à la divergence de ces espèces.

### **C. Conclusions**

Dans cette première partie, nous avons décrit le génome mitochondrial d'*A. vulgare* après l'obtention de sa séquence complète. Nous savons à présent que chaque unité monomérique de ce génome mesure ainsi 13,949 kb, ce qui fait de cet ADNmt le plus petit des génomes séquencés chez les Crustacés. Ceci s'explique par la courte taille de la région de contrôle et l'absence de certains gènes d'ARNt. En effet, bien que nous ayons identifié les 13 gènes codants pour des protéines, ainsi que les deux sous-unités ribosomales, les 22 gènes d'ARNt attendus n'ont pas tous été trouvés. Il est fortement probable que certains de ces ARNt soient absents du génome. En revanche, nous ignorons encore comment ceux-ci sont compensés dans les mitochondries.

En séquençant ce génome, nous avons mis en évidence que les dimères d'ADNmt présent chez *A. vulgare* ne sont pas le produit d'une simple duplication de gènes qui provoquerait la présence de pseudogènes. Au contraire, nous avons démontré que chaque copie de gène présente fondamentalement la même séquence. Ceci suggère l'action d'une conversion génique et/ou d'un mécanisme dynamique permettant à l'ADNmt le passage de l'état dimérique à l'état monomérique, homogénéisant ainsi les séquences. Toutefois, une exception a été observée : une étonnante hétéroplasmie a été découverte sur l'anticodon d'un ARNt, devenant alloaccepteur pour les acides aminés Alanine et Valine.

Nous avons également vu que la linéarisation et la dimérisation du génome atypique se jouent au niveau de la région de contrôle. L'étude de sa séquence a permis d'identifier l'origine de réplication du génome. Nous avons découvert par ailleurs que celle-ci est dans une orientation inversée par rapport aux Crustacés non Isopodes. Cette inversion est un caractère qu'*A. vulgare* partage avec les deux autres Isopodes *L. oceanica* et *I. baltica*, au même titre que l'ordre des gènes qui est conservé entre ces espèces.

Dans la région de contrôle du génome d'*A. vulgare*, nous avons aussi observé la présence d'une structure secondaire dont nous ne connaissons pas la fonction. Deux hypothèses ont été avancées sur sa fonction dans le génome : soit cette structure pourrait être la seconde origine de réplication du génome, soit elle pourrait être impliquée dans la linéarisation et la dimérisation du génome mitochondrial atypique. Cette dernière hypothèse peut sembler pertinente au regard de la littérature. Toutefois, la connaissance des séquences de jonction des dimères d'ADNmt d'*A. vulgare* ainsi que celle des séquences des régions de contrôle d'autres espèces à l'ADNmt atypiques est nécessaire pour le confirmer.



## V. Découverte de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>, un gène « deux en un »

### A. *A Thirty Million Year-Old Inherited Heteroplasmy – Doublet et al. (2008) PLoS ONE e2938*

Lors du séquençage du génome mitochondrial de l'Oniscidea *Armadillidium vulgare*, un site polymorphique a été observé sur la deuxième base d'un anticodon d'un gène d'ARNt, générant un ARNt bivalent alloaccepteur pour les acides aminés Alanine et Valine. Cette hétéroplasmie (mélange de mitotypes différents au sein d'un individu) a été observée chez tous les individus testés, provenant de régions géographiquement éloignées.

Pour pouvoir se transmettre au travers des générations, cette hétéroplasmie doit contourner le goulot d'étranglement (bottleneck) qui se traduit par la réduction du nombre de copies d'ADNmt lors de l'ovogenèse. Ce processus, qui réduit la probabilité de co-transmission de deux ADNmt divergents, élimine les ADNmt mutants présents en petite quantité. Il a donc pour conséquence d'homogénéiser l'ADNmt dans les ovocytes, et par la suite dans les individus. Ce principe permet donc de résoudre une hétéroplasmie en homoplasme en seulement quelques générations.

Dans cette étude, nous montrons que cette hétéroplasmie est toutefois héritée de façon stable au travers des générations d'*A. vulgare* : elle est observée dans l'ensemble des individus d'une lignée maternelle (mâles et femelles), sur trois générations. Après cette découverte, nous avons recherché sa présence chez d'autres espèces d'Oniscidea apparentées à *A. vulgare*. Ainsi, nous avons découvert que de nombreuses espèces d'Oniscidea partagent cette hétéroplasmie sur le gène de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>, ce qui a permis de dater cette mutation à plus de 30 millions d'années, âge des principales familles actuelles d'Oniscidea.

Nous pensons que cette hétéroplasmie, présente chez les Oniscidea, a pu se fixer grâce à la présence de dimères d'ADNmt observés chez ces espèces. Le maintien de cette hétéroplasmie semble dans tous les cas justifié par la présence indispensable de ces deux ARNt lors de la traduction mitochondriale. Nous suggérons alors que cette hétéroplasmie a été maintenue grâce un phénomène de sélection balancée, favorisant la conservation des deux gènes d'ARNt sur le même locus mitochondrial et conduisant à une hétéroplasmie constitutive de l'ADNmt de ces animaux.

# A Thirty Million Year-Old Inherited Heteroplasmy

Vincent Doublet, Catherine Souty-Grosset, Didier Bouchon, Richard Cordaux<sup>1</sup>, Isabelle Marcadé<sup>1\*</sup>

Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose, UMR CNRS 6556, Poitiers, France

## Abstract

Due to essentially maternal inheritance and a bottleneck effect during early oogenesis, newly arising mitochondrial DNA (mtDNA) mutations segregate rapidly in metazoan female germlines. Consequently, heteroplasmy (i.e. the mixture of mtDNA genotypes within an organism) is generally resolved to homoplasmy within a few generations. Here, we report an exceptional transpecific heteroplasmy (predicting an alanine/valine alloacceptor tRNA change) that has been stably inherited in oniscid crustaceans for at least thirty million years. Our results suggest that this heteroplasmy is stably transmitted across generations because it occurs within mitochondria and therefore escapes the mtDNA bottleneck that usually erases heteroplasmy. Consistently, at least two oniscid species possess an atypical trimeric mitochondrial genome, which provides an adequate substrate for the emergence of a constitutive intra-mitochondrial heteroplasmy. Persistence of a mitochondrial polymorphism on such a deep evolutionary timescale suggests that balancing selection may be shaping mitochondrial sequence evolution in oniscid crustaceans.

**Citation:** Doublet V, Souty-Grosset C, Bouchon D, Cordaux R, Marcadé I (2008) A Thirty Million Year-Old Inherited Heteroplasmy. PLoS ONE 3(8): e2938. doi:10.1371/journal.pone.0002938

**Editor:** Sebastian D. Fugmann, National Institute on Aging, United States of America

**Received:** June 3, 2008; **Accepted:** July 14, 2008; **Published:** August 13, 2008

**Copyright:** © 2008 Doublet et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This research was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. VD was supported by a Ph.D. fellowship from Région Poitou-Charentes. RC was supported by a CNRS Young Investigator ATIP award. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: isabelle.marcade@univ-poitiers.fr

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Metazoan mitochondrial genomes evolve rapidly, thus creating extensive sequence variation among individuals within species. While mitochondrial DNA (mtDNA) mutations are widely used in evolutionary studies, they also play a central role in apoptosis, disease and aging [1,2]. Due to essentially maternal inheritance and an mtDNA bottleneck during early oogenesis, most individuals are homoplasmic for a single mtDNA genome (i.e. they carry a single mtDNA genotype) [2–5]. This indicates that newly arising mtDNA mutations segregate rapidly in the female germline. Consistently, evidence from cattle, mice and humans indicates that heteroplasmy (i.e. the mixture of mtDNA genotypes within an organism) is generally resolved to homoplasmy within a few generations [2–6]. Therefore, heteroplasmy is considered as a transitional and short-lived state of metazoan mitochondrial evolution. In sharp contrast, we report an unusual transpecific heteroplasmy that has been stably inherited in oniscids (terrestrial isopod crustaceans) for at least 30 million years.

## Results and Discussion

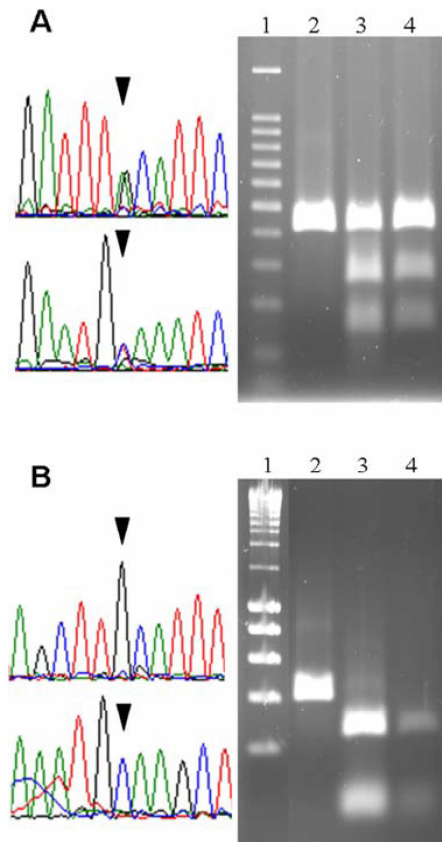
We have previously identified by direct DNA sequencing a putative G/A heteroplasmic point mutation at nucleotide position 11973 relative to the mitochondrial genome sequence of the oniscid *Amadillidium vulgare*; this polymorphism occurs in a tRNA anticodon and predicts an alanine/valine alloacceptor tRNA change [7]. Interestingly, the 11973G/A heteroplasmy was found in all six individuals tested (five females and one male from various geographic origins) [7]. To independently confirm these results, we designed a PCR-RFLP assay (Fig. 1) and verified the 11973G/A

heteroplasmy in these samples. PCR-RFLP analysis of three additional *A. vulgare* individuals (two females and one male) indicated that they all shared the 11973G/A heteroplasmy (data not shown).

To test whether the observed polymorphism is indeed of mitochondrial origin rather than derived from a nuclear mitochondrial pseudogene, we isolated mtDNA of four *A. vulgare* female samples using an alkaline lysis protocol [8]. Specific primers F1 (5'-ACCATCTATGAAGGTTACTGTC) and R1 (5'-ACCAACAGATTCCATACCCAAG) targeting the nuclear actin gene were used in a PCR assay to confirm the absence of nuclear DNA in the samples. We found the 11973G/A heteroplasmy to be present in all four individuals, thus confirming its mitochondrial origin (Fig. 1A).

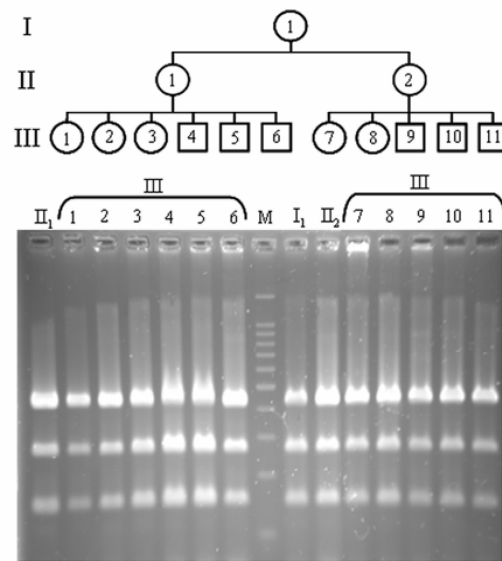
Presence of the 11973G/A heteroplasmy in all *A. vulgare* individuals analyzed, regardless of their geographic origin and sex, raises the question of its evolutionary origin. To address this issue, we screened 20 isopod crustacean species (from 13 different families) for the presence of the 11973G/A heteroplasmy by direct DNA sequencing and PCR-RFLP. We detected the 11973G/A heteroplasmy in 16 species comprising 10 divergent families of the crustacean suborder Oniscidea [9] (Table 1). These results indicated that the heteroplasmy originally identified in *A. vulgare* actually is a transpecific polymorphism with a very deep evolutionary origin. The fossil record indeed suggests that oniscids arose at least ~100 million years ago [10] and extant oniscid families are definitely attested by at least ~34 million years ago [11]. Thus, fossil evidence conservatively suggests that the 11973G/A heteroplasmy may have been present in oniscids for at least ~30 million years.

Sharing of a heteroplasmy in such a wide range of species suggests that it may be stably inherited by oniscids. To gain insight



**Figure 1. Assessment of character state at nucleotide position 11973 relative to the *Armadillidium vulgare* mitochondrial genome sequence.** (A) Presence of the 11973G/A heteroplasmy in mitochondrial DNA extracts of *A. vulgare* individuals. Direct sequencing of a heteroplasmic female sample (left) with forward (top) and reverse (bottom) primers. Partial trace files are shown, with the 11973G/A heteroplasmy highlighted with black triangles. HpyCH4V digestion profiles (right). Lanes: (1) 100 bp molecular ladder (BenchTop, Promega), (2) undigested control amplicon, (3) and (4) digested amplicons of two heteroplasmic female samples. (B) Presence of the 11973G homoplasmic state in *Chaetophiloscia elongata* individuals. Direct sequencing of a homoplasmic individual (left) with forward (top) and reverse (bottom) primers. Partial trace files are shown, with the 11973G homoplasmic state highlighted with black triangles. HpyCH4V digestion profiles showing complete digestion of the PCR products (right). Lanes: (1) 200 bp molecular ladder (SmartLadder, Eurogentec), (2) undigested control amplicon, (3) and (4) digested amplicons of two homoplasmic samples.  
doi:10.1371/journal.pone.0002938.g001

into this question, we investigated transmission of the 11973G/A heteroplasmy across three generations of an *A. vulgare* maternal lineage (Fig. 2). The heteroplasmy was found in all individuals of the pedigree (8 females and 6 males), thus demonstrating 100% transmission to both males and females across three generations. Constitutive heteroplasmy has previously been reported in male bivalves [12,13]. In these species, male and female germ lines are homoplasmic for different mtDNA genotypes, each of which is uniparentally transmitted [12,13]. As a result, females inherit mtDNA following usual strict maternal inheritance and males inherit mtDNA from both parents and, therefore, are heteroplasmic (except in the germline). In sharp contrast with the doubly



**Figure 2. Stable inheritance of the 11973G/A heteroplasmy across three generations (I–III) of an *Armadillidium vulgare* maternal lineage (top).** HpyCH4V digestion profiles showing that all individuals carry the 11973G/A heteroplasmy (bottom). M: 100 bp molecular ladder (BenchTop, Promega).  
doi:10.1371/journal.pone.0002938.g002

uniparental mode of mtDNA inheritance of bivalves, both male and female *A. vulgare* gonadic tissues are heteroplasmic (data not shown). Thus, unlike the bivalve system, paternal mtDNA transmission does not need to be invoked in *A. vulgare*. This view is further supported by the fact that we found the 11973G/A heteroplasmy in the parthenogenetic oniscid *Trichoniscus pusillus* (i.e. females produce eggs that develop without male fertilization) [14]. Therefore, classical strict maternal inheritance of mtDNA in principle can account for the presence of the 11973G/A heteroplasmy in both *A. vulgare* males and females.

How, then, does the 11973G/A heteroplasmy persist in oniscids on the long term? Because of mtDNA bottlenecks during oogenesis, persistence of two distinct populations of mtDNA genotypes within all individuals is very unlikely, unless the homoplasmic state at nucleotide position 11973 is lethal in oniscid species. Yet, mtDNA bottlenecks would predict lethal homoplasmic eggs to be frequently produced, which would seem to induce unbearable reproduction costs to females. Alternatively, stable transmission across generations can be achieved if oniscid mitochondria are constitutively heteroplasmic.

Consistently, at least two terrestrial isopod species (*A. vulgare* and *Porcellionides pruinosus*) possess an atypical mitochondrial genome formed by a circular ~28-kb dimer consisting of two ~14-kb monomers fused in opposite polarities and a linear ~14-kb monomer [15,16] (Fig 3). The circular and linear molecules may not be at equilibrium and the circular state might be generated from the linear state [15]. Such trimeric structure could provide an adequate substrate for the emergence of a constitutive intra-mitochondrial heteroplasmy. Strikingly, the three monomer units of the *A. vulgare* mitochondrial genome are identical at the nucleotide level, except for the 11973G/A heteroplasmy [7]. It is thought that the extreme sequence homogeneity among monomers is maintained by concerted evolution or it may be linked to the replication mechanism of this atypical mitochondrial genome

**Table 1.** Distribution of the 11973G/A mitochondrial heteroplasmy in 20 isopod crustacean species.

SUBORDER, Family	Species	Origin	N <sup>a</sup>	11973 <sup>b</sup>	Assay <sup>c</sup>	PCR primers <sup>d</sup>
FLABELLIFERA						
Sphaeromatidae	<i>Dynamene bidentata</i>	France	2	G	F, D	VF2/VR2
ONISCIDEA						
Ligiidae	<i>Ligia oceanica</i>	France	3	G	F, R, D	VF1/1737ND
Philosciidae	<i>Chaetophiloscia elongata</i>	France	2	G	F, R, D	VF1/1737ND
	<i>Philoscia muscorum</i>	France	2	G	F, R, D	VF1/1737ND
Agnariidae	<i>Hemilepistus reaumuri</i>	Tunisia	3	G/A	F, R, D	VF2/VR2
Armadillidae	<i>Armadillo officinalis</i>	Turkey	2	G/A	F, R	VF2/VR2
	<i>Cubaris murina</i>	Guadeloupe	2	G/A	F, R, D	VF2/VR2
Armadillidiidae	<i>Armadillidium assimile</i>	France	3	G/A	F, R, D	2138ND/1737ND
	<i>Armadillidium depressum</i>	France	3	G/A	F, R, D	2138ND/1737ND
	<i>Armadillidium nasatum</i>	France	2	G/A	F, R, D	VF1/1737ND
	<i>Armadillidium vulgare</i>	Brazil, France, Greece, Tunisia	26	G/A	F, R, D	2138ND/1737ND
Balloniscidae	<i>Balloniscus sellowii</i>	Brazil	1	G/A	F, R, D	VF2/VR2
Cylistidae	<i>Cylisticus convexus</i>	France	3	G/A	F, R, D	VF2/VR2
Platyarthridae	<i>Platyarthrus hoffmannseggii</i>	France	1	G/A	F, R	VF2/VR2
	<i>Platyarthrus caudatus</i>	Italy	1	G/A	F, R	VF2/VR2
Porcellionidae	<i>Porcellio gallicus</i>	France	3	G/A	F, R, D	VF2/VR2
	<i>Porcellio spinicornis</i>	France	2	G/A	F, R, D	VF2/VR2
Trachelipodidae	<i>Trachelipus rathkii</i>	France	2	G/A	F, R, D	VF1/1737ND
Trichoniscidae	<i>Trichoniscus pusillus pusillus</i>	France	1	G/A	F, R	VF2/VR2
Tylidae	<i>Helleria brevicornis</i>	France	2	G/A	R, D	VF2/VR2

<sup>a</sup>Number of individuals tested.

<sup>b</sup>Indicates whether all individuals within species were homoplasmic for guanine (G) or heteroplasmic for guanine and adenine (G/A) at mitochondrial genome position 11973.

<sup>c</sup>Assay used to ascertain 11973 heteroplasmic status: direct sequencing with forward (F) or reverse (R) primer, and HpyCH4V digestion (D).

<sup>d</sup>Primer pairs used to amplify the 11973 mitochondrial genome region by PCR: VF1 (5'-CCCGTTGAGTGTGGGTTGA), VF2 (5'-TGGTTTTGATGTGAGATT), 2138ND (5'-TCCTAGGGATTGGCCATTTA), VR2 (5'-CGCTTACGTTACGATAAACT) and 1737ND (5'-TATTTGGTGCGAGGAACT).

doi:10.1371/journal.pone.0002938.t001

[7]. If so, maintaining a heteroplasmic state for ~30 million years despite evolutionary forces otherwise tending to homogenize monomer sequences necessarily requires a selective process.

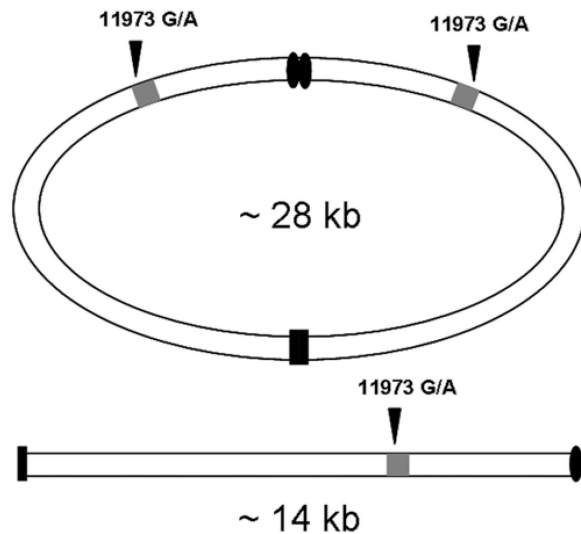
Interestingly, the 11973G/A heteroplasmy occurs in a tRNA anticodon specifying tRNA<sup>Ala</sup> and tRNA<sup>Val</sup> [7]. This 65 bp-long tRNA exhibits a typical cloverleaf secondary structure (Fig. 4), as predicted by the tRNAScan-SE program [17], suggestive of biological functionality. In addition, an analysis of the *A. vulgare* mitochondrial genetic code using the GenDecoder program [18] reveals that *A. vulgare* possesses the standard invertebrate mitochondrial genetic code, confirming the use of codons GCA for alanine (used 118 times) and GTA for valine (used 51 times). Thus, tRNA<sup>Ala</sup> and tRNA<sup>Val</sup> are both necessary for *A. vulgare* mitochondria to perform proper mRNA translation. Because the tRNA<sup>Ala</sup> and tRNA<sup>Val</sup> are apparently encoded nowhere else in the *A. vulgare* mitochondrial genome [7], the tRNA locus exhibiting the 11973G/A heteroplasmy is the sole endogenous source of both tRNA<sup>Ala</sup> and tRNA<sup>Val</sup> for *A. vulgare* mitochondria. Since lack of either tRNA could have dramatic consequences on mitochondrial metabolism, the 11973G/A heteroplasmy may have been maintained by a process of balancing selection for the past ~30 million years of oniscid evolution.

## Materials and Methods

Total DNA was extracted from gonads, fat body and nerve tissues of each individual as previously described [19]. PCR reactions were performed using GoTaq polymerase (Promega), primer combinations shown in Table 1 and the following program: 95°C for 3 min, 35 cycles of 95°C for 30 sec, 51~54°C for 50 sec, 72°C for 1 min 30, and 72°C for 5 min. Purified PCR products were directly sequenced with the BigDye Terminator kit (Applied Biosystems) and analyzed on an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer.

Endonuclease digestion of PCR products were performed with HpyCH4V (New England BioLabs). This enzyme recognizes a TCGA restriction motif (the site corresponding to the 11973 mitochondrial polymorphism is underlined). Digestions were performed with 3.5 units of enzyme (i.e. in excess to avoid partial digestions) at 37°C for 1 h. Digested products were separated on 2% agarose gels in TAE buffer for 1 h 30 at 35 V. Gels were stained with ethidium bromide and examined under UV light. HpyCH4V *in silico* digestion of *A. vulgare* mitochondrial genome [7] predicted a single undigested band (399 bp) in 11973A individuals and two digested bands (250 bp and 149 bp) in 11973G individuals. 11973G/A heteroplasmic individuals exhibited the three bands.





**Figure 3. Schematic representation of the atypical structure of *Armadillidium vulgare* mitochondrial genome, highlighting the relative position of the 11973G/A heteroplasmy.** The actual replication mechanism of this mitochondrial genome currently is unknown.

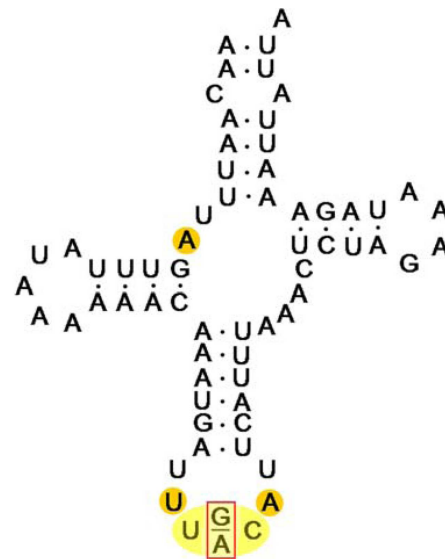
doi:10.1371/journal.pone.0002938.g003

### Acknowledgments

We thank Houda Ben Afia, Christine Braquart-Varnier, Frédéric Grandjean, Maureen Labarussias, Marion Lachat, Roland Raimond and Sébastien Verne for providing samples. We thank Daniel Guyonnet and Frédéric Chevalier for technical assistance and Laurence Maréchal-Drouard (IBMP Strasbourg, France) for discussions.

### References

- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27: 1767–1780.
- Chinnery PF (2002) Modulating heteroplasmy. *Trends Genet* 18: 173–176.
- Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, et al. (2000) The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet* 16: 500–505.
- Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasinha HK, Wonnapijit P, et al. (2008) A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* 40: 249–254.
- Khrapko K (2008) Two ways to make an mtDNA bottleneck. *Nat Genet* 40: 134–135.
- Bendall KE, Macaulay VA, Sykes BC (1997) Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots. *Am J Hum Genet* 61: 1303–1308.
- Marcade I, Cordaux R, Doublet V, Debenest C, Bouchon D, et al. (2007) Structure and Evolution of the Atypical Mitochondrial Genome of *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Crustacea). *J Mol Evol* 65: 651–659.
- Souty-Grosset C, Raimond R, Tourte M (1992) Déterminisme épigénétique du sexe et divergence génétique de l'ADN mitochondrial chez *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé Oniscoïde): variabilité inter et intrapopulations. *C R Acad Sc Paris* 314: 119–125.
- Schmalzfuss H (2003) World catalog of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A* 654: 1–341.
- Alonso J, Arillo A, Barron E, Corral JC, Grimalt JO, et al. (2000) A new fossil resin with biological inclusions in Lower Cretaceous deposits from Alava (northern Spain, Basque-Cantabrian Basin). *Journal of Paleontology* 74: 158–178.



**Figure 4. Secondary structure of the dual tRNA<sup>Ala/Val</sup> from the *Armadillidium vulgare* mitochondrial genome.** The 11973G/A heteroplasmy is highlighted in the red rectangle, in the anticodon shown in yellow. Orange circles denote conserved nucleotides for mitochondrial tRNAs [20].

doi:10.1371/journal.pone.0002938.g004

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VD RC IM. Performed the experiments: VD IM. Analyzed the data: VD CSG DB RC IM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CSG DB RC. Wrote the paper: VD RC.

## **B. Résultats complémentaires**

La présence de cet ARNt bivalent dans les génomes mitochondriaux de plusieurs espèces d'Isopodes terrestres témoigne d'importantes pressions de sélection pour maintenir ces deux gènes sur le même locus mitochondrial (Doublet *et al.* 2008 ; résultats brut en annexe 11). Ces pressions de sélection sont vraisemblablement liées aux contraintes fonctionnelles de ces deux ARNt nécessaires pour l'apport des acides aminés Alanine et Valine lors de la traduction. L'hétéroplasmie de l'ADNmt des Oniscidea qui en résulte, entraîne une situation alors très peu observée : deux ARNt différents (Alanine et Valine) possédant la même séquence nucléotidique et formant théoriquement les mêmes structures secondaires et tertiaires. Le seul autre exemple connu de ce type est celui de l'ARNt<sup>Gly</sup> des mitochondries de marsupiaux, pour lequel 50% des transcrits subissent une édition de la seconde base de l'anticodon créant ainsi un ARNt<sup>Asp</sup> (Janke & Pääbo 1993; Börner *et al.* 1996; Janke *et al.* 1997). Mais à la différence de ces ARNt de marsupiaux dont seuls les transcrits divergent, les Oniscidea possèdent les deux ARNt au niveau même de la séquence d'ADN (Marcadé *et al.* 2007; Doublet *et al.* 2008).

Malgré la présence partagée de cet ARNt bivalent chez plusieurs espèces d'Oniscidea, témoignant d'une probable fonctionnalité, nous ne savons pas si ces deux gènes différents, mais extraordinairement proches, sont tous les deux réellement utilisés par les mitochondries. Afin de nous en assurer, plusieurs vérifications ont été faites.

### **1. Le code génétique mitochondrial d'A. vulgare**

De part son origine bactérienne, l'ADNmt possède un code génétique différent de celui de l'ADN nucléaire de ses cellules hôtes. Chez les Métazoaires, ce code génétique a beaucoup évolué, de telle sorte que beaucoup de taxons possèdent leur propre code génétique mitochondrial (Knight *et al.* 2001). Chez les Arthropodes, il est couramment admis que le code génétique mitochondrial est celui qui a été décrit initialement chez la drosophile (de Bruijn 1983; Clary & Wolstenholme 1985 ; voir annexe 7). Toutefois, récemment, Abascal *et al.* (2006a) ont démontré que des changements de code génétique se sont régulièrement produits dans l'ADNmt de certains Insectes et Crustacés. Ces changements se font grâce à des mutations au niveau des anticodons d'ARNt, réassignant ainsi un codon vers un nouvel acide aminé (Sengupta *et al.* 2007).

Dans le cas de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>, il est essentiel avant de vérifier si ces deux ARNt sont fonctionnels, de savoir si le code génétique mitochondrial d'*A. vulgare* est conservé. Une



modification du code qui réassignerait le codon UGC de l'Alanine en Valine, ou le codon UAC de la Valine en Alanine ne donnerait pas le même sens à l'hétéroplasmie sur cet ARNt. Pour réaliser cette analyse, nous avons utilisé le programme de vérification du code génétique mitochondrial GenDecoder (Abascal *et al.* 2006b). Le résultat de cette analyse, présenté dans la figure V-1, montre qu'il n'y a vraisemblablement pas eu de changement de code génétique mitochondrial chez *A. vulgare*, par rapport à celui de la drosophile. GenDecoder a néanmoins détecté deux éventuels changements dans le code génétique mitochondrial d'*A. vulgare* (lettres rouges dans la figure V-1) : un changement du codon TGC de Cystéine vers Alanine, et un changement du codon AGG de Sérine vers Glycine. Toutefois, le programme estime ces changements peu probables : ils sont notés par une lettre minuscule dans la figure V-1. Afin de nous assurer que le code génétique mitochondrial des Isopodes n'a pas subi de changement, nous avons aussi vérifié le code génétique des ADNmt de *Ligia oceanica* et d'*Idotea baltica*. Nous n'avons pas détecté de changement chez ces deux espèces (résultats en annexe 12).

Le programme GenDecoder a également permis de vérifier l'utilisation des codons. Dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*, les codons GCA et GTA sont utilisés respectivement 51 et 118 fois (annexe 13). Leurs codons synonymes GCT, GCC et GCG pour l'Alanine, et GTT, GTG et GTC pour la Valine sont utilisés respectivement 97, 21 et 7 fois pour l'Alanine, et 107, 37 et 11 fois pour la Valine. Ainsi l'hypothèse d'une non utilisation des acides aminés Alanine et Valine dans la traduction des protéines mitochondriales chez *A. vulgare* est également écartée. Les anticodons UGC et UAC sont donc bien utilisés pour l'Alanine et la Valine dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*. L'ARNt est bien bivalent pour ces deux acides aminés.

## 2. Structure secondaire de l'ARNt bivalent

Après avoir vérifié la bonne assignation des codons GCA et GTA, nous avons examiné la structure et la séquence de cet ARNt bivalent pour déterminer si celui-ci peut être fonctionnel. La recherche de la structure de cet ARNt a été présentée dans le chapitre précédent. Avec le logiciel tRNAscan-SE, nous avons effectivement réalisé une recherche dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare* des ARNt possédant une forme classique. Nous avons vu que ce logiciel avait détecté deux ARNt, dont l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>. Ce premier test témoigne que cet ARNt possède une structure conservée.

Pour examiner la séquence nucléotidique de cet ARNt, nous nous sommes ensuite basés sur les travaux de Kumazawa & Nishida (1993). Ces auteurs avaient démontré la





présence de trois bases conservées dans les ARNt mitochondriaux des Métazoaires. Ces trois bases se retrouvent dans l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> d'*A. vulgare*. Elles se situent à la base du bras « D » (« D stem ») et dans la boucle de l'anticodon (voir figure V-2).

La structure de cet ARNt bivalent s'avère donc bonne et ces deux gènes semblent bien fonctionnels. Néanmoins cette fonctionnalité doit être vérifiée. Pour cela, nous avons réalisé, comme pour les autres ARNt du génome d'*A. vulgare* (chapitre précédent) des expériences d'expressions des ARNt<sup>Ala/Val</sup>.

## **C. Avancées récentes des travaux**

### **1. Expression des ARNt Alanine et Valine chez *A. vulgare***

Pour confirmer l'expression des ARNt Alanine et Valine, des RT-PCR ont été réalisées en utilisant une seule paire d'amorces disposées autour de la boucle de l'anticodon. Deux populations d'*A. vulgare* ont été testées pour s'assurer d'une bonne représentativité de l'expérience : les populations d'Helsingør au Danemark et de Ribadeo en Espagne.

Sur la figure V-3, nous pouvons voir que les RT-PCR confirment l'expression de cet ARNt. Mais pour s'assurer de la présence des deux formes, Alanine et Valine, les produits de RT-PCR ont été clonés puis séquencés. Ainsi, grâce au séquençage, nous avons observé que pour les deux populations, nous avons cloné à peu près 50% d'ARNt<sup>Ala</sup> et 50% d'ARNt<sup>Val</sup> (tableau V-1). Même si la technique utilisée n'est pas quantitative, il semblerait que ces deux ARNt soient exprimés en quantités égales.

### **2. Identités des ARNt Alanine et Valine**

A présent que l'expression de ces deux ARNt a été démontrée, il reste à savoir s'ils sont bien utilisés dans la mitochondrie en tant qu'ARNt<sup>Ala</sup> et ARNt<sup>Val</sup>. En d'autres termes, il faut savoir si ces deux ARNt sont en mesure de porter leur acide aminé respectif, nécessaire à la traduction mitochondriale.

La réaction de fixation des acides aminés sur les ARNt est l'aminacylation. Cette réaction se réalise grâce à l'intervention d'une enzyme : l'aminacyl-ARNt synthétase (aaRS). Il existe une aaRS correspondante à chaque acide aminé, et donc pour chaque ARNt. Par exemple, l'acide aminé Alanine est fixé à l'extrémité de l'ARNt<sup>Ala</sup> grâce à l'action de l'Alanyl-ARNt synthétase (AlaRS). Toutes les aaRS qui agissent dans les mitochondries sont encodées dans le génome nucléaire, puis exportées vers les mitochondries.

Pour délivrer le bon acide aminé sur le bon ARNt, chaque aaRS est capable de reconnaître spécifiquement son ARNt. Cette reconnaissance, qui prévient toute erreur d'aminacylation (et donc toute erreur de traduction), se fait grâce à des informations présentes sur les ARNt. Ces informations, propres à chaque ARNt, sont appelées éléments d'identités. Ces éléments d'identités sont représentés par des bases, ou des paires de bases de la séquence nucléotidique, et sont généralement situés dans le bras accepteur de l'ARNt (« AA stem », voir figure V-2 page 86) et/ou dans l'anticodon (Giegé *et al.* 1998; Beuning & Musier-Forsyth 1999). Ils constituent en quelque sorte un « second code génétique » qui permet d'associer les bons acides aminés aux codons, via les ARNt (de Duve 1988). Ces éléments d'identités sont bien connus pour chacun des ARNt et sont ordinairement très conservés entre les génomes (nucléaires, mitochondriaux et chloroplastiques) de nombreux organismes.

Dans le cas de l'ARNt bivalent des Oniscidea, nous pouvons nous demander comment les aaRS peuvent faire la différence entre les ARNt<sup>Ala</sup> et les ARNt<sup>Val</sup>. Ces deux ARNt possèdent la même séquence d'ADN, à l'exception de la seconde base de l'anticodon. Or, dans la littérature, plusieurs études ont montré que les éléments d'identités des ARNt<sup>Ala</sup> et des ARNt<sup>Val</sup> sont généralement différents et ne portent pas toujours sur l'anticodon (Giegé *et al.* 1998; Beuning & Musier-Forsyth 1999).

Pour l'ARNt<sup>Val</sup> il existe deux éléments d'identités : une base Adénine, présente à la position 73 (voir numérotation sur la figure V-2) et l'Adénine de la position 35, la deuxième base de l'anticodon UAC. Ces éléments d'identités ont été authentifiés dans plusieurs génomes dont celui de la bactérie *Escherichia coli* (Pallanck & Schulman 1991), le génome nucléaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Florentz *et al.* 1991), ainsi que dans les génomes mitochondriaux de mammifères (Helm *et al.* 2000). En revanche, l'identité de l'ARNt<sup>Ala</sup> ne se fait pas grâce à son anticodon, mais sur une paire de nucléotides présente dans le bras accepteur de l'ARNt : la paire G3:U70, signifiant une Guanine en position 3 et un Uracile à la position 70 (Giegé *et al.* 1998). Ce jeu d'identité ARNt<sup>Ala</sup>/AlaRS est considéré comme le plus conservé parmi toutes les associations ARNt/aaRS (Shiba *et al.* 1995). Il a été décrit dans de nombreux génomes, comme le génome bactérien d'*E. coli*, les génomes nucléaires de *S. cerevisiae* et de la plante *Arabidopsis thaliana*, celui des Mammifères dont l'homme, ainsi que dans certains génomes chloroplastiques (Imura *et al.* 1969; Hou & Schimmel 1988; 1989; Carneiro *et al.* 1994; Ramos & Varani 1997; Chihade *et al.* 1998) – voir figure V-4.



Ce jeu d'identité ARNt<sup>Ala</sup>/AlaRS est cependant moins conservé dans les génomes mitochondriaux des Métazoaires. Il existe en effet quelques exceptions où la paire G3:U70 fait défaut. Pour beaucoup de ces exceptions, la paire G:U se trouve en réalité déplacée dans le bras accepteur de l'ARNt<sup>Ala</sup> : soit plus haut, soit plus bas (Swairjo *et al.* 2004 ; et voir figure V-4). Elle a notamment été observée aux positions 2:71 et 1:72 dans les ARNt<sup>Ala</sup> mitochondriaux de divers invertébrés, ainsi qu'aux positions 5:68 dans celui de l'homme. Malgré ce changement de position, ces ARNt<sup>Ala</sup> sont bien fonctionnels (Swairjo *et al.* 2004). Cela a notamment été mis en évidence chez la mouche *Drosophila melanogaster* par Lovato *et al.* (2001; 2004), où l'ARNt<sup>Ala</sup> mitochondrial possédant une paire G2:U71 est correctement aminoacylé par l'AlaRS, suite à la co-évolution de ces deux gènes. Les auteurs ont par ailleurs observé que les paires G2:U71 sont associées à une paire G3:C70 dans le bras accepteur des ARNt<sup>Ala</sup> mitochondriaux de nombreuses espèces d'Insectes, formant un élément d'identité constitué de deux paires de nucléotides.

En ce qui concerne l'ARNt bivalent Alanine/Valine d'*A. vulgare*, dont la séquence nucléotidique ne varie que par la seconde base de l'anticodon, seul les éléments d'identités de l'ARNt<sup>Val</sup> sont présents (les nucléotides A73 et A35). En revanche, l'élément d'identité G:U de l'ARNt<sup>Ala</sup> ne se retrouve pas dans le bras accepteur de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>, ni en position 3:70, ni ailleurs (figure V-4). De manière étonnante, en analysant les séquences des ARNt<sup>Ala</sup> de plusieurs Crustacés, nous avons pu voir que cette paire G:U est également absente chez plusieurs espèces : c'est le cas de quelques Décapodes, mais aussi de façon plus surprenante, des cinq espèces de Péricarides dont le génome mitochondrial a été séquencé : *A. vulgare*, *L. oceanica*, *I. baltica*, *Metacrangonyx longipes* et *Parhyale hawaiiensis* (figure V-4). En réalité, une paire G7:U66 est présente dans le bras accepteur de l'ARNt<sup>Ala</sup> de l'Oniscidea *L. oceanica*, mais sa position basse, très proche des bras « D » et « TV », ne semble pas faire de cette paire un élément d'identité potentiellement fonctionnel.

Cette absence pose un évident problème de reconnaissance de l'ARNt<sup>Ala</sup> par l'AlaRS. Chez *A. vulgare*, nous pouvons nous demander comment cette enzyme peut distinguer l'ARNt<sup>Ala</sup> de l'ARNt<sup>Val</sup>. Trois hypothèses pourraient expliquer ce cas particulier d'identité de l'ARNt<sup>Ala</sup> mitochondrial chez *A. vulgare* :

**1- l'ARNt<sup>Ala</sup> est exprimé dans la mitochondrie, mais pas reconnu par l'AlaRS.** Il serait alors possible que cet ARNt ne soit pas utilisé en tant que tel, mais devienne utile à d'autres fonctions (réplication de l'ADNmt, facteur de régulation). Ceci nécessiterait

toutefois un import d'ARNt<sup>Ala</sup> depuis le génome nucléaire vers les mitochondries afin de compléter ce manque pour la traduction.

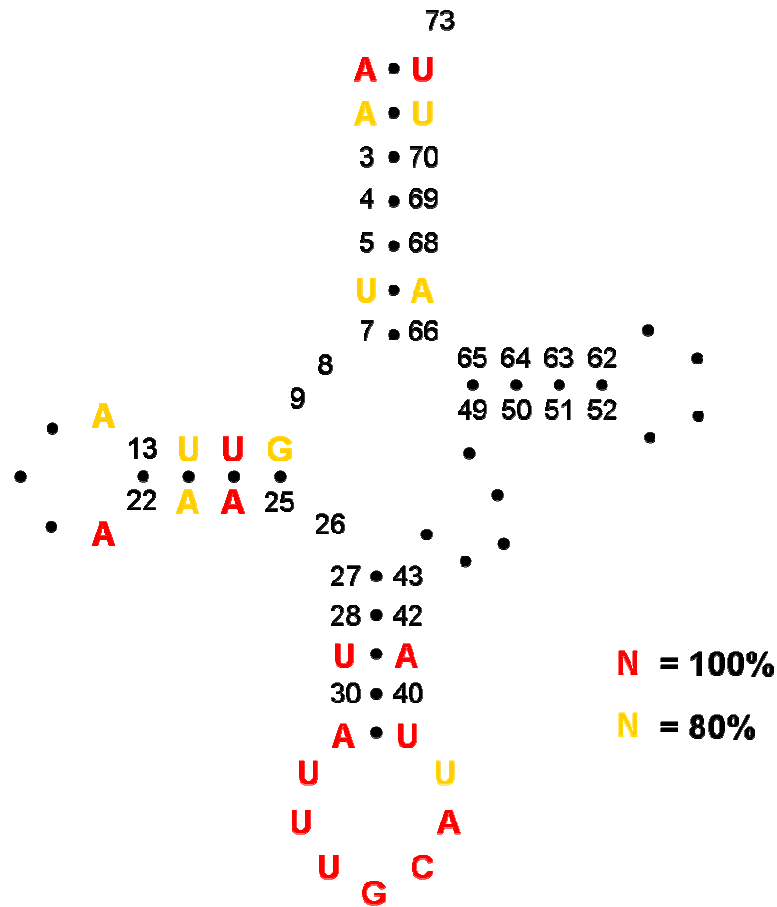
**2- le système de reconnaissance de l'AlaRS est toujours basé sur une paire G:U**, mais l'ARNt<sup>Ala</sup> nécessiterait alors une édition post-transcriptionnelle qui permettrait, aux travers de mutations, de restaurer les bases G et U dans le bras accepteur.

**3- le système de reconnaissance de l'ARNt<sup>Ala</sup> par l'AlaRS est basé sur un autre élément d'identité que la paire G:U.** Deux systèmes pourraient alors exister : (i) soit l'anticodon de l'ARNt<sup>Ala</sup> est devenu un élément d'identité, ceci permettrait aux AlaRS de distinguer facilement les ARNt<sup>Ala</sup> des ARNt<sup>Val</sup>; (ii) soit le nouvel élément d'identité de l'ARNt<sup>Ala</sup> est ailleurs, mais il serait alors également présent dans l'ARNt<sup>Val</sup>. Dans ces deux cas, pour éviter une aminoacylation des ARNt<sup>Val</sup> par l'Alanine, l'anticodon UAC (de l'ARNt<sup>Val</sup>) deviendrait un élément anti-déterminant, inhibant ainsi sa reconnaissance par l'AlaRS.

Parmi ces trois hypothèses, la première semble être la moins probable. Comme nous l'avons vu précédemment, il serait étonnant que cet ARNt bivalent ait été sélectionné si l'un des deux ARNt ne complète pas sa fonction.

La seconde hypothèse semble plus réaliste. L'édition post-transcriptionnelle d'ARNt mitochondriaux a déjà été décrite de nombreuses fois chez des organismes animaux très variés (Yokobori & Pääbo 1995b;1995a; Tomita *et al.* 1996; Yokobori & Pääbo 1997; Reichert & Mörl 2000; Leigh & Lang 2004). Cela est notamment le cas chez un Arthropode (le Chilopode *Lithobius forficatus*) où 21 des 22 ARNt mitochondriaux subissent une édition quasi complète de leur bras accepteur (Lavrov *et al.* 2000). Un tel phénomène d'édition des transcrits d'ARNt<sup>Ala</sup> chez *A. vulgare* pourrait alors restaurer une paire G:U dans le bras accepteur. Pour vérifier cela, il faudra séquencer les extrémités 5' et 3' des transcrits d'ARNt<sup>Ala</sup> après une étape de circularisation de l'ARNt. Cette expérience est actuellement en cours pour vérifier cette hypothèse.

Enfin, l'hypothèse d'un changement d'élément d'identité de l'ARNt<sup>Ala</sup> est également possible. Les éléments d'identités des ARNt mitochondriaux semblent assez variables chez les Métazoaires (Helm *et al.* 2000; Fender *et al.* 2006), et il ne paraît pas impossible que les interactions ARNt/aaRS se soient simplifiées dans ce groupe. En ce qui concerne l'ARNt<sup>Ala</sup>, il a déjà été évoqué chez l'homme la possibilité d'un nouveau jeu d'identité qui nécessiterait



**Figure V-5 :** Conservation des bases nucléotidiques de l'ARNt<sup>Ala</sup> mitochondrial des Crustacés Péracarides. Travail réalisé à partir des ARNt<sup>Ala</sup> de *Metacrangonyx longipes* (Bauzà-Ribot *et al.* 2009), *Parhyale hawaiiensis* (Cook *et al.* 2005), *Ligia oceanica* (Kilpert & Podsiadlowski 2006), *Idotea baltica* (Podsiadlowski & Bartolomaeus 2006) et de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> d'*Armadillidium vulgare*. Les bases rouges désignent les nucléotides conservés chez les cinq espèces et les bases orange désignent les nucléotides conservés chez quatre espèces sur cinq. Les points noirs désignent des bases qui ne sont pas toujours présentes dans l'ARNt.

l'utilisation exceptionnelle de la portion C-terminal de l'AlaRS (au lieu de la portion N-terminale) pour la reconnaissance de l'ARNt<sup>Ala</sup> (Dickey *et al.* 2006). Il est donc possible qu'une telle modification ait eu lieu chez les Crustacés Pécararides.

Afin d'identifier d'éventuelles bases conservées dans les ARNt<sup>Ala</sup>, un alignement des séquences des ARNt<sup>Ala</sup> mitochondriaux des cinq espèces de Pécararides, dont le génome mitochondrial est connu, a été réalisé. En dehors de la boucle de l'anticodon, seules quelques bases U et A sont présentes dans tous ces ARNt<sup>Ala</sup>. C'est le cas notamment des couples A1:U72 dans le bras accepteur, et U11:A24 dans le bras « D » (figure V-5). Il existe également quelques bases isolées conservées dans cet ARNt, dans la boucle de l'anticodon, ainsi que dans le reste de l'ARNt. Toutefois, il est difficile de savoir si ces bases peuvent entrer en jeu dans l'identité de l'ARNt. Comme nous l'avons vu dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*, les gènes d'ARNt sont souvent riches en AT. Il n'est donc pas étonnant de voir ces nucléotides présents dans les ARNt<sup>Ala</sup> de plusieurs espèces.

Dans le cas d'un réel changement d'identité de l'ARNt<sup>Ala</sup> des Pécararides, les nucléotides qui semblent les plus probables pour constituer un élément d'identité reconnaissable pour les AlaRS sont les bases G et C de l'anticodon UGC. Les anticodons possèdent les nucléotides les plus spécifiques aux ARNt et sont les éléments d'identité de beaucoup d'autres ARNt dans de nombreux génomes (Giegé *et al.* 1998). Il est donc fortement probable que le système de reconnaissance AlaRS/ARNt<sup>Ala</sup> des Pécararides ait évolué vers ce principe.



## **D. Conclusions**

Après la découverte du gène de l'ARNt bivalent lors du séquençage de l'ADNmt d'*A. vulgare*, nous nous sommes intéressés de plus près à cette hétéroplasmie. Tout d'abord, nous avons démontré que cette hétéroplasmie est constitutive de ce génome : l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> est transmis systématiquement à chaque individu, à chaque génération. Nous avons vu ensuite que la structure de cet ARNt bivalent semble être correcte (forme canonique caractéristique des ARNt), que ces deux gènes sont bien exprimés dans les mitochondries et dans des quantités relativement égales.

En recherchant cette hétéroplasmie chez plusieurs autres Oniscidea, nous avons également montré que ce gène d'ARNt bivalent est présent chez un grand nombre d'espèces. Nous en avons déduit, grâce aux datations fossiles, que cet ARNt bivalent est transmis chez les Oniscidea depuis au moins 30 millions d'années, date de l'émergence des principales familles actuelles d'Oniscidea. Cette hétéroplasmie a donc pu se transmettre grâce à l'effet d'une sélection balancée favorisant ces deux gènes essentiels à la traduction mitochondriale permettant ainsi d'« éviter » l'élimination de cette hétéroplasmie par le goulot d'étranglement qui a lieu lors de l'ovogenèse.

L'expression de ces deux gènes ainsi que leur transmission sur un long temps évolutif semble donc attester de la fonctionnalité de ces gènes. Toutefois, en analysant plus précisément la séquence de ce gène d'ARNt bivalent, nous avons observé l'absence de l'élément d'identité de l'ARNt<sup>Ala</sup>. Cet élément d'identité, que l'on retrouve sur tous les ARNt<sup>Ala</sup> du vivant (ADN bactériens, ADN nucléaires, mitochondriaux et chloroplastiques des Eucaryotes) est généralement constitué par une paire de nucléotides G:U dans le bras accepteur. Il semblerait que cet élément d'identité ait disparu au cours de l'évolution des Péracarides, puisqu'il ne se retrouve pas dans les ARNt<sup>Ala</sup> des Amphipodes et des Isopodes dont le génome mitochondrial a été séquencé. Cependant, nous ne savons pas comment les aminoacyl-ARNt synthétases peuvent discriminer les ARNt<sup>Ala</sup> des ARNt<sup>Val</sup> chez les Oniscidea possédant un ARNt bivalent. Soit il existe un mécanisme d'édition qui restaure la paire G:U dans le bras accepteur, soit l'ARNt<sup>Ala</sup> possède un nouvel élément d'identité.

## VI. Distribution de l'ADNmt atypique et évolution de sa synténie

### A. Une large répartition de l'ADN mitochondrial atypique

#### 1. *Widespread of the atypical mtDNA structure in Isopods (Crustacea, Peracarida): a possible way of heteroplasmy transmission - Doublet et al. (in prep. - Genetics)*

Les mitochondries sont des organelles issues d'une  $\alpha$ -protéobactérie endosymbiotique que les Eucaryotes ont intégré dans leurs cellules. Elles possèdent leur propre génome qui présente des tailles et des formes variées selon les organismes. Toutefois, parmi ces Eucaryotes, l'ensemble des Métazoaires ont la particularité de présenter presque toujours le même type d'ADNmt : des chromosomes circulaires et monomériques d'une taille comprise entre 15 et 20 kb (Boore 1999).

Bien que la grande majorité des Métazoaires possède ce type classique d'ADNmt, il existe quelques taxons pour lesquels le génome mitochondrial se présente différemment. C'est le cas de deux espèces de Crustacés Isopodes terrestres de l'ordre des Oniscidea, *Armadillidium vulgare* et *Porcellionides pruinosus*. Ces deux espèces possèdent un ADNmt dit atypique, qui se compose de deux molécules : des monomères linéaires de ~14 kb, associés à des dimères circulaires palindromiques de ~28 kb formés par deux monomères joints de façon « tête-queue » (Marcadé *et al.* 1999; Raimond *et al.* 1999).

Depuis la description de ce modèle original chez ces deux espèces, aucun autre exemple de ce type n'a été démontré. En effet, les deux premiers génomes mitochondriaux d'Isopodes qui ont été séquencés (*Idotea baltica* (Podsiadlowski & Bartolomaeus 2006) et *Ligia oceanica* (Kilpert & Podsiadlowski 2006)) n'ont pas révélé de structure atypique. Pour *I. baltica*, le séquençage incomplet de son ADNmt n'a pas permis d'en connaître sa structure. Cependant les auteurs estiment que les difficultés de séquençage rencontrées pour une partie du génome pourraient être dues à une structure atypique. Pour *L. oceanica*, en revanche, le séquençage complet de son génome mitochondrial a mis en évidence une structure de type classique formant uniquement des chromosomes circulaires monomériques d'une taille de 15,289 kb.

Afin de connaître la répartition de l'ADNmt atypique, nous avons recherché la structure des génomes mitochondriaux de plusieurs espèces d'Oniscidea. C'est ainsi que pour

19 espèces d'Oniscidea, nous avons réalisé des extractions d'ADNmt que nous avons digérées par des enzymes de restriction et dont nous avons analysé la structure par RFLP. Nous avons accompagné cette technique d'un southern blot de ces profils de restriction, que nous avons hybridé avec un gène mitochondrial. Ainsi, nous avons démontré que la structure atypique du génome mitochondrial est très répandue chez les Oniscidea. Parmi les 19 espèces que nous avons analysées, seule l'espèce *L. oceanica* présente un génome mitochondrial de type classique.

Pour savoir si cette structure atypique de l'ADNmt est restreinte aux Oniscidea, deux espèces d'Isopodes aquatiques (hors Oniscidea) ont également été testées : l'espèce marine *Sphaeroma serratum* et l'espèce d'eau douce *Asellus aquaticus*. Nos résultats montrent que la première présente un ADNmt classique, mais que la seconde présente un ADNmt atypique. Avec ces résultats, nous avons alors daté l'apparition de l'ADNmt atypique chez ces espèces au minimum avant leur divergence, estimée à 250 millions d'années (Wilson 1999).

La grande étendue de la structure atypique de l'ADNmt chez les Oniscidea rappelle celle de l'hétéroplasmie dans ce même groupe. Nous avons démontré que toutes les espèces que nous avons testées et qui présentent l'hétéroplasmie sur l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>, ont également un ADNmt atypique. En revanche, toutes les espèces ayant un génome mitochondrial atypique ne présentent pas un ARNt bivalent. De ces comparaisons, nous en avons conclu que l'hétéroplasmie est certainement apparue grâce à la structure atypique du génome mitochondrial, mais également qu'elle pourrait être un facteur de maintien de la structure atypique du génome mitochondrial chez les Oniscidea.

---

**Widespread of the atypical mtDNA structure in Isopods (Crustacea, Peracarida): a possible way of heteroplasmy transmission**

Vincent DOUBLET, Roland RAIMOND, Frédéric GRANDJEAN, Alexandra LAFITTE, Catherine SOUTY-GROSSET and Isabelle MARCADE

Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose UMR-CNRS 6556 – Université de Poitiers. 40 Avenue du Recteur Pineau 86022, Poitiers, France

**ABSTRACT**

Metazoan mitochondrial DNA (mtDNA) is generally composed of ~16kb circular monomers. However, it has been observed an atypical mtDNA composed of ~14 kb linear monomers associated to ~28 kb circular head-to-head dimers in both terrestrial crustaceans species *Armadillidium vulgare* and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda: Oniscidea). Since these observations there was no evidence of other species with this atypical mtDNA. In order to define the distribution of this atypical mtDNA structure, we performed RFLP analyses on mtDNA of several Oniscidean species, as well as on related aquatic isopods species. This atypical mtDNA structure was observed in all Oniscidean species except one, and in the freshwater isopod *Asellus aquaticus*, but not in the marine isopod *Sphaeroma serratum*. These results suggest an ancient origin of this structure followed by reversion or convergences events. Following a recent finding of a shared heteroplasmy in oniscid species, we show that the atypical mtDNA might be a factor of heteroplasmy appearance, and that dimers could be a vector for heteroplasmy in Isopod mtDNA. Moreover, we estimate that heteroplasmy might also be a powerful factor of maintenance of the atypical mtDNA structure.

**Keywords**

Head-to-head dimers, RFLP, Oniscidea, mtDNA, heteroplasmy

**Running title**

Atypical mtDNA in Crustacean Isopods

**Abbreviation**

mtDNA: mitochondrial DNA; tRNA: transfer RNA; mt: mitochondrial; RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

## INTRODUCTION

Metazoan mitochondrial DNA (mtDNA) is generally a circular monomeric chromosome, with a size ranging from 15 to 20 kb. It usually contains 37 genes: 2 ribosomal RNA (12S and 16S), 22 transfer RNA (tRNA) and 13 protein-coding genes (Boore 1999). The relative small size of animal mitochondrial (mt) genome, in comparison with those of plant and unicellular mitochondria, is due to the lack of intergenic spaces, and a short non-coding control region (Gray *et al.* 1999; Lynch *et al.* 2006). The streamlining animal mt genome have been explained by the “race to replication”, selecting shorter genome that replicates more rapidly (Rand 2001). However, Lynch *et al.* (2006) estimate that short animal mt genomes could be due to non-adaptative processes, as mutation rate or drift. Much larger genomes have otherwise been reported, resulting from repeated sequences rather than a change in genes content (Nosek & Tomáška 2003; Gissi *et al.* 2008; and see the example of the large mt genome of the scallop *Placopecten magellanicus* in Smith & Snyder 2007).

Only few animals do not harbour classical monomeric circular mtDNA genomes: the Rotifer *Brachionus plicatilis* and the parasitic nematodes *Globodera* present multipartite genomes respectively composed of two and six circular chromosomes (Gibson *et al.* 2007; Suga *et al.* 2008); the Cnidarian Meduzosoa that are the only examples of animal mt genomes exclusively composed of one to four linear molecules (Bridge *et al.* 1992; Shao *et al.* 2006; Kayal & Lavrov 2008; Voigt *et al.* 2008); and the terrestrial Crustaceans *Armadillidium vulgare* and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda: Oniscidea) which mtDNA is composed of circular head-to-head dimers of ~28 kb and linear monomers of ~14 kb, but no monomeric circles (Marcadé *et al.* 1999; Raimond *et al.* 1999). The presence of such palindromic dimers mtDNA molecules is unique in the animal kingdom.

Investigations on *A. vulgare* mtDNA composition, by both Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis and sequencing of the fundamental monomer, reveal that the monomer units from dimers and monomers are identical (Raimond *et al.* 1999; Marcadé *et al.* 2007). Only one nucleotide site is heteroplasmic (i.e. the mixture of mtDNA genotypes within an organism) and it is located on the second base of the anticodon of a transfer RNA gene (tRNA), leading to an alloacceptor tRNA for alanine (anticodon UGC) and valine (UAC) aminoacids. This dual tRNA has been observed in both males and females, in a large number of Oniscid species, showing an original example of heteroplasmy transmission (Doublet *et al.* 2008). Because of the bottleneck effect (reduction of the number of mtDNA molecules) during early oogenesis and post-natal folliculogenesis, heteroplasmy is thought to be transient and rapidly resolved in homoplasmy in few generations (Cree *et al.* 2008;

Khrapko 2008; Wai *et al.* 2008). In Doublet *et al.* (2008) it has been argued that the observed heteroplasmy must be constitutive, and its exceptional stable transmission could be linked to the atypical structure of mtDNA.

Indeed, the aim of this study is to evaluate the distribution of the atypical structure of mtDNA in oniscids to verify this assumption. Since the observation of this atypical mtDNA configuration in both *A. vulgare* and *P. pruinosis* (Marcadé *et al.* 1999; Raimond *et al.* 1999), no evidence of such example has been described in other species. Interestingly, sequencing the coding part of the marine isopod *Idotea baltica* mt genome (sub-order Valvifera), Podsiadlowski & Bartolomaeus (2006) mentioned a possible atypical structure while they failed to obtain the complete sequence. This observation suggested a widespread of the atypical mtDNA in Isopod. However, the first complete sequence of oniscid mtDNA, from the species *Ligia oceanica*, that belong to the family supposed to have become terrestrial, revealed a standard metazoan genome conformation with circular monomers of 15,289 bp long (Kilpert & Podsiadlowski 2006).

With respect to the cases of *I. baltica* and *A. vulgare*, in which sequencing failed to distinguish the mitochondrial genome structure, RFLP analyses seems to be the best technique to analyse the genome structure. Only few data are available in literature on Crustacean mtDNA structure, restricted to commercially important decapod species (Brasher *et al.* 1992; Bouchon *et al.* 1994; Grandjean & Souty-Grosset 1996; 1997; Imai *et al.* 1999; McMillen-Jackson & Bert 2004) and biological models as *Artemia sp.* (Batuecas *et al.* 1988) and *Daphnia pulex* (Stanton *et al.* 1991). Here we present RFLP analysis on several oniscid species, as well as on two non-Oniscid species for comparison. We demonstrate that atypical mitochondrial genome is common in Oniscidea, and might be widespread in isopods. We discuss these results and the process of formation of dimers, with regards to a previous work that report an extraordinary shared heteroplasmy in oniscid mtDNA (Doublet *et al.* 2008).

## MATERIAL & METHODS

### Isolation and digestion of mtDNA

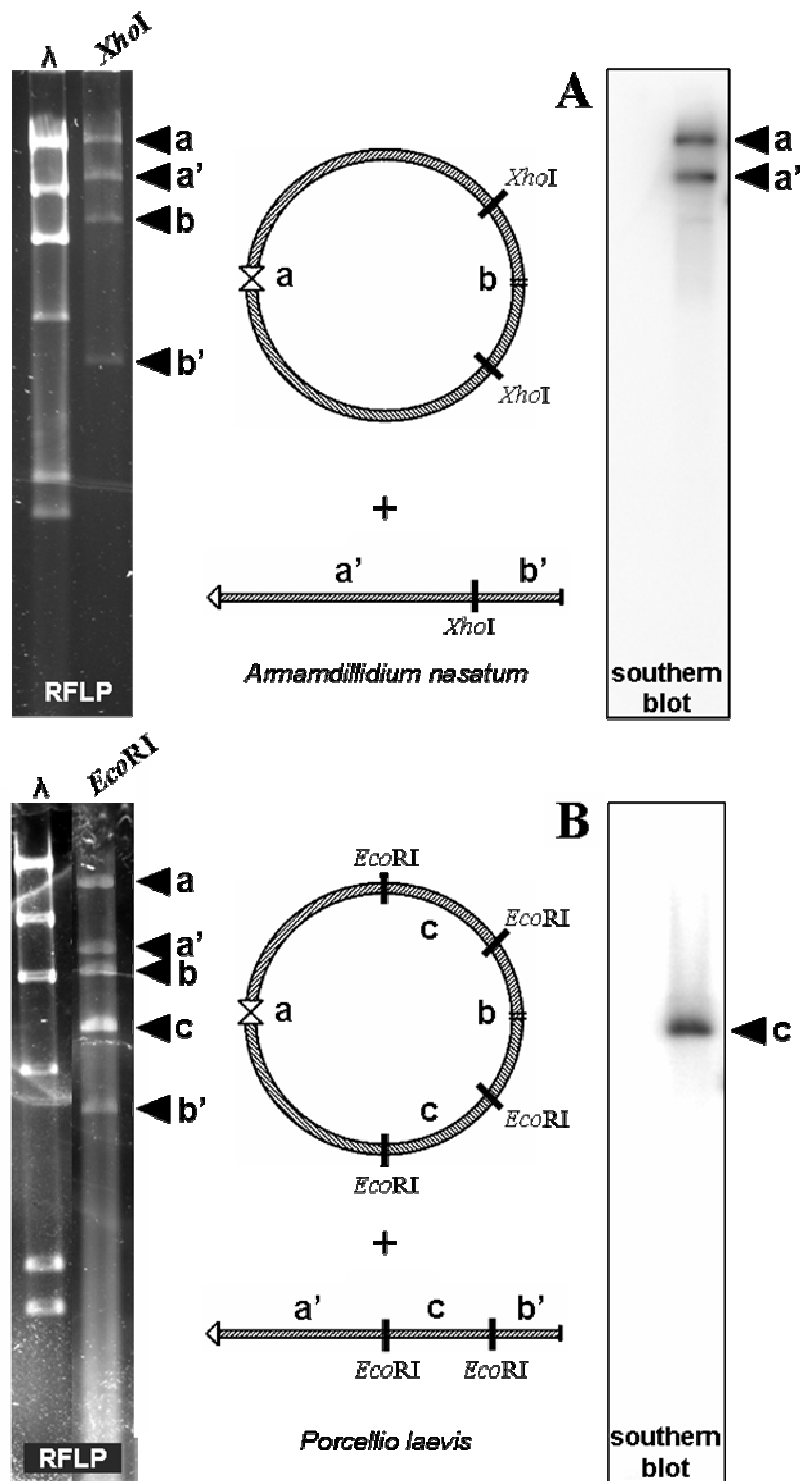
Animals derived from females sampled in the field were isolated and reared in order to obtain iso-female lineages in the laboratory. MtDNA of such individuals from iso-female lineages was pooled. MtDNA of animals from the field was isolated separately: it was the case for the oniscid species *L. oceanica*, *P. hoffmannseggii*, *P. caudatus*, *T. tomentosa* and *H. couchii* and the non-oniscid Isopod species *A. aquaticus* (Asellota) and *S. serratum* (Flabellifera). For the complete list of tested species see table 2.

MtDNA was isolated from gonads, fat tissue and nervous system, by alkaline lysis method (Souty-Grosset *et al.* 1992). MtDNA samples (1-5 µg) were digested with endonucleases in exceed for 3 hours at 37°C, following manufacturer's instructions. Denaturated RFLP profiles have been done to confirm the atypical configuration of mtDNA. Denaturation have been performed by heating 5 min at 95°C followed by 5 min on ice (Raimond *et al.* 1999). Digested samples were mixed with a gel-loading buffer and then run on a 1.2% agarose gels in Tris EDTA phosphate buffer for 15 hours at 30 V (Raimond *et al.* 1999). Gels were stained with SYBR Green I (Lonza) and examined under UV light.

### Southern blot analyses

To confirm the presence of dimers and monomers in the atypical mtDNAs, southern blots analyses were performed using the mitochondrial gene *16SrRNA* as a probe. Digested DNA was southern blotted on nylon membranes (Positive™ Membrane; Qbiogene). Probes were prepared with *16SrRNA* amplified by PCR using the primers 16SF (CGGTTTGA ACTCAAATCATGTG) and 16SR (GCCTGTTTAACAAAACATC), specially designed for Isopod crustaceans from an alignment of the three available mt genomes: *A. vulgare* (Marcadé *et al.* 2007), *L. oceanica* (Kilpert & Podsiadlowski 2006) and *I. baltica* (Podsiadlowski & Bartolomaeus 2006). PCR products were labelled using [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP by the random primer method and hybridized overnight to membranes. Hybridized blots were imaged using a phosphoimager (Storm from Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

As some parts of this gene are very divergent among Oniscidean species (Michel-Salzat & Bouchon 2000), probes were made specifically to maximised hybridization. PCR program for *16SrRNA* gene amplification was 94°C for 2 min followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 50 to 54°C according to the species for 30 sec, and 72°C for 1 min, with a final



**Figure 1** Interpretation of restriction profiles and southern blot results, according to the molecular model of atypical mtDNA constituted by circular dimers and linear monomers. (A) *XhoI* digestion generate 4 bands RFLP profile (two couples of bands) on *Armadillidium nasatum* mtDNA, and a specific 16S rDNA probe show up the couple **a** and **a'** on southern blot. (B) *EcoRI* digestion generates 5 bands RFLP profile (two couples and one band shared by dimers and monomers) on *Porcellio laevis* mtDNA, and a specific 16S rDNA probe show up an unique band **c** on southern blot.



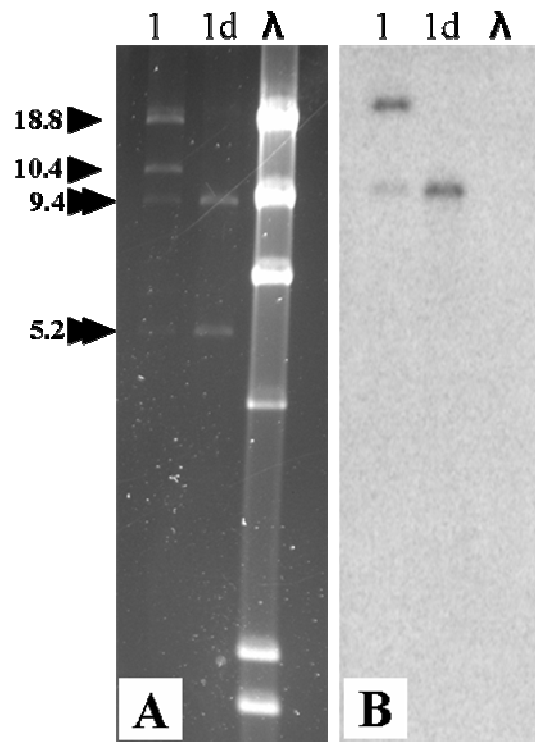
step at 72°C for 5 min. The *16SrRNA* probe was ~500 bp long according to the different species.

### Interpretation of RFLP profiles

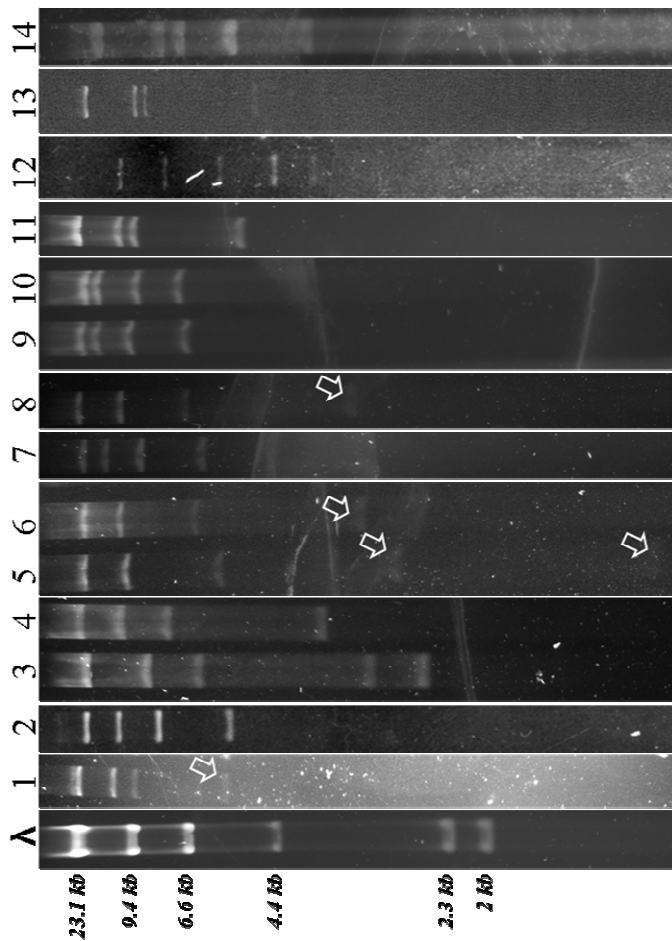
According to the circular configuration of classical metazoan mt genome, digestion of standard mtDNA provides a ~15 kb profile, with one band for a single restriction site, two bands for two restriction sites, and so on. In contrast, the configuration of the atypical mitochondrial genome, characterized by the presence of linear monomers and circular head-to-head dimers generates original patterns composed of four bands for a single restriction site. These four bands are organized in two couples: two bands from the circular head-to-head dimer (a and b in figure 1A) each coupled with their respective from the linear monomer (a' and b') of half their size. Additional restriction sites generate three fragments of identical size (i.e., two from dimers and one from monomers). These fragments are superimposed on agarose gels, leading to a single band with a high stoichiometry (fragment c in Figure 1B). On profiles with two or more restriction sites, bands with high stoichiometry have to be counted three times to obtain a correct estimation of the mtDNA size. This atypical mtDNA total size is therefore the sum of three fundamental monomers, estimated at 42 kb in *A. vulgare* (sum of three ~14 kb monomers).

Southern blots patterns are also different between in the case of atypical mtDNA. Southern blotted atypical mtDNA profiles hybridized with a *16rRNA* probe show a couple of bands when the *16rRNA* gene is situated in a fragment containing a dimer junction (figure 1A), and only one band when it is surrounded by restriction sites (figure 1B).

To confirm the molecular model of the atypical mtDNA, denaturations of digested products have been done. The figure 2 shows an example of restriction profile on *Cubaris murina* (Armadillidae) mtDNA digested with *XhoI*, before denaturation (1) and after denaturation (1d), in both RFLP (A) and southern blot analysis (B). While undenaturated digestion profiles show two couples of bands, denaturated profiles show only two bands. They are corresponding to the two palindromic bands from the dimers. These palindromic sequences allow refolding on themselves after denaturation, and migrate half of their sizes on agarose gels. In contrast, bands without palindromic sequences (i.e. from monomers) can not refold on themselves, and stay as single strand conformation, undetectable on agarose gels.



**Figure 2** Example of atypical mtDNA digestion-denaturation experiment. **(A)** RFLP profile of *Cubaris murina* mtDNA (Oniscidea: Armadillidae) and **(B)** southern blot revealed by a specific *16SrDNA* probe. 1: *XhoI* digestion pattern; 1d: *XhoI* digestion pattern after denaturation; λ Lambda phage marker cut with *HindIII*.



**Figure 3** MtdNA RFLP profiles of oniscid species.  $\lambda$ : Lambda phage marker cut with *Hind*III. 1: *Cubaris murina* mtDNA digested by *Xho*I, 2: *Armadillidium maculatum* digested by *Bam*HI, 3: *Armadillidium nasatum* by *Bam*HI, 4: *A. nasatum* by *Xho*I, 5: *Eluma purpurascens* by *Eco*RI, 6: *E. purpurascens* by *Xho*I, 7: *Cylisticus convexus* by *Pvu*II, 8: *C. convexus* by *Xho*I, 9: *Oniscus asellus* by *Bam*HI, 10: *O. asellus* by *Xho*I, 11: *Porcellio dilatatus dilatatus* by *Eco*RI, 12: *Porcellio gallicus* by *Bam*HI, 13: *P. gallicus* by *Eco*RI, 14: *Porcellio laevis* by *Eco*RI. Empty arrows shows bands difficult to see. Bands sizes are noticed in table 2.

**Table 1** Bands sizes (in kbp) of oniscid mtDNA RFLP, according to the profiles shown in figure 3. Underlined numbers correspond to high stoichiometric bands that need to be counted three times. Total 1: all bands are counted once. Total 2: High intensity bands sizes (underlined) are multiplied by three. *A. mac.* = *A. maculatum* and *P. d. dil.* = *P. dilatatus dilatatus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>C. murina</i>	<i>Xho</i> I	<i>A. mac.</i>	<i>A. nasatum</i>	<i>E. purpurascens</i>	<i>C. convexus</i>	<i>O. asellus</i>	<i>P. gallicus</i>	<i>P. laevis</i>						
									<i>Bam</i> HI	<i>Xho</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI
18.6	17	17	21	21	17.6	22	18.8	18.6	18.8	18.8	18.8	11	18.4	14
10	11	8.5	10.5	10.5	11	11	13.2	13.4	13.2	13.4	9.8	8	9.6	7
9.3	8.5	6	7	6.6	8.8	6.6	9.4	9.3	9.4	9.3	9.4	5.5	9.2	6.7
5	5.5	3	3.5	2.9	5.5	3.3	3.3	6.7	6.6	6.7	4.9	4.4	4.8	5
		<u>2.5</u>		<u>1.1</u>								4		3.35
<b>Total 1</b>	42.9	42	37	42	42.9	42.9	42.9	48	48	48	42.9	32.9	42	36.05
<b>Total 2</b>			42	42	42	42.9	42.9	48	48	48	42.9	41.7	42	42.7

## RESULTS

### Distribution of atypical mtDNA in Oniscidea

Figure 3 shows RFLP profiles for 9 oniscid species with atypical mtDNA. MtDNA sizes from these RFLP profiles are calculated in table 1. RFLP profiles for the species *A. depressum*, *C. elongata*, *H. couchii*, *P. muscorum*, *P. hoffmannseggii*, *P. caudatus* and *T. tomentosa* are not available as their profiles are not visible on agarose gels, but atypical mtDNA structure was revealed by southern blot analyses (data not shown). Moreover, denaturated RFLP analyses performed on 3 species : *C. murina* (figure 2), *P. muscorum* and *C. elongata* confirmed the atypical structure of their mtDNA composed of head-to-head circular dimers associated to linear monomers (Raimond *et al.* 1999).

RFLP analyses revealed that atypical structure of mtDNA is widespread in oniscid isopods. Within this order we found 18 species (from 8 families) with an atypical mtDNA, similar of those of *A. vulgare* and *P. pruinosus* (table 2). The only oniscid species for which we found a classical ~15 kb circular mtDNA is *Ligia oceanica*. Only southern blot profiles are available. Profiles and band sizes observed are in agreement with the sequence NC\_008412 available on line, published by Kilpert & Podsiadlowski (2006) (figure 4).

### Atypical genome size in oniscid mitochondria

The total size of mtDNA has been calculated from agarose gels by summing the bands of RFLP profiles (see table 1). The large majority of oniscid species with an atypical mtDNA have a total mt genome size ranging from ~41 to ~43 kb, corresponding to dimers of ~28 kb plus monomers of ~14 kb, as it has been found for *A. vulgare* and *P. pruinosus* (Marcadé *et al.* 1999; Raimond *et al.* 1999). This is the case of the species belonging to the families Armadillidae, Armadillidiidae, Cylisticidae and Porcellionidae. Beside, the species *Oniscus asellus* (family Oniscidae) harbour a larger mtDNA of ~48 kb, composed of ~32 kb dimers and ~16 kb monomers.

### MtDNA structure of non-oniscid species

Two non-oniscid Isopod species have been tested: the freshwater *Asellus aquaticus* (Asellota) and the marine *Sphaeroma serratum* (Flabellifera). The few amount of mtDNA obtained by DNA isolation of separated individuals did not allowed visualising any RFLP profile on agarose gels. Thus, results only include southern blot analysis. However, this technique enabled to get reliable information on mtDNA structure for these species.

**Table 2** Distribution of the atypical structure of mtDNA, heteroplasmy (Doublet *et al.* 2008) and origin of 22 isopod species. A = atypical mtDNA. C = Classical mtDNA. In the column heteroplasmy + means heteroplasmic at the tRNA<sup>Ala/Val</sup>, - means homoplasmic and n.d. means undetermined.

SUB-ORDER Family	Species	Genome structure	Heteroplasmy	Origins
ASELLOTA				
Asellidae	<i>Asellus aquaticus</i>	A	n.d.	Poitiers, Fr.
FLABELLIFERA				
Sphaeromatidae	<i>Sphaeroma serratum</i>	C	n.d.	La Rochelle, Fr.
ONISCIDEA				
Diplocheta				
Ligiidae	<i>Ligia oceanica</i>	C	-	La Rochelle, Fr.
ONISCIDEA				
Crinocheta				
Armadillidae	<i>Cubaris murina</i>	A	+	Baie Mahaut, Gp.
Armadillidiidae	<i>Armadillidium depressum</i>	A	+	Ste Marie, Fr.
	<i>Armadillidium maculatum</i>	A	+	Eze, Fr.
	<i>Armadillidium nasatum</i>	A	+	Mignaloux, Fr.
	<i>Armadillidium vulgare</i>	A <sup>1</sup>	+	Camarade, Fr. Helsingør, Dk. Acireale, It. Marbella, Sp. Heraklion, Gr. São Paulo, Br.
	<i>Eluma purpurascens</i>	A	n.d.	Chizé, Fr.
Cylisticidae	<i>Cylisticus convexus</i>	A	+	Villedaigne, Fr.
Halophilosciidae	<i>Halophiloscia couchii</i>	A	n.d.	La Rochelle, Fr.
Oniscidae	<i>Oniscus asellus</i>	A	n.d.	Edinburgh, UK
Philosciidae	<i>Philoscia muscorum</i>	A	-	La Mothe S <sup>t</sup> Hér., Fr.
	<i>Chaetophiloscia elongata</i>	A	-	Celles-sur-Belle, Fr.
Platyarthridae	<i>Platyarthrus hoffmannseggii</i>	A	+	Chizé, Fr.
	<i>Platyarthrus caudatus</i>	A	+	Scopello, It.
	<i>Trichorhina tomentosa</i>	A	n.d.	Baie Mahaut, Gp.
Porcellionidae	<i>Porcellio laevis</i>	A	n.d.	Fr.
	<i>Porcellio gallicus</i>	A	+	Montpellier, Fr.
	<i>Porcellio dilatatus dilatatus</i>	A	n.d.	Rom, Fr.
	<i>Porcellionides pruinosus</i>	A <sup>2</sup>	n.d.	Mignaloux, Nevers, Poitiers, St Martin-du- Fouilloux, Fr. Athens, Gr. St Paul, Re. Tunis, Tu.

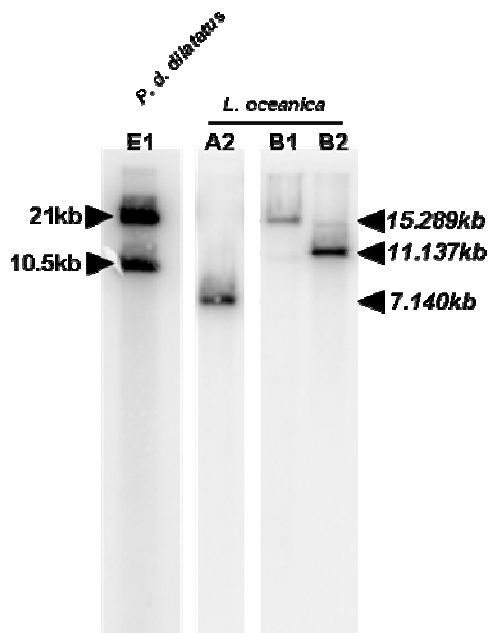
<sup>1</sup>Raimond *et al.* (1999), <sup>2</sup>Marcadé *et al.* (1999). Br.: Brazil, Dk.: Denmark, Fr.: France, Gp.: Guadeloupe, Gr.: Greece, It.: Italia, Re: Reunion Island, Sp.: Spain, Tu.: Tunisia, UK: United Kingdom.

RFLP-Southern blot profiles on *Sphaeroma serratum* mtDNA with nine enzymes (*AvrII*, *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HincII*, *HindIII* and *PvuII*) show 8 profiles of only one band, ranging from ~15 kb (*BamHI*) to ~3 kb (*EcoRI* and *HindIII*), and one profile with two bands (with *AvrII*). This last one could be the result of a restriction site on the *16SrRNA* gene as no labelled band was obtained after denaturation of this digestion product (data not shown). These results suggest a classical circular monomeric mtDNA structure for *S. serratum*.

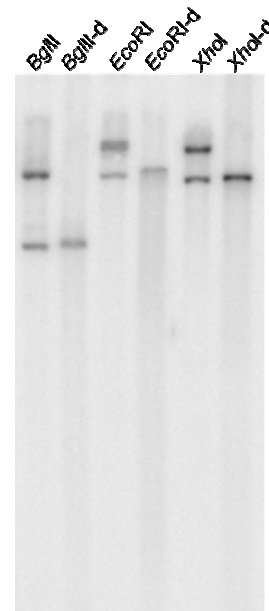
RFLP-Southern blot profiles on *Asellus aquaticus* mtDNA with five different enzymes revealed only one profile with a single band (*HincII*, data not shown), and four profiles with two bands (with *AvrII*, *BglII*, *EcoRI* and *XhoI*). Denaturation of these four digestion products give one band patterns, generated by the refolding of dimers band on themselves, indicating an atypical structure of mtDNA similar to those of oniscid species (figure 5).

### Atypical mtDNA and heteroplasmy

In our samples, 12 species with an atypical mitochondrial genome also harbour a dual tRNA. However, all the species with an atypical genome do not have a dual tRNA. It is the case for both Philosciidae species *Philoscia muscorum* and *Chaetophiloscia elongata* (Table 2).



**Figure 4** Southern blot analyses of *L. oceanica* mtDNA. E1 is a reference of *P. dilatatus dilatatus* mtDNA digestion with *EcoRI*. A2, B1 and B2 are *L. oceanica* mtDNA digestion by *AvrII*, *BamHI* and *BglII* respectively. Sizes in kb on the right correspond to the expected sizes calculated from the mt genome sequence of *L. oceanica* (NC\_008412). Southern blots are revealed by specific *16SrDNA* probes.



**Figure 5** Southern blot on *Asellus aquaticus* mtDNA (Asellota: Asellidae) revealed by a specific *16SrDNA* probe. Enzymes are *BglII*, *EcoRI*, and *XhoI*. *BglII-d*, *EcoRI-d* and *XhoI-d* correspond to denatured RFLP profiles.

## DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the distribution of the atypical structure of mtDNA among Oniscidea by RFLP analyses. Among 19 species of Oniscidea tested, 18 harbour an atypical mt genome with a total size ranging from ~42 kb (i.e. 3x~14 kb, e.g. *Armadillidium* sp.) to ~48 kb (i.e. 3x~16 kb, e.g. *Oniscus asellus*), all belonging to the group of Crinocheta (group that include 80% of oniscid species). As a control, we used the sea slater *L. oceanica*, known to harbour a classical mtDNA structure of 15,289 bp (Kilpert & Podsiadlowski 2006). This species, from the genus *Ligia*, is considered as a prototypal land isopod (Carefoot & Taylor 1995), and currently branched basally in phylogenies of Oniscidea (Michel-Salzat & Bouchon 2000; Mattern 2003; Schmidt 2008).

More widely, we examined the mt genome structural organization of two non-oniscidean isopod species: the marine *S. serratum* (Spheromatidae), from the sub-order Flabellifera, sister-group of Oniscidea, and the freshwater *A. aquaticus* (Asellidae) from the sub-order Asellota, assumed to be primitive Isopods (Wägele 1989; Brusca & Wilson 1991; Dreyer & Wägele 2002). In *S. serratum*, we observed the presence of a classical circular monomer as in *L. oceanica*. In *A. aquaticus* we unexpectedly observed an atypical mtDNA. These results suggest that the atypical structure of mtDNA could have appeared at least before the divergence of the different Isopods sub-orders, ~250 million years ago (oldest fossil record of Asellota dated to late Paleozoic; Wilson 1999), and might be widespread in Isopods.

The presence of atypical mtDNA in the early isopod Asellota but not in *S. serratum* and the oniscid *L. oceanica* suggest potential reversions or convergences of the linearization and dimerization of the mt genome during Isopod evolution. In the first case, reversion might have occurred in *S. serratum* and *L. oceanica*, while in the second case, convergences may have occurred in *A. aquaticus* and Crinocheta oniscids. To clarify this distribution of atypical mtDNA and its evolution in isopods, more investigations are needed among the different sub-order and families. Otherwise RFLP investigation could be extended to sister groups of isopods from the super-group of Peracarida. Although, recent sequencing of the complete mitochondrial genome of the amphipod *Metacrangonyx longipes* revealed a classical organization of mtDNA constituted by circular monomers (Bauzà-Ribot *et al.* 2009), possible reversions of mtDNA structure argue for a possible fragmented distribution of atypical mtDNA. Besides, as the relative position of Isopods within Peracarida is still in debate (Poore 2005; Spears *et al.* 2005; Jenner *et al.* 2009; Wills *et al.* 2009; Wilson 2009), as well as the phylogenetic relationship within Isopod sub-order (Wägele 1989; Brusca & Wilson 1991;

Wetzer 2001; Wilson 2009), the use of the mtDNA structure, together with the traditional morphological and molecular markers, could be useful.

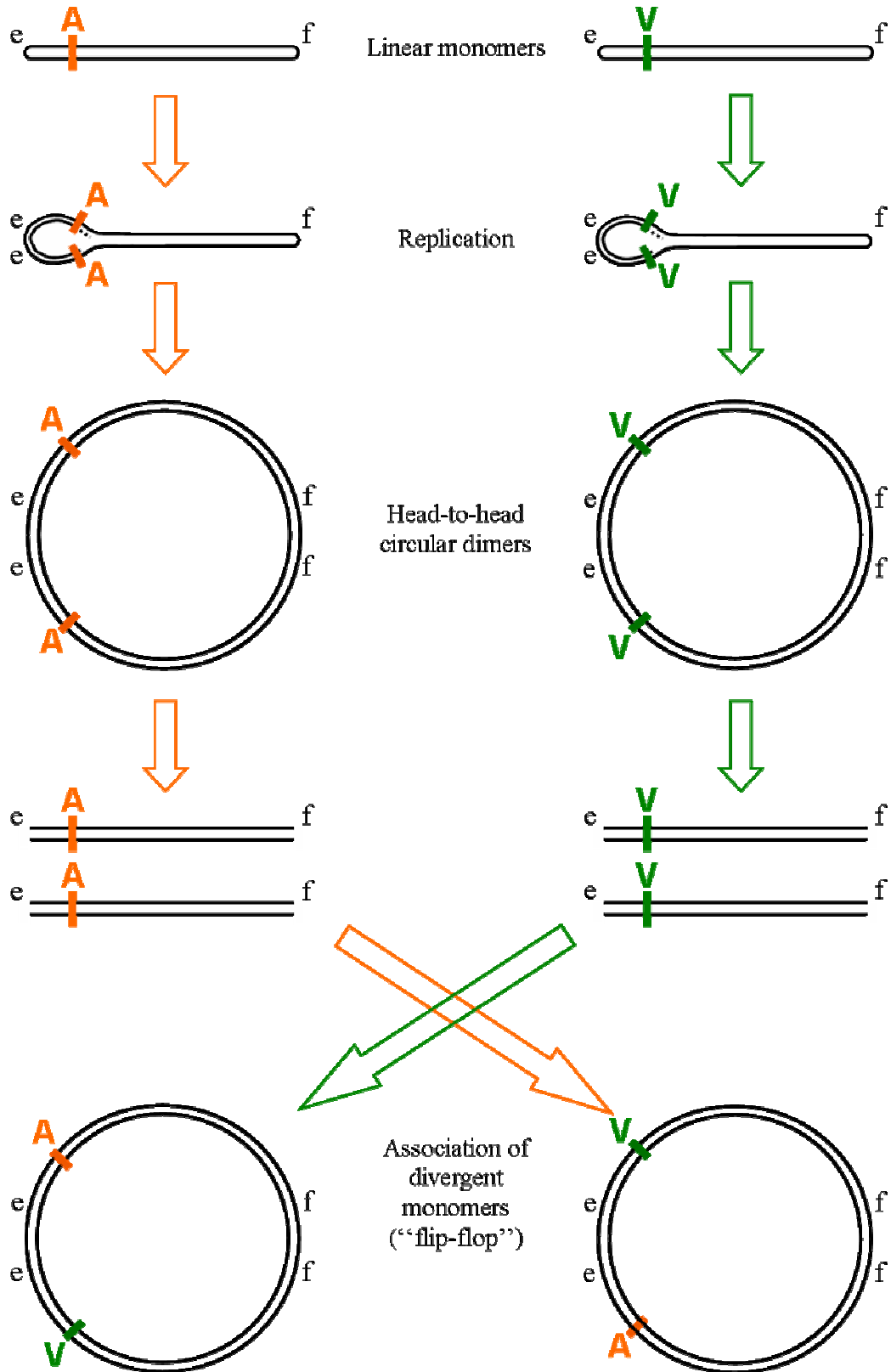
### **Dimers as products of replication**

We may wonder how this structure have appeared and has been maintained during so long time. To have more insight about it, we should examined the functional constraints and the selective pressures that act on the genome structure. Generally in metazoan mtDNA, the only mtDNA form that exists and replicates is a circular monomer (Boore 1999). In the case of the atypical mtDNA of Isopods, no circular monomer is reported by RFLP analyses. Indeed the replicative form might be one of the two kinds of molecules: circular dimers or linear monomers.

If the replication is performed from the linear molecules, dimers could be the products of replication. This peculiar way of replication have been mentioned to explain the presence of head-to-head circular dimers in yeast mtDNA (Dinouël *et al.* 1993), as well as in *Borrelia Spirochetes* (Casjens 1999). In both cases, authors proposed a model with a circular dimer replications intermediates of the linear monomers. These linear molecules should have hairpin-like ends (telomeres) to complete the replication and generate dimers with head-to-head and tail-to-tail junctions (Dinouël *et al.* 1993; Casjens 1999). This kind of replication generates circular palindromes of twice the size of the monomer, as it is observed in the atypical mtDNA of isopods. Resolution into monomeric linear DNAs could occur either by a site-specific nuclease that nicks palindromic circles at the junctions (Dinouël *et al.* 1993) or strand separation of dimers (Casjens 1999). Ravin *et al.* (2001) observed this mechanism in a bacteriophage plasmid, where they identified a protelomerase enzyme responsible of the partition of two monomers from circular replication intermediates head-to-head dimers.

Interestingly, the presence of such telomeres could explain the difficulties of cloning linear extremities of monomers (Marcadé *et al.* 2007). Moreover, dynamic system allowing linear monomers to generate circular head-to-head dimers through replication can promote homogenization of nucleotide sequences of every monomer that composed both linear and circular forms. Interestingly, such homogenization is congruent with the conservation of the restriction enzymes sites between monomers and dimers observed in our RFLP analyses. Moreover, homogenization has been observed on the mt genome partially sequenced of *A. vulgare*, where only one base was observed to be polymorphic (Marcadé *et al.* 2007).





**Figure 6** Schematic representations explaining the origin of head-to-head circular dimers in the atypical mtDNA of Isopods. A = Alanine, V = Valine, e and f designate both extremities of monomers.

### **Dimers as vector for stable heteroplasmy**

Another way of formation of head-to-head circular dimers could be the direct association of two linear monomers. Such association could have the advantage to linked divergent mitotypes. Interestingly, mt genomes of several oniscid species present an original dual tRNA, alloacceptor for Alanine (UGC) and Valine (UAC), resulting from a polymorphic site on the second base of the tRNA anticodon (Doublet *et al.* 2008). These two tRNAs are essential for mitochondrial translation and have to be transmitted together, while no other tRNA Alanine and Valine have been found in the mtDNA of *A. vulgare*. The association of two monomers with different tRNA, creating a polymorphic dimer, will be an ideal way to avoid the mtDNA bottleneck during oogenesis (Khrapko 2008; Wai *et al.* 2008), as well as mtDNA segregation during mitosis. Dimers will be in this case a potential vector for heteroplasmy inheritance.

Moreover, maintenance of dimers in oniscid mtDNA could be necessary for heteroplasmy transmission. Both essential tRNAs Alanine and Valine might constrain the conservation of dimers that harbour both tRNAs. In such a case, heteroplasmy became a pressure for the maintenance of dimers. However, this hypothesis does not fit in the cases of the species *Philoscia muscorum* and *Chaetophiloscia elongata* that do not present the two tRNAs Alanine and Valine on the same mitochondrial locus. For these species, dimers should be maintained by another selective force, which could be another heteroplasmy.

Direct association of monomers in head-to-head dimers is not common in organellar DNA. To our knowledge, only one example has been described for such association, i.e. two circular monomers through intermolecular recombination event in chloroplast DNA of spinach and lettuce (Kolodner & Tewari 1979). Still, in these cases recombinations are produced via circular monomers, which do not exist in the atypical mtDNA of Isopod. Indeed, formation of head-to-head circular dimers in atypical mtDNA, through an association of monomers, might occur from linear forms.

### **A non exclusive hypothesis**

The high sequences conservation between monomers and dimers observed in *A. vulgare* mtDNA (Marcadé *et al.* 2007) is in favour of a circular head-to-head replication intermediate mechanism, while the presence of inherited heteroplasmy (Doublet *et al.* 2008) coupled with the atypical structure of mtDNA in many oniscid species argue for a fusion of divergent monomers. However, a mixed hypothesis could be raised, involving a dissociation of monomers from neo-replicated dimers, following by a reassociation of divergent

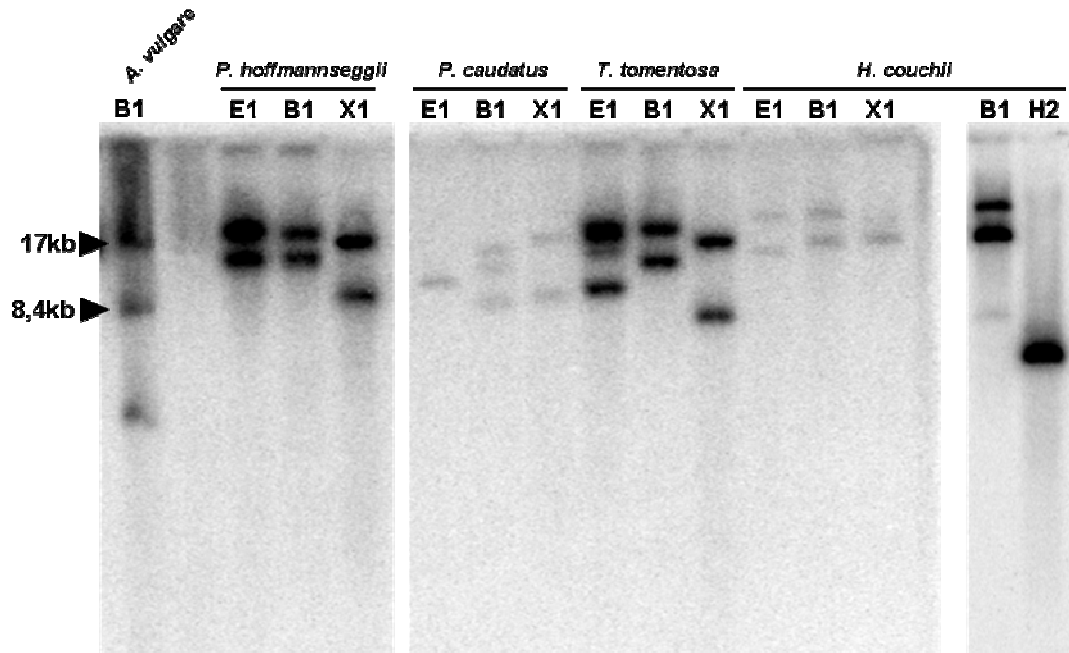
monomers. This “flip-flop” hypothesis, proposed in mtDNA of yeast by Dinouël *et al.* (1993), could promote the formation of dimers with the two tRNAs Alanine and Valine (Figure 6). However, it is still unclear why the association of two divergent monomers will reform a palindromic head-to-head circular dimer, rather than a linear dimer, or a head-to-tail circular dimer.

## CONCLUSIONS

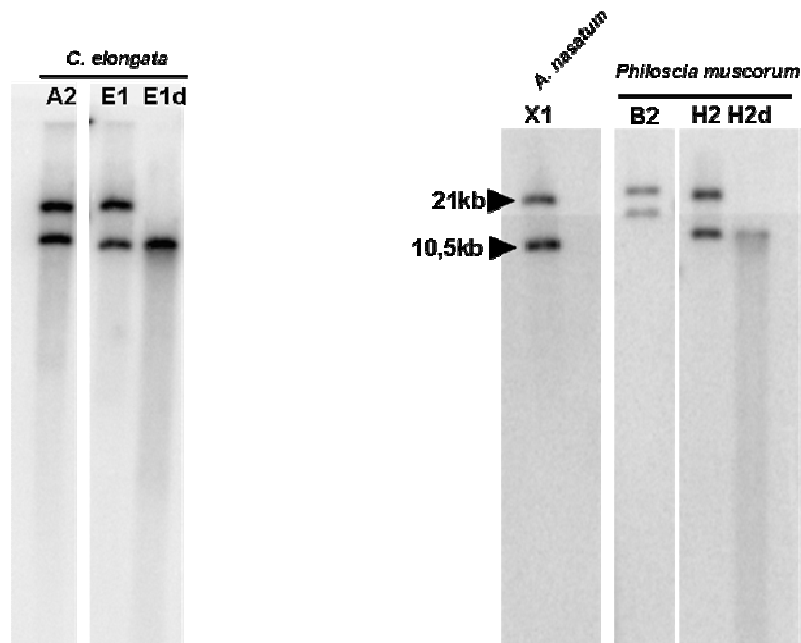
Many complete metazoan mitochondrial genomes have been sequenced, providing a lot of information on nucleotides and genes composition, genes order, which are useful for phylogeny. However, nucleotides sequences can not provide global information on structural organization of genomes. One of the most striking examples is the atypical mitochondrial genome of the terrestrial crustacean *A. vulgare* (Isopoda: Oniscidea). This original structure was firstly described through RFLP analyses, while sequencing failed to recover the totality of the genome.

Here, we show that the atypical mtDNA structure found in *A. vulgare* and *P. pruinosus* (Marcadé *et al.* 1999; Raimond *et al.* 1999) is widespread in Oniscidea, and potentially widely distributed among isopods. We also observed that reversions or convergences in mtDNA structure might have happen during Isopod evolution. Factors that affect maintenance of this structure of mtDNA remain unknown. However, the presence of both dimers and a constitutive heteroplasmy on a dual tRNA gene (Doublet *et al.* 2008) in several oniscid species, suggest that heteroplasmy may favour the maintenance of dimers.

To provide more information on the relation between these two features, it will be necessary to clone the junction's zones of the dimers and get the sequence of both tRNA of each side. Sequencing the junction zones of the palindromic dimers, as well as extremities of the linear monomers will be as well of prime interest for the description of the replication mechanisms of the atypical mtDNA. Finally, we demonstrate that further studies on Isopods mt genomes, or more largely Peracarid Crustaceans, should include RFLP analyses to complete the survey of mtDNA structure. This is particularly true for the marine isopod *Idotea baltica*, for which sequencing failed to clarify its structure (Podsiadlowski & Bartolomaeus 2006).



**Figure VI-1 :** Southern blot des profils RFLP de l'ADNmt des espèces *Platyarthrus hoffmannseggii*, *P. caudatus* et *Trichorina tomentosa* (Platyarthridae) et *Halophiloscia couchii* (Halophilosciidae) révélés par hybridation d'une sonde 16ARNr radiomarquée, amplifiée à partir d'ADN de *P. hoffmannseggii*. Les enzymes de restriction sont : *Eco*RI (E1), *Bam*HI (B1), *Xho*I (X1) et *Hinc*II (H2). A gauche, un contrôle de taille a été réalisé à l'aide de l'ADNmt d'*Armadillidium vulgare* digéré par *Bam*HI (B1).



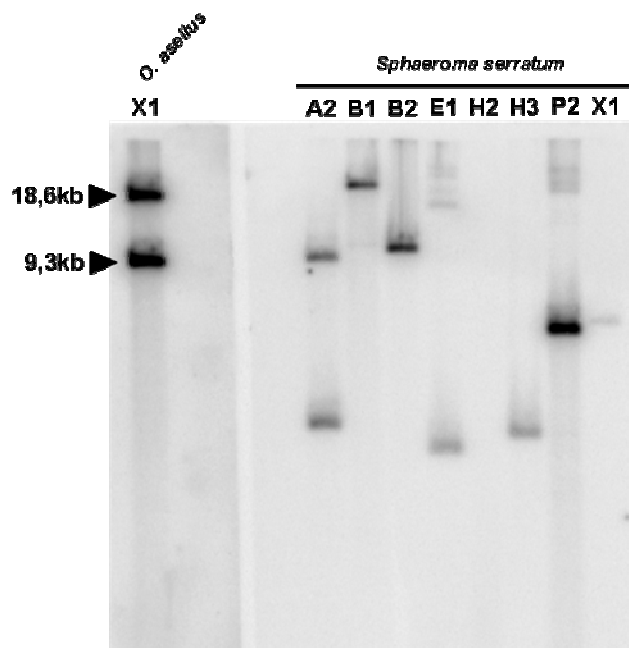
**Figure VI-2 :** Southern blot des profils RFLP de l'ADNmt de *Chaetophiloscia elongata* révélés par hybridation d'une sonde 16ARNr radiomarquée, amplifiée à partir d'ADN de *C. elongata*. Les enzymes de restriction sont : *Avr*I (A2), *Eco*RI (E1), et *Eco*RI après dénaturation (E1d).

**Figure VI-3 :** Southern blot des profils RFLP de l'ADNmt de *Philoscia muscorum* révélés par hybridation d'une sonde 16ARNr radiomarquée, amplifiée à partir d'ADN de *P. muscorum*. Les enzymes de restriction sont : *Bgl*II (B2), *Hinc*II (H2), et *Hinc*II après dénaturation (H2d). A gauche, un contrôle de taille a été réalisé à l'aide de l'ADNmt d'*Armadillidium nasatum* digéré par *Xho*I (X1).

## 2. Résultats de southern-blot

Certains résultats n'ont pas été présentés dans le manuscrit de la publication précédente. Ces résultats sont des southern blots effectués à partir d'échantillons qui n'avaient pas donné de résultats visibles en RFLP sur les gels d'agarose, à cause d'une trop faible quantité d'ADNmt (individus isolés). Les southern blots effectués sur ces échantillons ont révélé des profils d'ADNmt atypiques pour plusieurs espèces d'Oniscidea. C'est le cas des espèces de la famille des Platyarthridae *Platyarthrus hoffmannseggii*, *Platyarthrus caudatus*, *Trichorhina tomentosa* et de l'espèce *Halophiloscia couchii* (famille des Halophilosciidae) – (figure VI-1). C'est également le cas des espèces de la famille des Philosciidae *Chaetophiloscia elongata* (figure VI-2) et *Philoscia muscorum* (figure VI-3).

En revanche, les southern blots effectués sur les échantillons de l'Isopode marin *Sphaeroma serratum* (Sphaeromatidae) ont révélé un profil d'ADNmt de type classique constitué de monomères circulaires (figure VI-4).



**Figure VI-4** : Southern blot des profils RFLP de l'ADNmt de *Sphaeroma serratum* révélés par hybridation d'une sonde *16ARNr* radiomarquée, amplifiée à partir d'ADN de *S. serratum*. Les enzymes de restriction sont : *Avr*I (A2), *Bam*HI (B1), *Bgl*II (B2), *Eco*RI (E1), *Hin*clI (H2), *Hin*dIII (H3), *Pvu*II (P2), *Xho*I (X1). A gauche, un contrôle de taille a été réalisé à l'aide de l'ADNmt d'*Oniscus asellus* digéré par *Xho*I (X1).

**Tableau VI-1** : Statuts d'infection par *Wolbachia* des espèces dont nous connaissons la structure de l'ADNmt. La structure est notée : A = Atypique et C = Classique. Dans la colonne 'Hétéroplasmie', + = hétéroplasmique sur l'ARNt bivalent, - = homoplasmique et n.d. = non déterminé (d'après Doublet *et al.* 2008). Le statut d'infection par *Wolbachia* est noté + ou -. Ces données sont une compilation d'après (1) Bouchon *et al.* (1998), (2) Bouchon *et al.* (2008), (3) Ben Afia Hatira *et al.* (2008), (4) Marcadé *et al.* (1999), (5) D. Bouchon, comm. pers. et (6) ce travail.

SOUS-ORDRE Famille	Espèces	Structure du Génome	Hétéroplasmie	Statut d'infection par <i>Wolbachia</i>
<b>ASELLOTA</b>				
Asellidae	<i>Asellus aquaticus</i>	A	n.d.	+ <sup>(1,6)</sup>
<b>FLABELLIFERA</b>				
Sphaeromatidae	<i>Sphaeroma serratum</i>	C	n.d.	- <sup>(1,6)</sup>
<b>ONISCIDEA</b>				
Diplocheta				
Ligiidae	<i>Ligia oceanica</i>	C	-	+ <sup>(1)</sup>
<b>ONISCIDEA</b>				
Crinocheta				
Armadillidae	<i>Cubaris murina</i>	A	+	+ <sup>(2,6)</sup>
Armadillidiidae	<i>Armadillidium depressum</i>	A	+	+ <sup>(6)</sup>
	<i>Armadillidium maculatum</i>	A	n.d.	- <sup>(5)</sup>
	<i>Armadillidium nasatum</i>	A	+	+ <sup>(1)</sup>
	<i>Armadillidium vulgare</i>	A <sup>a</sup>	+	+ <sup>(1,2)</sup>
	<i>Eluma purpurascens</i>	A	n.d.	+ <sup>(6)</sup>
Cylisticidae	<i>Cylisticus convexus</i>	A	+	+ <sup>(1)</sup>
Halophilosciidae	<i>Halophiloscia couchii</i>	A	n.d.	- <sup>(6)</sup>
Oniscidae	<i>Oniscus asellus</i>	A	n.d.	+ <sup>(1)</sup>
Philosciidae	<i>Philoscia muscorum</i>	A	-	+ <sup>(1)</sup>
	<i>Chaetophiloscia elongata</i>	A	-	+ <sup>(1)</sup>
	<i>Platyarthrus hoffmannseggii</i>	A	+	+ <sup>(2)</sup>
Platyarthridae	<i>Platyarthrus caudatus</i>	A	+	+ <sup>(5)</sup>
	<i>Trichorhina tomentosa</i>	A	n.d.	- <sup>(5)</sup>
	<i>Porcellio laevis</i>	A	n.d.	+ <sup>(3)</sup>
Porcellionidae	<i>Porcellio gallicus</i>	A	+	+ <sup>(5)</sup>
	<i>Porcellio dilatatus dilatatus</i>	A	n.d.	- <sup>(6)</sup>
	<i>Porcellionides pruinosus</i>	A <sup>b</sup>	n.d.	+ <sup>(4)</sup>

<sup>a</sup>Raimond *et al.* (1999)

<sup>b</sup>Marcadé *et al.* (1999)

## ***B. Influence de Wolbachia sur la propagation de l'ADNmt atypique***

Nous avons vu que l'apparition de la structure atypique de l'ADNmt est ancienne chez les Isopodes. Sa présence chez l'espèce d'eau douce *Asellus aquaticus* nous indique qu'elle serait antérieure à la divergence des sous-ordres des Asellota et des Oniscidea, datée d'environ 250 millions d'années (Wilson 1999). Cependant, nous ne savons pas quels facteurs ont pu influencer la mise en place de cette structure atypique, ainsi que les facteurs qui ont pu contribuer à sa diffusion.

Parmi les facteurs qui ont pu jouer dans la propagation de l'ADNmt atypique, un intérêt particulier peut être porté aux bactéries endosymbiotiques *Wolbachia*. Ces bactéries sont en effet connues pour être des parasites de la reproduction de leurs hôtes. Comme les mitochondries, elles se transmettent maternellement, et pour augmenter leur potentiel de dispersion, elles ont développé plusieurs stratégies favorisant le sexe femelle dans les populations d'hôtes.

Ces *Wolbachia* sont courantes chez les Isopodes et assez largement répandues chez les Oniscidea. Leur présence est estimée à environ 61% des espèces d'Oniscidea (Bouchon *et al.* 1998; Ben Afia Hatira *et al.* 2008; Bouchon *et al.* 2008), chez lesquelles leurs effets sont bien connus. Deux phénotypes ont été décrits : (i) elles peuvent induire une incompatibilité cytoplasmique entre des mâles infectés et des femelles non infectées (Legrand & Juchault 1986; Moret *et al.* 2001), ou (ii) provoquer une féminisation des mâles (Martin *et al.* 1973; Juchault *et al.* 1994; Bouchon *et al.* 2008). Ces deux phénomènes ont pour conséquence de favoriser la reproduction des femelles infectées et donc la propagation des bactéries. Toutefois, cela n'est pas sans impacts sur la diversité génétique mitochondriale des hôtes. Plusieurs études ont montré que la présence de souches féminisantes de *Wolbachia* pouvait entraîner une baisse de la diversité de l'ADNmt dans les populations d'Oniscidea (Marcadé *et al.* 1999; Rigaud *et al.* 1999a). Ce phénomène d'auto-stop (hitchhiking) est simple : en favorisant la reproduction des femelles infectées, les *Wolbachia* s'imposent vite dans une population, entraînant avec elles le mitotype qui leur est associé dans le cytoplasme.

Ce phénomène d'auto-stop aurait-il pu favoriser la propagation de l'ADNmt atypique ? Ce lien entre *Wolbachia* et l'ADNmt atypique des Isopodes semble difficile à démontrer. Dans le tableau VI-1 nous présentons le statut d'infection par *Wolbachia* des espèces dont nous connaissons la structure de l'ADNmt. Ce tableau a été réalisé à partir de données disponibles dans la littérature (Bouchon *et al.* 1998; Ben Afia Hatira *et al.* 2008;



Bouchon *et al.* 2008), ainsi que par des tests de présence de la bactérie chez des espèces pour lesquelles aucune donnée n'était disponible (tests d'amplification par PCR du gène bactérien *wsp*). Nous pouvons voir dans ce tableau qu'une majorité des espèces possède un ADNmt atypique et hébergent des *Wolbachia*, mais des *Wolbachia* sont aussi observées chez des espèces au génome mitochondrial classique. Il n'y a donc pas de lien direct entre les *Wolbachia* et la structure atypique du génome mitochondrial des Isopodes.

Néanmoins, si nous ne voyons pas de lien direct entre la présence de *Wolbachia* et celle de l'ADNmt atypique, nous pouvons imaginer que ce lien est plus ancien. En effet, il est possible que l'ancêtre commun des Oniscidea et des Asellota, chez lequel est apparue la structure atypique du génome mitochondrial, ait pu héberger des *Wolbachia*. Si cette souche hypothétique provoquait de plus un biais de la sex-ratio en faveur des femelles, nous pourrions imaginer qu'un phénomène d'auto-stop se serait mis en place et aurait permis une rapide propagation de l'ADNmt atypique à partir de cet Isopode ancestral.

Les datations de l'émergence des *Wolbachia* ne semblent pas pouvoir supporter cette hypothèse. Alors que nous estimons la divergence des Oniscidea et des Asellota à au moins 250 million d'années, celle des différentes souches de *Wolbachia*, infestant les nématodes et les Arthropodes, est estimée à 100 millions d'années (Bandi *et al.* 1998). Il semble donc que l'ADNmt atypique soit antérieur à la présence des *Wolbachia* chez les Arthropodes. Toutefois, l'estimation de l'âge des souches de *Wolbachia* est difficile, de par l'évolution rapide du génome de ces bactéries, les transferts horizontaux de ces symbiotes entre différents hôtes, et les recombinaisons qui peuvent se faire entre les souches (Baldo *et al.* 2006; Verne *et al.* 2007; Werren *et al.* 2008). Nous ne pouvons donc pas affirmer que l'ancêtre commun Isopode chez lequel est apparu l'ADNmt atypique ne portait pas de *Wolbachia*, ou toute autre bactérie parasite de la reproduction.

### ***C. Résultats préliminaires sur la synténie de l'ADNmt des Oniscidea***

Dans le travail présenté précédemment, nous avons démontré que la structure atypique de l'ADNmt est présente chez la majorité des Oniscidea. Dans notre échantillonnage, seule l'espèce *L. oceanica* présente un ADNmt classique. La méthode de RFLP que nous avons utilisée a mis en évidence la conservation des sites de restriction entre les monomères et les dimères de l'ADNmt atypique chez tous ces Oniscidea, comme cela avait été démontré chez *A. vulgare* et *P. pruinus* (Marcadé *et al.* 1999; Raimond *et al.* 1999). Comme pour ces deux espèces, nous l'avons interprété comme étant le résultat d'un système dynamique qui homogénéise les séquences entre les monomères et les dimères.

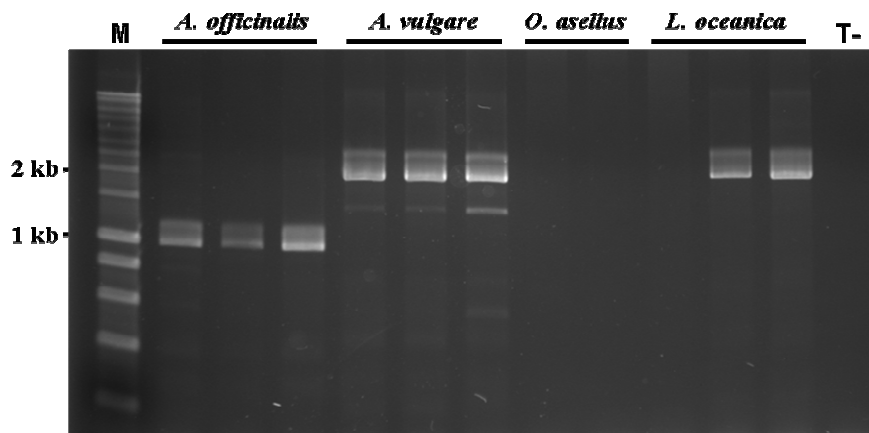
Si ce système favorise l'homogénéisation des séquences nucléotidiques entre monomères et dimères, peut-il avoir un effet sur la conservation de l'ordre des gènes mitochondriaux ? Lorsque nous avons séquencé l'ADNmt d'*A. vulgare*, nous avons vu que sa synténie (ordre des gènes) est identique à celle de deux autres Isopodes *L. oceanica* et *I. baltica* (Marcadé *et al.* 2007). Mais nous ne savons pas si cet ordre des gènes est conservé chez tous les Oniscidea. Pour tester l'hypothèse de la conservation de la synténie chez les espèces au génome atypique, nous avons effectué des amplifications de longs fragments d'ADNmt par PCR. Cette technique, déjà utilisée par Roehrdanz *et al.* (2002) lors d'une analyse de la conservation de la synténie mitochondriale chez les Arthropodes, a permis d'observer une synténie mitochondriale différente chez un Oniscidea, déterminé comme un *Oniscus sp.* Nous avons donc élargi cette étude à plusieurs espèces d'Oniscidea issues de notre échantillonnage. Seuls quelques résultats préliminaires ont été obtenus. Nous les présentons ici.

#### ***1. Conservation de l'ordre des gènes dans les génomes atypiques***

Pour réaliser cette analyse, nous avons examiné trois régions de l'ADNmt communes aux trois Isopodes dont nous connaissons la séquence de l'ADNmt : *A. vulgare*, *L. oceanica* et *I. baltica*. Ces trois régions sont situées : (i) entre les gènes *16SARNr* et *Cox1*, (ii) entre les gènes *Cox3* et *12SARNr* et (iii) entre les gènes *Nad5* et *Nad4*. Ces fragments d'ADNmt ont été amplifiés par PCR en utilisant des couples d'amorces spécialement dessinées pour ce travail, à l'aide des trois génomes mitochondriaux d'Isopodes (voir la séquence de ces amorces en annexe 4).

**Tableau VI-2 :** Etude de la synténie mitochondriale des Oniscidea, réalisée via des amplifications par PCR sur trois portions de génome. - signifie qu'aucune amplification n'a été obtenue. n.s. signifie des amplifications non spécifiques. Les tailles des amplifications sont notées en kilobases (kb) : lorsque les tailles ne sont pas en gras, elles correspondent à celles attendues, en revanche les tailles notées en gras ne sont pas celles attendues.

FAMILLE <i>Espèce</i>	Taille des amplifications		
	<i>16SARNr - Cox1</i>	<i>Cox3 - 12SARNr</i>	<i>Nad5 - Nad4</i>
AGNARIDAE			
<i>Hemilepistus reaumuri</i>	-	a	-
ARMADILLIDAE			
<i>Armadillo officinalis</i>	<b>1 kb</b>	a	a
ARMADILLIDIIDAE			
<i>Armadillidium maculatum</i>	-	a	a
<i>Armadillidium vulgare</i>	2 kb	2,5 kb	1,7 kb
<i>Armadillidium nasatum</i>	-	a	1,7 kb
<i>Armadillidium depressum</i>			1,7 kb
BALLONISCIDAE			
<i>Balloniscus sellowii</i>	-	a	a
CYLISTICIDAE			
<i>Cylisticus convexus</i>	-	a	a
LIGIIDAE			
<i>Ligia oceanica</i>	2 kb	2,5 kb	1,7 kb
ONISCIDAE			
<i>Oniscus asellus</i>	-	a	1,7 kb
<i>Oniscus lusitanus</i>	2 kb	a	a
PHILOSCIIDAE			
<i>Atlantoscia floridana</i>	-	<b>1,5 kb</b>	a
<i>Chaetophiloscia elongata</i>	-	-	1,7 kb
PLATYARTHRIDAE			
<i>Trichorhina tomentosa</i>	2 kb	a	a
PORCELLIONIDAE			
<i>Porcellio cingendus</i>	2 kb	-	1,7 kb
<i>Porcellio dilatatus dilatatus</i>	-	a	a
<i>Porcellio dilatatus petiti</i>	-	a	a
<i>Porcellio laevis</i>			1,7 kb
TYLIDAE			
<i>Helleria brevicornis</i>	-	a	a



**Figure VI-5 :** Exemple d'amplification PCR sur une portion du génome mitochondrial entre les gènes *16SARNr* (amorce IIIIF) et *Cox1* (amorce IIIR). M représente le marqueur de taille (Smart Ladder - Eurogentec) et T- le témoin négatif. Les espèces sont *Armadillo officinalis* (Armadillidae), *Armadillidium vulgare* (Armadillidiidae), *Oniscus asellus* (Oniscidae) et *Ligia oceanica* (Ligiidae).

Ces expériences préliminaires ont fourni peu de résultats exploitables. Sur les trois régions de l'ADNmt et les 17 espèces étudiées, seules deux espèces présentent vraisemblablement des signes de réarrangements. Le tableau VI-2 présente les résultats obtenus par PCR sur ces trois régions. Pour la première portion d'ADNmt, comprise entre la sous-unité ribosomale *16SARNr* et le gène *Cox1*, très peu d'amplifications ont été obtenues. Ceci peut être la conséquence soit d'une divergence des séquences à l'emplacement des amorces, soit d'un réarrangement ou d'un changement d'orientation des gènes, ne permettant pas d'obtenir une amplification. Mais comme nous n'avons pas réussi à amplifier cette région pour de nombreuses espèces, il est très probable que ce soit des divergences des séquences nucléotidiques à l'emplacement des amorces qui n'aient pas permis ces amplifications. En revanche, parmi les espèces présentant une amplification, l'espèce *Armadillo officinalis* (Armadillidae) présente une bande deux fois plus petite que celles obtenues avec les témoins *A. vulgare* et *L. oceanica* (1 kb au lieu de 2 : figure VI-5). Après avoir séquencé cette amplification et soumis la séquence sur NCBI, nous avons bien retrouvé les gènes *16SARNr* et *Cox1*, mais pas le gène *Nad2* qui se trouve ordinairement entre ces deux gènes chez les Isopodes (Marcadé *et al.* 2007). Nous pouvons en déduire alors que ce gène *Nad2* a changé de place dans le génome mitochondrial d'*A. officinalis*.

Pour la seconde région mitochondriale que nous avons étudiée, comprise entre le gène *Cox3* et la sous-unité ribosomale *12SARNr*, nous avons eu beaucoup d'amplifications multiples non spécifiques (tableau VI-2). Il est donc difficile de savoir si cette région a subi des réarrangements chez les Oniscidea. Seule l'espèce *Atlantoscia floridana* présente une seule amplification, d'une taille de 1,5 kb, inférieure à celles obtenues chez *A. vulgare* et *L. oceanica* (2,5 kb). Malheureusement nous n'avons pas réussi à séquencer le produit de cette amplification et nous ne savons pas encore s'il s'agit bien d'un réarrangement génique.

Enfin, pour la troisième portion de l'ADNmt des Oniscidea, comprenant les gènes *Nad5* et *Nad4*, la majorité des espèces ne présente qu'une seule amplification d'une taille identique à celle des témoins : ces deux gènes semblent être restés l'un à côté de l'autre et dans la même orientation chez l'ensemble des Oniscidea.

Ces premiers résultats apportent donc assez peu de données nouvelles, mais suggèrent néanmoins que la synténie mitochondriale chez les Oniscidea est peut-être moins conservée que ce que l'on pensait. La méthode et les amorces utilisées pour ces amplifications ne semblent pas très adaptées pour cette analyse. Cela peut venir du taux d'évolution rapide des séquences d'ADNmt des Oniscidea, comme cela a été mentionné précédemment lors d'études phylogénétiques (Michel-Salzat & Bouchon 2000; Wetzler 2002). Néanmoins, nous pouvons

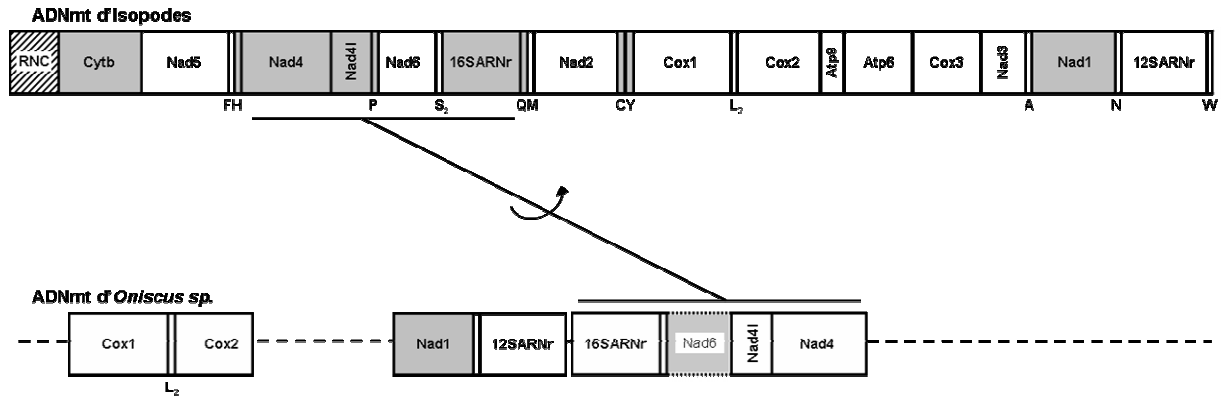
voir dans le tableau VI-2 qu'une, voire deux espèces, semblent présenter un réarrangement de leur synténie mitochondriale : *Armadillo officinalis* et *Atlantoscia floridana*. Malheureusement, nous ne connaissons pas la structure de l'ADNmt de ces espèces. Nous ne savons pas donc si ces réarrangements se seraient produits dans des génomes mitochondriaux à la structure classique ou atypique. Enfin, nous n'avons pas confirmé la présence de réarrangement de gènes dans le genre *Oniscus*, comme l'avaient trouvé Roehrdanz *et al.* (2002).

## 2. Mécanismes des réarrangements de l'ordre des gènes

Chez les Métazoaires, les réarrangements de l'ordre des gènes mitochondriaux sont fréquents. L'accumulation de séquences d'ADNmt ces dernières années a permis d'étudier ce phénomène et dorénavant il est largement admis qu'un phénomène particulier est à l'origine de ces réarrangements : le mécanisme de « duplication + perte aléatoire ». Ce phénomène se caractérise par une duplication, qu'elle soit totale ou partielle, en tandem ou en opposition, suivi de la perte aléatoire d'une copie de chacun des gènes dupliqués (Macey *et al.* 1998; Boore 2000). Ce modèle suppose donc une absence de pression de sélection pour le maintien des deux copies de chacun des gènes.

Cette théorie peut-elle s'appliquer aux Oniscidea ? Dans le génome mitochondrial atypique, présent chez un grand nombre d'Oniscidea, il existe une molécule « naturellement » dimérisée. Ces dimères pourraient alors être impliqués dans des réarrangements. De tels réarrangements de gènes suite à une dimérisation complète du génome mitochondrial ont déjà été proposés chez d'autres Arthropodes (Lavrov *et al.* 2002).

Pour vérifier l'hypothèse de l'implication des dimères dans d'éventuels réarrangements de gènes mitochondriaux chez les Oniscidea, nous n'avons pas obtenu assez de résultats. Nous venons de voir que des changements de synténie se sont probablement produits chez deux espèces d'Oniscidea, *A. officinalis* et *A. floridana*, mais nous ne connaissons pas la structure de leur ADNmt. En revanche, nous pouvons nous intéresser au résultat obtenu par Roehrdanz *et al.* (2002) pour un *Oniscus sp.* Ces auteurs ont en effet observé une suite de gènes *Nad1-12SARNr-16SARNr-Nad6-Nad4L-Nad4* chez cette espèce non déterminée. Cette suite de gènes ne se retrouve pas dans les génomes séquencés des Isopodes *I. baltica*, *L. oceanica* et *A. vulgare*. Nous avons donc analysé cette séquence de gènes et tenté d'expliquer les étapes nécessaires pour passer de l'ordre des gènes d'origine (celui observé chez les trois Isopodes) à cette suite de gènes observée par Roehrdanz *et al.* (2002). En comparant ces deux génomes (figure VI-6), nous avons déterminé qu'il fallait



**Figure VI-6 :** Représentation schématique du réarrangement génique observé chez un *Oniscus* sp. par Roehrdanz *et al.* (2002). En haut est représenté l'ordre des gènes mitochondriaux observé chez les Isopodes *A. vulgare*, *L. oceanica* et *I. baltica*, et en bas l'ordre des gènes observé chez un *Oniscus* sp. (Roehrdanz *et al.* 2002). La flèche désigne le changement d'orientation et de localisation du groupe de gène 16SARNr – Nad6 – Nad4L – Nad4.

deux étapes pour obtenir la synténie observée chez l'*Oniscus sp.* : (i) un changement d'orientation du groupe de gène *Nad4-Nad4L-Nad6-16SARNr* par rapport au reste du génome et (ii) un changement de brin de ce même groupe de gène. Pour obtenir un tel changement dans un génome dupliqué en tandem (avec des jonctions de type « tête-queue »), ces deux étapes devraient se faire séparément. En revanche, dans un génome dupliqué présentant des dimères de type palindromiques, comme ceux que l'on observe dans les génomes atypiques des Oniscidea (avec des jonctions « tête-tête »), un seul événement de réarrangement est nécessaire (figure VI-6).

Dans le cas de cet *Oniscus sp.* décrit par Roehrdanz *et al.* (2002), nous ne savons pas s'il s'agit d'une espèce qui possède un génome mitochondrial atypique. Il est cependant possible que cela soit le cas s'il s'agit réellement d'une espèce du genre *Oniscus*. Nous avons démontré dans ce chapitre que l'espèce *Oniscus asellus* présente bien un ADNmt atypique. De plus, nous avons aussi démontré que le génome mitochondrial atypique de l'espèce *Oniscus asellus* présente une taille totale de ~48 kb, soit 3x~16 kb, ce qui correspond à une augmentation de la taille de ~2 kb par monomère par rapport aux autres Oniscidea au génome atypique (Doublet *et al.* en prép.). Dans le cadre de réarrangements géniques, il a justement été démontré qu'une augmentation de la taille du génome peut être la conséquence de ce mécanisme de duplication + perte aléatoire, due à la présence de copies de gènes non fonctionnelles (pseudogènes) qui n'ont pas encore été éliminées par la sélection (Macey *et al.* 1998; San Mauro *et al.* 2006; Fujita *et al.* 2007). Evidemment, pour l'instant aucune donnée ne confirme les liens entre l'augmentation de la taille du génome mitochondrial d'*Oniscus asellus*, l'observation d'un nouvel ordre génique et la présence de pseudogènes. D'ailleurs nous n'avons pas retrouvé chez *Oniscus asellus* le même ordre des gènes observé par Roehrdanz *et al.* (2002). Cependant, si l'*Oniscus sp.* de Roehrdanz *et al.* (2002) possède bien un ADNmt atypique, nous pourrions imaginer que ce réarrangement se soit réalisé en une seule étape, par duplication + perte aléatoire, à partir d'un dimère d'ADNmt palindromique, comme cela est représenté dans la figure VI-6.

Néanmoins, si des réarrangements géniques se font grâce à la dimérisation, il faudra éclaircir un point important : est-il possible qu'une perte aléatoire de gène se produise sur un dimère et que l'ADNmt reste sous la conformation atypique (dimères + monomères) ? En effet, on peut se demander ce que devient le dimère s'il y a une perte de gènes : la disparition d'une copie de chacun des gènes d'un dimère conduira à la formation d'un monomère à la synténie différente. Ainsi, soit le génome perd sa structure atypique, soit le génome retrouve une structure atypique à partir de ce nouveau monomère possédant une nouvelle synténie.

## **D. Conclusions**

Dans cette troisième partie, nous avons montré que la structure atypique du génome mitochondrial observée chez *A. vulgare* et *P. pruinosis* est également présente chez un très grand nombre d'Oniscidea. A l'heure actuelle, seule l'espèce *L. oceanica* a été observée avec un génome mitochondrial de type classique, présentant seulement des molécules circulaires monomériques.

Nous avons également démontré en élargissant cette étude à deux espèces d'Isopodes aquatiques non-Oniscidea que la structure atypique du génome mitochondrial pouvait être largement répandue chez les Isopodes. En effet, nous avons découvert que cette structure atypique existait également chez l'espèce d'eau douce *Asellus aquaticus* (Asellota). Cette observation est à mettre en parallèle avec la probable présence d'un ADNmt atypique chez une espèce d'Isopode marin *Idotea baltica*, dont le génome mitochondrial n'a pas pu être séquencé entièrement.

En revanche, l'observation d'un ADNmt de type classique chez l'Isopode marin *Sphaeroma serratum*, ainsi que chez *L. oceanica*, suppose que des événements de réversion ou de convergence de la structure atypique de l'ADNmt ont eu lieu au cours de l'évolution des Isopodes.

La forte corrélation observée entre la présence d'ADNmt atypique et la présence de l'hétéroplasmie sur le gène de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> suggère également que les deux phénomènes sont liés. Ainsi, nous pensons que la mise en place de la structure atypique de l'ADNmt des Isopodes est l'étape cruciale qui a permis l'apparition de l'ARNt bivalent chez les Oniscidea. De plus, il est probable que cette hétéroplasmie soit ensuite devenue un facteur de maintien de la structure atypique chez ces espèces.

Enfin, nous avons discuté dans cette partie d'une possible évolution de l'ordre des gènes mitochondriaux dans les génomes d'Oniscidea. A partir de résultats préliminaires, ainsi que de données issues de la littérature, il semblerait que quelques espèces d'Oniscidea ne présentent pas le même ordre des gènes qu'*A. vulgare* et *L. oceanica*. Toutefois, nous ne connaissons pas la structure de l'ADNmt de ces espèces. Il serait donc intéressant de poursuivre cette analyse afin de voir si les dimères d'ADNmt des Oniscidea peuvent être des catalyseurs de réarrangements géniques.

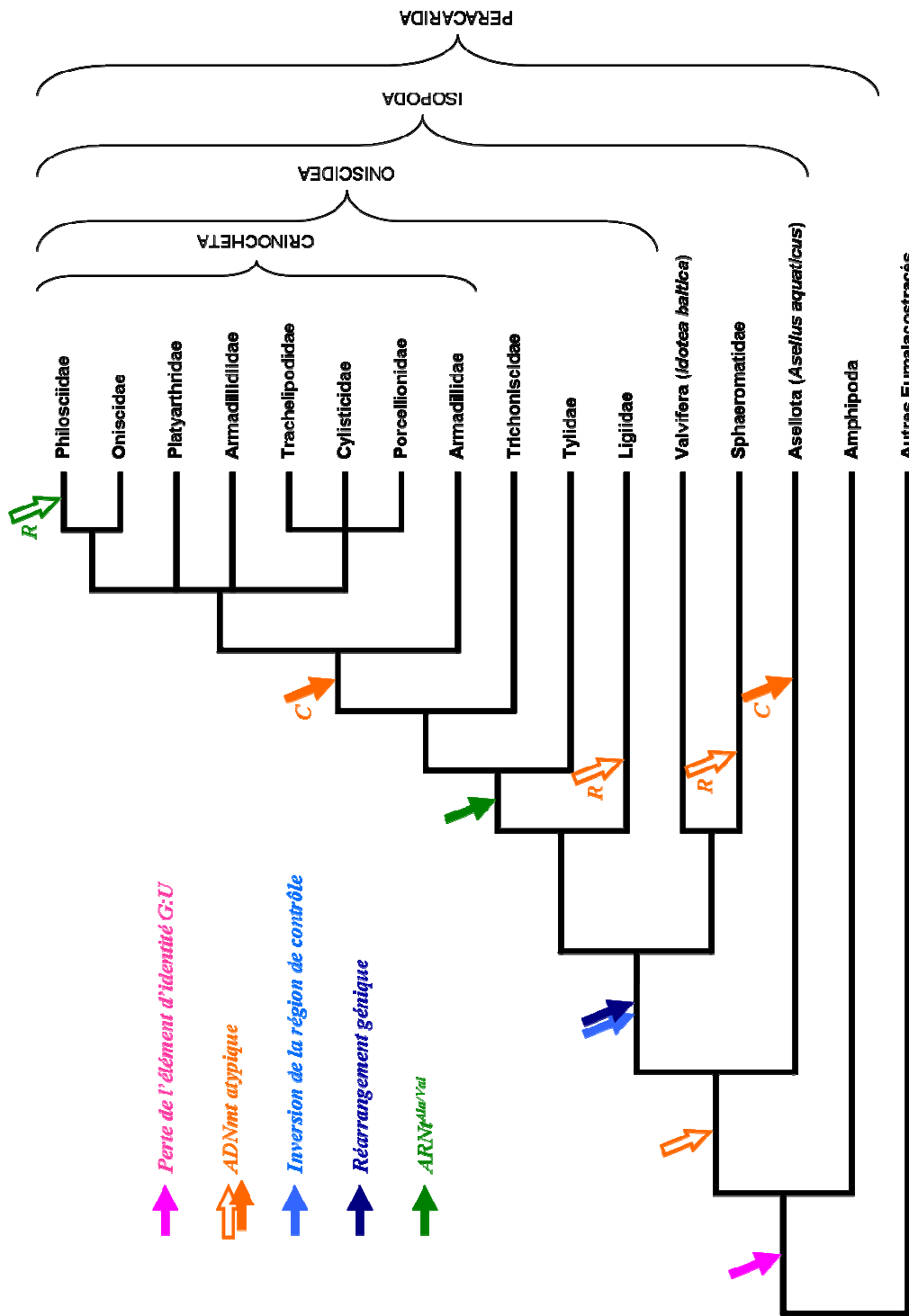


## VII. Reconstruction de l'histoire évolutive de l'ADNmt atypique des Oniscidea

L'étude de l'ADNmt atypique des Isopodes, et plus particulièrement celui des Oniscidea, a mis à jour plusieurs originalités dans la structure et la composition de ces génomes. L'accumulation de telles particularités ne paraît pas fortuite. Il existe de toute évidence des liens de causes à effet entre ces spécificités propres aux Isopodes. Après avoir décrit et commenté chacune de ces caractéristiques dans les chapitres précédents, il paraît indispensable de retracer l'histoire évolutive de ce génome mitochondrial unique en recherchant la succession des étapes qui ont conduit à l'existence de cet ADNmt atypique.

### ***A. Apparition du génome mitochondrial atypique***

Il est difficile dans l'état actuel des résultats de définir avec certitude quel est le caractère le plus ancien parmi tous les caractères originaux observés dans l'ADNmt atypique des Isopodes. Toutefois, nous savons que l'apparition de la structure atypique, composée de dimères circulaires et de monomères linéaires, doit être parmi les plus anciens. L'observation de cette structure chez l'Isopode aquatique *Asellus aquaticus* (Asellota) témoigne de la présence très probable de l'ADNmt atypique chez l'ancêtre commun des Asellota et des Oniscidea il y a au moins 250 millions d'années (âge du plus ancien fossile d'Asellota connu à ce jour, Wilson 1999). Cette datation est une estimation minimum, et l'ADNmt atypique peut être encore plus ancien, mais pour le moment l'échantillonnage réalisé ne permet pas de définir très précisément quand serait apparue cette structure. Une seule certitude sur la datation de cette structure atypique est qu'elle ne dépasse certainement pas le super-ordre des Péracarides. En effet, une trentaine de génomes mitochondriaux ont été séquencés et analysés parmi les autres super-ordres d'Eumalacostracés (Eucarides et Hoplocarides), et aucun n'a révélé la présence de ce type d'ADNmt. Chez les Péracarides, les données accessibles dans la littérature sont beaucoup plus fragmentaires. En réalité, seul le séquençage complet du génome mitochondrial de type classique de l'Amphipode *Metacrangonyx longipes* (Bauzá-Ribot *et al.* 2009) indique que l'ADNmt atypique n'est pas présent chez cette espèce. Cependant, nous avons vu qu'au cours de l'évolution des Isopodes ont eu lieu vraisemblablement des phénomènes de réversions vers un ADNmt classique, ou de convergence de l'apparition de l'ADNmt atypique, avec la présence d'ADNmt classique chez



**Figure VII-1 :** Reconstruction de l'histoire évolutive de l'ADNmt des Oniscidea. Les différentes caractéristiques relevées dans l'ADNmt des Oniscidea et des Isopodes sont placées sur cet arbre phylogénétique composé à l'aide des données issues de la littérature (Michel-Salzat & Bouchon 2000; Mattern 2003; Schmidt 2008; Wilson 2009 - voir annexe 15). Deux scénarii sont proposés pour l'apparition de l'ADNmt atypique : (i) une apparition avant la divergence des sous-ordres des Asellota et des Oniscidea, suivie d'une réversion (R) chez *S. serratum* (Sphaeromatidae) et *L. oceanica* (Ligiidae), notée par des flèches orange vides ; et (ii) deux apparitions convergentes (C) de l'ADNmt atypique chez les Asellota et les Oniscidea Crinocheta, notées par une flèche orange pleine. La réversion de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> chez les Philosciidae est notée par une flèche verte vide accompagnée de la lettre R.

les espèces *Ligia oceanica* et *Sphaeroma serratum* (Doublet *et al.* en prép.) – voir figure VII-1. Ainsi, nous ne pouvons pas totalement écarter l'hypothèse de la présence d'ADNmt atypique chez certains Péracarides.

En ce qui concerne les causes et les conditions dans lesquelles est apparu le génome mitochondrial atypique, il semble cohérent que la création des dimères palindromiques qui composent ces génomes soit dépendante de l'apparition des monomères linéaires. En effet, quel que soit le mécanisme impliqué dans l'élaboration des dimères - par réplication ou bien par association (cf. chapitre précédent) – les monomères linéaires semblent être obligatoires pour former les dimères. Ainsi, l'apparition au cours de l'histoire évolutive des Isopodes des monomères linéaires d'ADNmt, autrement dit la linéarisation de la forme classique monomère circulaire, est une étape préalable à la construction des dimères palindromiques. Comme nous l'avons vu précédemment, la linéarisation des génomes mitochondriaux est assez courante chez les plantes et les unicellulaires, mais restreinte aux Cnidaires et aux Isopodes chez les animaux. Cependant, Nosek & Tomáška (2003) ont remarqué une caractéristique commune à tous ces génomes mitochondriaux linéaires : la présence de structures répétées inversées à leurs extrémités. Ces séquences, dont l'origine n'est pas connue – Nosek & Tomáška (2003) mentionnent la probable insertion d'éléments génétiques mobiles – pourraient être impliquées dans la linéarisation de ces génomes. Le séquençage du génome mitochondrial d'*A. vulgare*, et principalement l'obtention de la principale région non codante où a lieu la linéarisation et la dimérisation, a mis en évidence une telle séquence, formant une structure secondaire en épingle à cheveux d'une trentaine de paires de bases. Même si nous ne sommes pas certains qu'elle soit impliquée dans l'élaboration de la conformation atypique du génome, il est assez intéressant d'observer que cette structure secondaire n'est pas présente dans le génome mitochondrial de type classique de l'Oniscidea *L. oceanica* (Kilpert & Podsiadlowski 2006). Nous pouvons donc imaginer que cette structure peut jouer un rôle dans la formation des molécules linéaires et des dimères.

De telles séquences répétées inversées dans un génome ont été soupçonnées d'être à l'origine de la formation de dimères d'ADN circulaires et palindromiques, via la formation de structures secondaires en épingle à cheveux (Bi & Liu 1996; Lin *et al.* 1997; Lyu *et al.* 1999). Cette hypothèse a également été développée par Dinouël *et al.* (1993) pour expliquer, à l'aide d'un modèle, la présence de monomères linéaires et de dimères circulaires dans les mitochondries de levures. Un tel système dynamique est donc possible pour l'ADNmt atypique des Isopodes. Cependant, cette hypothèse mérite d'être soutenue par d'autres résultats.

## **B. Nouvelle organisation du génome**

L'apparition du génome mitochondrial atypique il y a quelques centaines de millions d'années a visiblement été accompagnée par deux autres phénomènes : un réarrangement génique aboutissant à un nouvel ordre des gènes et une inversion de l'orientation de l'origine de réplication de l'ADNmt inversant également le biais de composition nucléotidique brin-spécifique. Les conséquences de ces deux phénomènes s'observent chez les trois génomes mitochondriaux d'Isopodes actuellement séquencés : l'Isopode marin Valvifère *Idotea baltica*, et les Oniscidea *A. vulgare* et *L. oceanica*. Malheureusement, nous n'avons pas d'information sur l'ordre des gènes d'autres espèces d'Isopodes, tel qu'*Asellus aquaticus* (*Asellota*). En revanche, cet ordre des gènes particulier ne se retrouve pas dans les génomes mitochondriaux des Amphipodes (Péracarides) *M. longipes* et *Parhyale hawaiiensis*. Ceci nous permet de situer au minimum ces deux événements avant la divergence des sous-ordres des Valvifères et des Oniscidea (figure VII-1) mais il est possible également que ces événements aient eu lieu plus tôt, avant l'émergence des Isopodes par exemple.

Même si ces deux phénomènes de réarrangement géniques et d'apparition de l'ADNmt atypique ont eu lieu chez les Isopodes à peu près au même moment, il est difficile de dire s'ils sont liés. Il est évidemment troublant que les deux phénomènes d'inversion de l'origine de réplication et de linéarisation-dimérisation de l'ADNmt aient eu lieu dans la même région non codante, à peu près au même moment de l'évolution des Isopodes. Toutefois, les phénomènes de réarrangements géniques et d'inversion de l'origine de réplication sont des événements relativement communs dans les génomes mitochondriaux. Il apparaît donc difficile de faire un lien entre ces événements, si proche dans le temps soient-ils.

## **C. Apparition d'une hétéroplasmie : l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>**

### **1. Une hétéroplasmie stable**

La nouveauté génétique la plus originale observée dans les génomes mitochondriaux atypiques est la présence chez un grand nombre d'Oniscidea d'une hétéroplasmie générant deux gènes différents sur le même locus : l'ARNt<sup>Ala</sup> et l'ARNt<sup>Val</sup>. Nous ne savons pas précisément à quel moment est apparue cette hétéroplasmie. Cependant, l'échantillonnage sur lequel ont été réalisées les amplifications de ces ARNt a permis de montrer qu'une grande majorité des Oniscidea possède cet ARNt bivalent : nous avons donc estimé cette hétéroplasmie à au moins 30 millions d'années, date de la divergence des principales familles

d'Oniscidea (figure VII-1). En revanche, nous ne savons si d'autres espèces au génome mitochondrial atypique, comme *Asellus aquaticus* (Isopoda, Asellota), possèdent également cet ARNt bivalent. Nous avons montré néanmoins que les génomes mitochondriaux des espèces *L. oceanica* (Ligiidae) et *Dynamene bidentata* (Sphaeromatidae – Isopode aquatique) ne le portent pas.

Cet ARNt bivalent est le premier exemple de locus mitochondrial portant deux gènes différents. De cette constatation, nous pouvons en déduire que la structure atypique de l'ADNmt des Oniscidea, et en particulier ses dimères, ont certainement été nécessaires à l'apparition de cette hétéroplasmie : les dimères pourraient permettre la présence de deux ARNt différents sur le même locus. Ce serait d'ailleurs en bénéficiant de cette structure atypique que cette hétéroplasmie a pu se maintenir et se transmettre, en évitant la réduction du nombre de molécules d'ADNmt lors de l'ovogenèse. Comme nous l'avons proposé, les dimères pourraient être des vecteurs de l'hétéroplasmie.

Consécutivement, il est possible que cette hétéroplasmie soit ensuite devenue un facteur de maintien de la structure atypique. En effet, nous avons démontré que cette hétéroplasmie est constitutive du génome mitochondrial atypique de certaines espèces et permet le positionnement de deux gènes essentiels à la traduction mitochondriale sur le même locus. Cette hétéroplasmie apparaît donc indispensable lorsque qu'aucun autre ARNt<sup>Val</sup> n'apparaît dans le génome mitochondrial, comme dans le cas d'*A. vulgare*. Devenue alors obligatoire et vraisemblablement liée à la présence de l'ADNmt atypique, cette hétéroplasmie pourrait être une des causes du maintien des dimères dans les génomes atypiques. Mais ceci ne peut être possible que si les dimères possèdent les deux ARNt différents, sur chacun des monomères qui les composent. Si tel est le cas, l'hétéroplasmie représenterait alors une contrainte pour le maintien de la forme dimérique, et seul un retour à deux gènes d'ARNt séparés dans le génome permettrait un retour vers une forme classique de l'ADNmt.

Si nous acceptons cette hypothèse de l'apparition de l'hétéroplasmie via les dimères d'ADNmt, nous pouvons alors imaginer que d'autres hétéroplasmies aient pu apparaître au cours de l'évolution des Oniscidea. C'est d'ailleurs une hypothèse qui peut être évoquée pour expliquer la présence de l'ADNmt atypique chez les Oniscidea *Philoscia muscorum* et *Chaetophiloscia elongata* dont les génomes ne présentent pas d'ARNt bivalent Alanine/Valine. Toutefois, seules des hétéroplasmies permettant l'apparition d'une nouvelle fonction semblent susceptible de s'installer. En effet, dans le cas d'un gène codant pour une protéine, une mutation non synonyme sur l'une des deux copies du dimère entraînerait une compétition entre les deux protéines différentes. Ce phénomène de compétition créerait alors

l'apparition de pseudogènes dans le génome : le gène le moins compétitif ne serait pas retenu par la sélection. Or, ceci n'a pas été observé dans le génome d'*A. vulgare*. En revanche, dans le cas de l'hétéroplasmie sur l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>, le gène de l'ARNt<sup>Ala</sup> a acquis une seconde fonction d'ARNt<sup>Val</sup> suite à la mutation de l'anticodon de l'une de ses deux copies. Ainsi, avec une fonction différente, en aucun cas ces deux formes n'entrent en compétition dans la mitochondrie. Ceci restreint alors les hétéroplasmies stables aux seuls gènes d'ARNt, puisqu'il est peu probable que les gènes mitochondriaux codants pour des protéines et les deux sous-unités ribosomales puissent acquérir une nouvelle fonction par le biais d'une simple mutation.

## 2. Des conditions réunies pour la formation d'un ARNt bivalent

Pour que cette hétéroplasmie particulière ait pu voir le jour, il fallait non seulement l'apparition préalable de la structure atypique du génome mitochondrial, comme cela a été mentionné précédemment, mais il était nécessaire que les deux gènes d'ARNt, pour l'Alanine et la Valine, puissent cohabiter et que leurs éléments d'identités n'entrent pas en conflit. Or, nous avons vu dans le chapitre V que les éléments d'identités de ces deux ARNt ne sont pas compatibles : si l'élément d'identité de l'ARNt<sup>Val</sup> est généralement l'anticodon, l'élément d'identité principal de l'ARNt<sup>Ala</sup> est une paire G:U présente dans le bras accepteur. Cette paire de bases est incompatible avec un autre ARNt, car, comme cela a été démontré expérimentalement, tout ARNt possédant une paire G:U se trouve aminoacylé par un acide aminé Alanine, quel que soit son anticodon (McClain & Foss 1988; Francklyn & Schimmel 1989; Shi *et al.* 1992).

En comparant les génomes mitochondriaux des espèces *L. oceanica* et *A. vulgare*, il est évident que c'est l'ARNt<sup>Val</sup> qui est apparu sur l'ARNt<sup>Ala</sup>. Nous pouvons voir que le gène de l'ARNt<sup>Ala</sup> n'a pas changé de place entre ces deux espèces. De plus les ARNt<sup>Ala</sup> de ces deux espèces ont une partie de leur séquence identique, constituée du bras « D » et d'une partie du bras de l'anticodon (annexe 14). Lors de son changement de position dans le génome, la persistance de l'élément d'identité G:U n'aurait jamais permis l'installation du gène de l'ARNt<sup>Val</sup> sur le gène de l'ARNt<sup>Ala</sup>, comme cela s'est produit chez ces Oniscidea. Mais comme on a pu le voir chez les Crustacés (chapitre V), la paire G:U est absente des ARNt<sup>Ala</sup> mitochondriaux de certains espèces. C'est le cas de Décapodes (Hickerson & Cunningham 2000; Segawa & Aotsuka 2005; Ivey & Santos 2007; Yang & Yang 2008; Ki *et al.* 2009a), des Cirripèdes du genre *Pollicipes* (Lavrov *et al.* 2004; Lim & Hwang 2006) et du Branchioure *Argulus americanus* (Lavrov *et al.* 2004). Ce défaut de paire G:U se retrouve

également chez les cinq espèces du super-ordre des Péracarides dont le génome mitochondrial a été séquencé : les Amphipodes *P. hawaiiensis* et *M. longipes*, et les Isopodes *I. baltica*, *L. oceanica* et *A. vulgare*. La perte de cet élément d'identité G:U, qui a permis l'apparition de l'hétéroplasmie au niveau de l'anticodon, semble donc antérieure à la divergence des Péracarides et certainement antérieure à l'apparition du génome mitochondrial atypique (figure VII-1).

Le mécanisme impliqué dans le déplacement du gène de l'ARNt<sup>Val</sup> dans le génome des Oniscidea est bien connu : c'est un phénomène de recrutement d'ARNt, se produisant par une ou deux mutations au niveau de l'anticodon de l'ARNt receveur, suivies de la délétion de l'ARNt d'origine (Lavrov & Lang 2005). Dans le cas original de l'ARNt bivalent, la mutation de la seconde base de l'anticodon d'une des copies de l'ARNt<sup>Ala</sup> a ensuite été suivie de la délétion de l'ARNt<sup>Val</sup> d'origine. Ce phénomène est d'autant plus facilité chez les Métazoaires (et chez les Crustacés en ce qui concerne l'ARNt<sup>Ala</sup>) que certains ARNt mitochondriaux ne possèdent pas beaucoup d'éléments d'identités autres que leur anticodon (Rawlings *et al.* 2003).

#### **D. Les dimères d'ADNmt catalyseurs de réarrangements ?**

Outre les changements de localisation de gènes d'ARNt qui, comme dans l'exemple présent des Oniscidea, sont particulièrement courants dans les génomes mitochondriaux des Arthropodes (Lavrov & Lang 2005; Gissi *et al.* 2008; Dowton *et al.* 2009), nous avons vu également que des réarrangements géniques majeurs ont pu avoir lieu dans les génomes mitochondriaux au cours de l'évolution des Oniscidea. Même si cette hypothèse se base sur des observations préliminaires réalisées dans cette étude, ainsi que sur des données de la littérature très incomplètes à propos d'une espèce d'*Oniscus* indéterminée (Roehrdanz *et al.* 2002), il est intéressant de voir que l'ADNmt des Oniscidea peut changer de synténie. Toutefois, nous ne savons pas encore si les dimères présents dans les génomes mitochondriaux atypique des Oniscidea sont impliqués dans la modalité et la fréquence de ces réarrangements. En revanche, nous pouvons nous interroger sur le mécanisme impliqué dans ces réarrangements.

Le mécanisme le plus souvent évoqué dans les réarrangements de gènes est le modèle appelé « duplication + perte aléatoire ». Ce mécanisme aurait pu agir au sein de l'ADNmt atypique des Isopodes. Mais, si la dimérisation de l'ADNmt ressemble en effet à une duplication, nous avons cependant démontré que (i) ces dimères sont stables et que les deux copies de chacun des gènes ne semblent pas en voie de délétion, et (ii) que ces dimères sont

sans doute impliqués dans un système dynamique avec les monomères, permettant de passer d'une forme à l'autre, homogénéisant ainsi leurs séquences. Néanmoins nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que les dimères aient joué ponctuellement un rôle dans les réarrangements géniques dans l'ADNmt des Oniscidea. De plus amples investigations sur ce sujet sont donc nécessaires. Nous pourrions ainsi savoir si l'ADNmt atypique des Oniscidea est plus stable, en termes de synténie, que les ADNmt classiques des Métazoaires.



## VIII. Conclusion & perspectives

Les deux objectifs principaux de ce travail étaient d'une part de décrire la structure du génome mitochondrial atypique d'*A. vulgare* ainsi que ses caractéristiques, et d'autre part de reconstruire l'histoire évolutive de cet ADNmt, en recherchant son origine et celle de ses particularités.

Après la description de la structure de l'ADNmt atypique d'*A. vulgare* et de ses deux types moléculaires, les dimères circulaires et les monomères linéaires (Raimond *et al.* 1999), le séquençage de ce génome a été entrepris pour connaître sa composition génique et nucléotidique et pour comprendre comment se forment ces deux types de molécules.

Ainsi, grâce à la séquence de l'ADNmt d'*A. vulgare* nous avons pu observer que ce génome atypique comporte les mêmes gènes codants que la majorité des eucaryotes, mais qu'en revanche, ses gènes d'ARNt ne semblent pas tous présents. Seuls 18 séquences d'ARNt ont été identifiées dont 10 ont été confirmées par RT-PCR. Nous ne savons pas réellement combien il y a de gènes d'ARNt présents dans l'ADNmt d'*A. vulgare*, mais il semble très probable que les 22 ARNt attendus ne soient pas présents. Dans ce cas, trois hypothèses ont été émises : (i) soit ces ARNt, indispensables à la traduction, sont importés depuis le génome nucléaire vers les mitochondries, (ii) soit ils sont édités à partir d'une portion de séquence d'ADNmt, (iii) soit il existe d'autres ARNt bivalents similaires à l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> qui compenseraient l'absence de certains de ces gènes. La première hypothèse, régulièrement mentionnée chez les Arthropodes, paraît être la plus probable. Toutefois, cela n'a jamais été démontré chez ces animaux. Il apparaît donc essentiel de le vérifier, non seulement dans le cadre du modèle particulier de l'ADNmt des Isopodes, mais également afin de tester si l'import d'ARNt du noyau existe vraiment chez les Arthropodes. Pour cela, il faudra réaliser une analyse de la provenance des ARNt contenus dans les mitochondries de cloportes.

Parmi les ARNt que nous avons identifiés chez *A. vulgare*, le plus surprenant fut la découverte de l'ARNt bivalent alloccepteur pour l'Alanine et la Valine. La présence de ces deux gènes sur le même locus mitochondrial est un cas unique chez les Métazoaires. Nous avons vu, de plus, que l'hétéroplasmie qui résulte de la mutation sur la seconde base de l'anticodon de cet ARNt, est transmise obligatoirement à tous les descendants. Cette hétéroplasmie, que nous avons datée à plus de 30 millions d'années, suite à sa découverte chez d'autres espèces d'Oniscidea, doit être le résultat d'une sélection balancée favorisant la présence des deux ARNt essentiels à la traduction dans les mitochondries. Néanmoins, si nous

pensons que la présence de cette hétéroplasmie est en lien avec la structure atypique de l'ADNmt, nous ne savons pas encore comment cette transmission est rendue possible. Les futures investigations tenteront de mettre en évidence la présence des ARNt Alanine et Valine sur le même dimère. Pour cela, il faudra cloner des dimères et obtenir les séquences des deux ARNt présents sur ces locus pour chacune de ces molécules. Cela permettra de savoir si ces dimères sont des vecteurs d'hétéroplasmie chez les Oniscidea et si cette hétéroplasmie peut être un des facteurs de maintien de la structure atypique.

Toujours dans cette étude de l'ARNt bivalent, nous avons confirmé l'expression des deux ARNt Alanine et Valine. En revanche, nous n'avons pas encore démontré que ces deux gènes sont bien utilisés comme tels. L'ambiguïté est d'autant plus importante que l'ARNt<sup>Ala</sup> ne possède pas l'élément d'identité G:U ordinairement présent sur ce gène. Des expériences de fonctionnalité de ces deux ARNt sont donc indispensables pour affirmer que l'hétéroplasmie est bien contrainte par la nécessité de ces gènes dans la mitochondrie. De plus, ces expériences de fonctionnalité de l'ARNt<sup>Ala</sup> nous permettront de connaître le nouvel élément d'identité de ce gène chez les Crustacés Péracarides.

Enfin, grâce au séquençage de l'ADNmt d'*A. vulgare*, nous avons pu observer que la linéarisation et la dimérisation des molécules se fait au niveau de la région de contrôle : partie non codante du génome. L'obtention de la séquence de cette région de contrôle nous a permis de localiser la boucle impliquée dans l'origine de la réplication. En plus de cette boucle, une seconde structure secondaire du même type a été observée. Nous ne connaissons pas encore sa fonction, mais deux hypothèses ont été formulées à propos de cette structure : (i) elle peut être la seconde origine de réplication du génome, connue pour être proche de la première chez les Insectes, ou bien (ii) cette structure pourrait intervenir dans la linéarisation et la dimérisation du génome, comme cela a été observé dans les génomes mitochondriaux linéaires des Cnidaires et de certaines levures. Cette dernière hypothèse est particulièrement intéressante puisque cette structure particulière n'a pas été observée dans le génome mitochondrial de type classique de l'Oniscidea *Ligia oceanica*. Néanmoins, cette hypothèse doit être vérifiée. Pour cela le séquençage des zones de jonction des dimères d'ADNmt d'*A. vulgare*, et celui de la région de contrôle d'autres génomes mitochondriaux atypiques sont nécessaires.

Le deuxième objectif de ce travail consistait à reconstruire l'histoire évolutive de l'ADNmt atypique des Isopodes. En recherchant chez plusieurs espèces les différentes caractéristiques qui composent ce génome, nous avons retracé en partie cette histoire. C'est ainsi que nous savons que la perte de l'élément d'identité G:U de l'ARNt<sup>Ala</sup>, partagée par

l'ensemble des Péracarides, est la particularité la plus ancienne que nous ayons observé. Ensuite est apparue, certainement lors de l'évolution des Isopodes, la structure atypique de l'ADNmt, avec ses monomères linéaires et ses dimères circulaires. Les analyses RFLP ont en effet montré que cette apparition semble antérieure à la divergence des Asellota et des Oniscidea. Toutefois nous ne sommes pas encore en mesure de dire si cet ADNmt atypique est apparu en une ou plusieurs fois. La présence d'ADNmt de type classique chez deux espèces d'Isopodes témoigne de la possibilité de réversions ou de convergences. De même, nous savons qu'un nouvel ordre de gènes est apparu dans le génome mitochondrial des Isopodes. Il est partagé par les espèces *A. vulgare*, *L. oceanica*, et *I. baltica*, et semble de plus être accompagné par une inversion de l'origine de réplication. Cependant notre échantillonnage ne nous permet pas de placer cet événement par rapport à l'apparition de l'ADNmt atypique. Enfin, nous avons démontré chez les Oniscidea l'apparition il y a au moins 30 millions d'années de l'ARNt bivalent alloaccepteur pour l'Alanine et la Valine, avant la divergence des principales familles actuelles.

Une telle reconstruction de l'histoire évolutive de l'ADNmt atypique des Isopodes peut être très utile pour reconstruire également leur histoire évolutive (Boore 2006). L'utilisation de ces caractères pourrait permettre de clarifier la phylogénie des Isopodes et des Péracarides qui encore très discutée (Brusca & Wilson 1991; Michel-Salzat & Bouchon 2000; Spears *et al.* 2005; Schmidt 2008; Wilson 2009; annexes 15 et 16). Pour cela, certains de ces caractères méritent une investigation plus importante. C'est le cas de l'ADNmt atypique, pour lequel nous ne savons pas suffisamment à quel point il peut être répandu chez les Isopodes (par exemple nous ne savons toujours pas si l'espèce *I. baltica* possède réellement un ADNmt atypique). Une recherche plus approfondie parmi les Isopodes aquatiques est donc nécessaire. Toujours dans un but phylogénétique, la comparaison de l'ordre des gènes mitochondriaux des Isopodes pourrait aussi être très utile. Pour cela, le séquençage de génomes mitochondriaux parmi les Isopodes, et plus particulièrement parmi les Oniscidea, serait judicieux. De plus, il serait indispensable de tirer profit du séquençage de l'ADNmt atypique de certains Oniscidea dans le cadre de l'étude du mécanisme de « duplication + perte aléatoire ». En effet, ces espèces peuvent constituer des modèles de choix pour une démonstration empirique de ce mécanisme.

## IX. Références bibliographiques

- Abascal F, Posada D, Knight RD & Zardoya R (2006a) Parallel evolution of the genetic code in arthropod mitochondrial genomes. *PLoS Biol* **4**(5):e127.
- Abascal F, Zardoya R & Posada D (2006b) GenDecoder: genetic code prediction for metazoan mitochondria. *Nucleic Acids Res* **34**(Web Server issue):W389-393.
- Adams KL & Palmer JD (2003) Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* **29**(3):380-395.
- Alonso J, Arillo A, Barron E, Corral JC, Grimalt JO, Lopez JF, Lopez R, Martinez-Delclos X, Ortuno V, Penalver E & Trincao PR (2000) A new fossil resin with biological inclusions in Lower Cretaceous deposits from Alava (northern Spain, Basque-Cantabrian Basin). *Journal of Paleontology* **74**(1):158-178.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17):3389-3402.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R & Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**(5806):457-465.
- Andersson SGE, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Pontén T, Alsmark UCM, Podowski RM, Nässtrand AK, Eriksson AS, Winkler HH & Kurland CG (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**(6707):133-140.
- Araujo PB & Bond-Buckup G (2005) Population structure and reproductive biology of *Atlantoscia floridana* (van Name, 1940) (Crustacea, Isopoda, Oniscidea) in southern Brazil. *Acta Oecologica* **28**:289-298.
- Armstrong MR, Blok VC & Phillips MS (2000) A multipartite mitochondrial genome in the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Genetics* **154**(1):181-192.
- Armstrong MR, Husmeier D, Phillips MS & Blok VC (2007) Segregation and recombination of a multipartite mitochondrial DNA in populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *J Mol Evol* **64**(6):689-701.
- Arunkumar KP, Metta M & Nagaraju J (2006) Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet Evol* **40**(2):419-427.
- Arunkumar KP & Nagaraju J (2006) Unusually long palindromes are abundant in mitochondrial control regions of insects and nematodes. *PLoS ONE* **1**:e110.

- Ashley MV, Laipis PJ & Hauswirth WW (1989) Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res* **17**(18):7325-7331.
- Atlan A & Couvet D (1993) A model simulating the dynamics of plant mitochondrial genomes. *Genetics* **135**(1):213-222.
- Attardi G (1985) Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. *Int Rev Cytol* **93**:93-145.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**(489-522).
- Avise JC (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu Rev Genet* **25**:45-69.
- Awata H, Noto T & Endoh H (2005) Differentiation of somatic mitochondria and the structural changes in mtDNA during development of the dicyemid *Dicyema japonicum* (Mesozoa). *Mol Genet Genomics* **273**(6):441-449.
- Backert S, Nielsen BL & Börner T (1997) The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends in Plant Science* **2**(12):477-483.
- Baldo L, Bordenstein S, Wernegreen JJ & Werren JH (2006) Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol Biol Evol* **23**(2):437-449.
- Baldo L, Ayoub NA, Hayashi CY, Russell JA, Stahlhut JK & Werren JH (2008) Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Mol Ecol* **17**(2):557-569.
- Ballard JW, Hatzidakis J, Karr TL & Kreitman M (1996) Reduced variation in *Drosophila simulans* mitochondrial DNA. *Genetics* **144**(4):1519-1528.
- Bandi C, Anderson TJ, Genchi C & Blaxter ML (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc Biol Sci* **265**(1413):2407-2413.
- Barr CM, Neiman M & Taylor DR (2005) Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytol* **168**(1):39-50.
- Barrell BG, Anderson S, Bankier AT, de Bruijn MH, Chen E, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R & Young IG (1980) Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(6):3164-3166.
- Batuecas B, Garesse R, Calleja M, Valverde JR & Marco R (1988) Genome organization of *Artemia* mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* **16**(14A):6515-6529.
- Baudry E, Bartos J, Emerson K, Whitworth T & Werren JH (2003) *Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. *Mol Ecol* **12**(7):1843-1854.

- Bauzà-Ribot MM, Jaume D, Juan C & Pons J (2009) The complete mitochondrial genome of the subterranean crustacean *Metacrangonyx longipes* (Amphipoda): A unique gene order and extremely short control region. *Mitochondrial DNA* **20**(4):88-99.
- Beckman KB & Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**(2):547-581.
- Ben Afia Hatira H, Charfi Cheikhrouha F & Bouchon D (2008) Preliminary results on the infection status of terrestrial isopods in Tunisia by bacteria of *Wolbachia* genus. *Proc. 7th Int. Symp. Terr. Isopod Biol.* (Tunis 2007). Pp. 117-123
- Bendall KE, Macaulay VA & Sykes BC (1997) Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots. *Am J Hum Genet* **61**(6):1303-1308.
- Bendich AJ (1993) Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. *Curr Genet* **24**(4):279-290.
- Bendich AJ (1996) Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *J Mol Biol* **255**(4):564-588.
- Benton MJ (1993) *The fossil record 2*. Chapman and Hall, London. Pp. 845
- Bergstrom CT & Pritchard J (1998) Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes. *Genetics* **149**(4):2135-2146.
- Bertaux J, Chevalier F, Braquart-Varnier C, Sicard M, Grève P & Bouchon D (2009) Vous vous en FISHez, des cloportes ? Pas *Wolbachia* ! *IMMUNINV : immunité des invertébrés* (21-23 octobre 2009, Poitiers, France). p. 94
- Beuning PJ & Musier-Forsyth K (1999) Transfer RNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. *Biopolymers* **52**(1):1-28.
- Bi X & Liu LF (1996) DNA rearrangement mediated by inverted repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(2):819-823.
- Birky CW (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu Rev Genet* **35**:125-148.
- Bonitz SG, Berlani R, Coruzzi G, Li M, Macino G, Nobrega FG, Nobrega MP, Thalenfeld BE & Tzagoloff A (1980) Codon recognition rules in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(6):3167-3170.
- Boore JL & Brown WM (1998) Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr Opin Genet Dev* **8**(6):668-674.
- Boore JL, Lavrov DV & Brown WM (1998) Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* **392**(6677):667-668.
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* **27**(8):1767-1780.

- Boore JL (2000) The duplication/random loss model for gene rearrangement exemplified by mitochondrial genomes of deuterostome animals. *in* JH Nadeau, ed. *Comparative Genomics*. Kluwer Academic Publishing, The Netherlands. Pp. 133-147
- Boore JL, Macey JR & Medina M (2005) Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *in* EA Zimmer & E Roalson, eds. *Molecular Evolution Producing the Biomedical Data, Part B*. MiE series, Elsevier, Burlington, Massachusetts. Pp. 311-348
- Boore JL (2006) The use of genome-level characters for phylogenetic reconstruction. *Trends Ecol Evol* **21**(8):439-446.
- Bordenstein SR & Werren JH (2007) Bidirectional incompatibility among divergent *Wolbachia* and incompatibility level differences among closely related *Wolbachia* in *Nasonia*. *Heredity* **99**(3):278-287.
- Börner GV, Mörl M, Janke A & Pääbo S (1996) RNA editing changes the identity of a mitochondrial tRNA in marsupials. *Embo J* **15**(21):5949-5957.
- Bouchon D, Souty-Grosset C & Raimond R (1994) Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate. *Aquaculture* **127**:131-144.
- Bouchon D, Rigaud T & Juchault P (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc Biol Sci* **265**(1401):1081-1090.
- Bouchon D, Cordaux R & Grève P (2008) Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. *in* IS K Bourtzis and TA Miller, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, ed. *Insect Symbiosis*. Pp. 275-294
- Boyce TM, Zwick ME & Aquadro CF (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics* **123**(4):825-836.
- Brasher DJ, Ovenden JR & White RWG (1992) Mitochondrial variation and phylogenetic relationships of *Jasus* spp. (Decapoda: Palinuridae). *J. Zool. Lond.* **227**:1-16.
- Breton S, Burger G, Stewart DT & Blier PU (2006) Comparative analysis of gender-associated complete mitochondrial genomes in marine mussels (*Mytilus* spp.). *Genetics* **172**(2):1107-1119.
- Breton S, Doucet Beaupré H, Stewart DT, Hoeh WR & Blier PU (2007) The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? *Trends Genet* **23**(9):465-474.
- Breton S, Doucet Beaupré H, Stewart DT, Piontkivska H, Karmakar M, Bogan AE, Blier PU & Hoeh WR (2009) Comparative mitochondrial genomics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida) with Doubly Uniparental Inheritance of mtDNA: gender-specific Open reading Frames (ORFs) and putative origins of replication. *Genetics* **183**(4):1575-1589.

- Bridge D, Cunningham CW, Schierwater B, DeSalle R & Buss LW (1992) Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(18):8750-8753.
- Bridge D, Cunningham CW, DeSalle R & Buss LW (1995) Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Mol Biol Evol* **12**(4):679-689.
- Brusca RC & Wilson GDF (1991) A phylogenetic analysis of the Isopoda with some classificatory recommendations. *Memoirs of the Queensland Museum* **31**:143-204.
- Bureš S & Weidinger K (2003) Sources and timing of calcium intake during reproduction in flycatchers. *Oecologia* **137**(4):634-641.
- Burger G, Zhu Y, Littlejohn TG, Greenwood SJ, Schnare MN, Lang BF & Gray MW (2000) Complete sequence of the mitochondrial genome of *Tetrahymena pyriformis* and comparison with *Paramecium aurelia* mitochondrial DNA. *J Mol Biol* **297**(2):365-380.
- Burger G, Forget L, Zhu Y, Gray MW & Lang BF (2003a) Unique mitochondrial genome architecture in unicellular relatives of animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3):892-897.
- Burger G, Gray MW & Lang BF (2003b) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* **19**(12):709-716.
- Burton RS, Byrne RJ & Rawson PD (2007) Three divergent mitochondrial genomes from California populations of the copepod *Tigriopus californicus*. *Gene* **403**(1-2):53-59.
- Burzyński A, Zbawicka M, Skibinski DO & Wenne R (2003) Evidence for recombination of mtDNA in the marine mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. *Mol Biol Evol* **20**(3):388-392.
- Burzyński A, Zbawicka M, Skibinski DO & Wenne R (2006) Doubly uniparental inheritance is associated with high polymorphism for rearranged and recombinant control region haplotypes in Baltic *Mytilus trossulus*. *Genetics* **174**(3):1081-1094.
- Cao L, Kenchington E & Zouros E (2004a) Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics* **166**(2):883-894.
- Cao L, Kenchington E, Zouros E & Rodakis GC (2004b) Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilus* spp.). *Genetics* **167**(2):835-850.
- Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K, Hara T, Hayashi J & Yonekawa H (2007) The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* **39**(3):386-390.
- Carefoot T & Taylor B (1995) *Ligia*: a prototypal terrestrial isopod. *Crustacean Issues, Rotterdam* **9**:47-60.



- Carneiro VT, Dietrich A, Maréchal-Drouard L, Cosset A, Pelletier G & Small I (1994) Characterization of some major identity elements in plant alanine and phenylalanine transfer RNAs. *Plant Mol Biol* **26**(6):1843-1853.
- Casjens S (1999) Evolution of the linear DNA replicons of the *Borrelia* spirochetes. *Curr Opin Microbiol* **2**(5):529-534.
- Chen WJ, Tsai KH, Cheng SL, Huang CG & Wu WJ (2005) Using in situ hybridization to detect endosymbiont *Wolbachia* in dissected tissues of mosquito host. *J Med Entomol* **42**(2):120-124.
- Cheng Q, Ruel TD, Zhou W, Moloo SK, Majiwa P, O'Neill SL & Aksoy S (2000) Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in tsetse flies, *Glossina* spp. *Med Vet Entomol* **14**(1):44-50.
- Chihade JW, Hayashibara K, Shiba K & Schimmel P (1998) Strong selective pressure to use G:U to mark an RNA acceptor stem for alanine. *Biochemistry* **37**(25):9193-9202.
- Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM, Lightowlers RN & Howell N (2000) The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet* **16**(11):500-505.
- Chinnery PF (2002) Modulating heteroplasmy. *Trends Genet* **18**(4):173-176.
- Ciborowski KL, Consuegra S, Garcia de Leaniz C, Beaumont MA, Wang J & Jordan WC (2007) Rare and fleeting: an example of interspecific recombination in animal mitochondrial DNA. *Biol Lett* **3**(5):554-557.
- Clark-Walker GD (1992) Evolution of mitochondrial genomes in fungi. *Int Rev Cytol* **141**:89-127.
- Clary DO & Wolstenholme DR (1985) The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J Mol Evol* **22**(3):252-271.
- Clayton DA & Vinograd J (1969) Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **62**(4):1077-1084.
- Cook CE, Yue Q & Akam M (2005) Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic. *Proc Biol Sci* **272**(1569):1295-1304.
- Cordaux R, Michel-Salzat A & Bouchon D (2001) *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J Evol Biol* **14**:237-243.
- Crease TJ (1999) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene* **233**(1-2):89-99.
- Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapijit P, Mann JR, Dahl HH & Chinnery PF (2008) A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* **40**(2):249-254.

- Curole JP & Kocher TD (1999) Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Trends Ecol Evol* **14**(10):394-398.
- Curole JP & Kocher TD (2005) Evolution of a unique mitotype-specific protein-coding extension of the cytochrome c oxidase II gene in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea). *J Mol Evol* **61**(3):381-389.
- Curry JP (1994) *Grassland Invertebrates: ecology, Influence on Soil Fertility and Effects on Plant Growth*. Chapman & Hall, London p. 437.
- Dawid IB & Blackler AW (1972) Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Dev Biol* **29**(2):152-161.
- de Bruijn MH, Schreier PH, Eperon IC, Barrell BG, Chen EY, Armstrong PW, Wong JF & Roe BA (1980) A mammalian mitochondrial serine transfer RNA lacking the "dihydrouridine" loop and stem. *Nucleic Acids Res* **8**(22):5213-5222.
- de Bruijn MH (1983) *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA, a novel organization and genetic code. *Nature* **304**(5923):234-241.
- de Duve C (1988) Transfer RNAs: the second genetic code. *Nature* **333**(6169):117-118.
- De Rijk P & De Wachter R (1997) RnaViz, a program for the visualisation of RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* **25**(22):4679-4684.
- Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME & Bouletreau M (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11):6247-6252.
- Delgado AM & Cook JM (2009) Effects of a sex-ratio distorting endosymbiont on mtDNA variation in a global insect pest. *BMC Evol Biol* **9**:49.
- DeWayne Shoemaker D, Keller G & Ross KG (2003) Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. *Mol Ecol* **12**(7):1757-1771.
- Dias N, Sprung M & Hassall M (2005) The abundance and life histories of terrestrial isopods in a salt marsh of the Ria Formosa lagoon system, southern Portugal. *Marine Biology* **147**:1343-1352.
- Dickey T, Khaki A, Gauger A, Nieuwkoop A, Agyiri A, Ducker G & Chihade JW (2006) Animal mitochondrial alanyl-tRNA synthetase use divergent tRNA recognition strategies. *International conference on aminoacyl-tRNA synthetases: from the genetic code to human diseases & medicine* (San Diego, CA, USA; October 1-6, 2006). p. 48
- Dinouël N, Drissi R, Miyakawa I, Sor F, Rousset S & Fukuhara H (1993) Linear mitochondrial DNAs of yeasts: closed-loop structure of the termini and possible linear-circular conversion mechanisms. *Mol Cell Biol* **13**(4):2315-2323.
- Dörner M, Altmann M, Pääbo S & Mörl M (2001) Evidence for import of a lysyl-tRNA into marsupial mitochondria. *Mol Biol Cell* **12**(9):2688-2698.

- Doublet V, Souty-Grosset C, Bouchon D, Cordaux R & Marcadé I (2008) A thirty million year-old inherited heteroplasmy. *PLoS ONE* **3**(8):e2938.
- Doublet V, Raimond R, Grandjean F, Lafitte A, Souty-Grosset C & Marcadé I (en prép.) Widespread of the atypical structure of mitochondrial genome in Isopods (Crustacea, Peracarida): a possible way of heteroplasmy transmission.
- Dowton M, Cameron SL, Dowavic JI, Austin AD & Whiting MF (2009) Characterisation Of 67 Mitochondrial tRNA Gene Rearrangements In The Hymenoptera Suggests That Mitochondrial tRNA Gene Position Is Selectively Neutral. *Mol Biol Evol* **26**(7):1607-1617.
- Dreyer H & Wägele JW (2002) The Scutocoxifera Tax. Nov. and the information content of nuclear ssu rDNA sequences for reconstruction of Isopod Phylogeny (Peracarida: Isopoda). *Journal of Crustacean biology* **22**(2):217-234.
- Duron O, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstadter J & Hurst GD (2008a) The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol* **6**:27.
- Duron O, Hurst GD, Hornett EA, Josling JA & Engelstadter J (2008b) High incidence of the maternally inherited bacterium *Cardinium* in spiders. *Mol Ecol* **17**(6):1427-1437.
- Elson JL & Lightowlers RN (2006) Mitochondrial DNA clonality in the dock: can surveillance swing the case? *Trends Genet* **22**(11):603-607.
- Emelyanov VV (2003) Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. *Eur J Biochem* **270**(8):1599-1618.
- Endo K, Noguchi Y, Ueshima R & Jacobs HT (2005) Novel repetitive structures, deviant protein-encoding sequences and unidentified ORFs in the mitochondrial genome of the brachiopod *Lingula anatina*. *J Mol Evol* **61**(1):36-53.
- Everett EM, Williams PJ, Gibson G & Stewart DT (2004) Mitochondrial DNA polymorphisms and sperm motility in *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol* **301**(11):906-910.
- Fan J & Lee RW (2002) Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella parva*: two linear DNA molecules with homologous inverted repeat Termini. *Mol Biol Evol* **19**(7):999-1007.
- Fauron C, Allen J, Clifton S & Newton KJ (2004) Plant mitochondrial genomes. in H Daniell & C Chase, eds. *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*. Springer Netherlands. Pp. 151-177
- Feagin JE (1994) The extrachromosomal DNAs of apicomplexan parasites. *Annu Rev Microbiol* **48**:81-104.
- Fender A, Sauter C, Messmer M, Pütz J, Giegé R, Florentz C & Sissler M (2006) Loss of a primordial identity element for a mammalian mitochondrial aminoacylation system. *J Biol Chem* **281**(23):15980-15986.

- Filipowicz M, Burzyński A, Śmietanka B & Wenne R (2008) Recombination in mitochondrial DNA of European *Mussels Mytilus*. *J Mol Evol* **67**:377-388.
- Fitzpatrick DA, Creevey CJ & McInerney JO (2006) Genome phylogenies indicate a meaningful alpha-proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the Rickettsiales. *Mol Biol Evol* **23**(1):74-85.
- Florentz C, Dreher TW, Rudinger J & Giegé R (1991) Specific valylation identity of turnip yellow mosaic virus RNA by yeast valyl-tRNA synthetase is directed by the anticodon in a kinetic rather than affinity-based discrimination. *Eur J Biochem* **195**(1):229-234.
- Fonseca MM, Posada D & Harris DJ (2008) Inverted replication of vertebrate mitochondria. *Mol Biol Evol* **25**(5):805-808.
- Fontaine KM, Cooley JR & Simon C (2007) Evidence for paternal leakage in hybrid periodical cicadas (Hemiptera: *Magicicada* spp.). *PLoS ONE* **2**(9):e892.
- Forget L, Ustinova J, Wang Z, Huss VA & Lang BF (2002) *Hyaloraphidium curvatum*: a linear mitochondrial genome, tRNA editing, and an evolutionary link to lower fungi. *Mol Biol Evol* **19**(3):310-319.
- Francino MP & Ochman H (1997) Strand asymmetries in DNA evolution. *Trends Genet* **13**(6):240-245.
- Francklyn C & Schimmel P (1989) Aminoacylation of RNA minihelices with alanine. *Nature* **337**(6206):478-481.
- Frederico LA, Kunkel TA & Shaw BR (1990) A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* **29**(10):2532-2537.
- Fujita MK, Boore JL & Moritz C (2007) Multiple origins and rapid evolution of duplicated mitochondrial genes in parthenogenetic geckos (*Heteronotia binoei*; Squamata, Gekkonidae). *Mol Biol Evol* **24**(12):2775-2786.
- Fukuhara H, Sor F, Drissi R, Dinouël N, Miyakawa I, Rousset S & Viola AM (1993) Linear mitochondrial DNAs of yeasts: frequency of occurrence and general features. *Mol Cell Biol* **13**(4):2309-2314.
- Fumagalli L, Taberlet P, Favre L & Hausser J (1996) Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Mol Biol Evol* **13**(1):31-46.
- Gantenbein B, Fet V, Gantenbein-Ritter IA & Balloux F (2005) Evidence for recombination in scorpion mitochondrial DNA (Scorpiones: Buthidae). *Proc Biol Sci* **272**(1564):697-704.
- Garey JR & Wolstenholme DR (1989) Platyhelminth mitochondrial DNA: evidence for early evolutionary origin of a tRNA(serAGN) that contains a dihydrouridine arm replacement loop, and of serine-specifying AGA and AGG codons. *J Mol Evol* **28**(5):374-387.

- Gibson T, Blok VC & Downton M (2007) Sequence and characterization of six mitochondrial subgenomes from *Globodera rostochiensis*: multipartite structure is conserved among close nematode relatives. *J Mol Evol* **65**(3):308-315.
- Giegé R, Sissler M & Florentz C (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* **26**(22):5017-5035.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM & Wallace DC (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(11):6715-6719.
- Gilkerson RW (2009) Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol* **41**(10):1899-1906.
- Gillham NW (1994) *Organelle Genes and Genomes*. Oxford University press, New York, NY, USA. 440p.
- Gilson P, Waller R & McFadden G (1995) Preliminary characterisation of chlorarachniophyte mitochondrial DNA. *J Eukaryot Microbiol* **42**(6):696-701.
- Gissi C, Iannelli F & Pesole G (2008) Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* **101**(4):301-320.
- Goddard JM & Cummings DJ (1975) Structure and replication of mitochondrial DNA from *Paramecium aurelia*. *J Mol Biol* **97**(4):593-609.
- Goddard JM & Wolstenholme DR (1980) Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from the genus *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* **8**(4):741-757.
- Grandjean F, Rigaud T, Raimond R, Juchault P & Souty-Grosset C (1993) Mitochondrial DNA polymorphism and feminizing sex factors dynamics in a natural population of *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Genetica* **92**(1):55-60.
- Grandjean F & Souty-Grosset C (1996) Isolation and characterization of mitochondrial DNA from the endangered white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes pallipes*, Lereboullet, 1958. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **343**:175-182.
- Grandjean F & Souty-Grosset C (1997) Preliminary results on the genetic variability of mitochondrial DNA in the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana. *C R Acad Sci III* **320**(7):551-556.
- Grandjean F, Souty-Grosset C, Raimond R & Holdich DM (1997) Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Biology* **37**:493-501.
- Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Brossard N, Delage E, Littlejohn TG, Plante I, Rioux P, Saint-Louis D, Zhu Y & Burger G (1998) Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res* **26**(4):865-878.
- Gray MW, Burger G & Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**(5407):1476-1481.

- Gray MW, Burger G & Lang BF (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* **2**(6):reviews1018.
- Gray MW, Lang BF & Burger G (2004) Mitochondria of protists. *Annu Rev Genet* **38**:477-524.
- Green DR & Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**(5381):1309-1312.
- Guo X, Liu S & Liu Y (2006) Evidence for recombination of mitochondrial DNA in triploid crucian carp. *Genetics* **172**(3):1745-1749.
- Gyllensten U, Wharton D & Wilson AC (1985) Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *J Hered* **76**(5):321-324.
- Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A & Wilson AC (1991) Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* **352**(6332):255-257.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- Handa H (2008) Linear plasmids in plant mitochondria: peaceful coexistences or malicious invasions? *Mitochondrion* **8**(1):15-25.
- Hassall M & Sutton SL (1978) The role of isopods as decomposers in a dune grassland ecosystem. *Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society* **A6**:235-245.
- Hassanin A, Leger N & Deutsch J (2005) Evidence for multiple reversals of asymmetric mutational constraints during the evolution of the mitochondrial genome of metazoa, and consequences for phylogenetic inferences. *Syst Biol* **54**(2):277-298.
- Hassanin A (2006) Phylogeny of Arthropoda inferred from mitochondrial sequences: strategies for limiting the misleading effects of multiple changes in pattern and rates of substitution. *Mol Phylogenet Evol* **38**(1):100-116.
- Hayashi JI, Yonekawa H, Gotoh O, Watanabe J & Tagashira Y (1978) Strictly maternal inheritance of rat mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **83**(3):1032-1038.
- Helpfenbein KG, Fourcade HM, Vanjani RG & Boore JL (2004) The mitochondrial genome of *Paraspadella gotoi* is highly reduced and reveals that chaetognaths are a sister group to protostomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29):10639-10643.
- Helm M, Brule H, Friede D, Giegé R, Putz D & Florentz C (2000) Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *Rna* **6**(10):1356-1379.
- Hickerson MJ & Cunningham CW (2000) Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, anomura). *Mol Biol Evol* **17**(4):639-644.
- Higgs PG, Jameson D, Jow H & Rattray M (2003) The evolution of tRNA-Leu genes in animal mitochondrial genomes. *J Mol Evol* **57**(4):435-445.

- Hikosaka K, Watanabe Y-I, Tsuji N, Kita K, Kishine H, Arisue N, Palacpac NMQ, Kawasu S-I, Sawai H, Horii T, Igarashi I & Tanabe K (in press) Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Mol Biol Evol*:doi:10.1093/molbev/msp1320.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A & Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*?--A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* **281**(2):215-220.
- Hoeh WR, Stewart DT, Sutherland BW & Zouros E (1996) Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia). *Evolution* **50**:2276-2286.
- Hoeh WR, Stewart DT, Saavedra C, Sutherland BW & Zouros E (1997) Phylogenetic evidence for role-reversals of gender-associated mitochondrial DNA in *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). *Mol Biol Evol* **14**(9):959-967.
- Hoeh WR, Stewart DT & Guttman SI (2002) High fidelity of mitochondrial genome transmission under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea). *Evolution* **56**(11):2252-2261.
- Hoese B (1984) The marsupium in terrestrial isopods. *The biology of terrestrial isopods. Symposium of the Zoological Society of London* 520p.
- Hofacker IL (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* **31**(13):3429-3431.
- Hou YM & Schimmel P (1988) A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature* **333**(6169):140-145.
- Hou YM & Schimmel P (1989) Evidence that a major determinant for the identity of a transfer RNA is conserved in evolution. *Biochemistry* **28**(17):6800-6804.
- Hua J, Li M, Dong P, Cui Y, Xie Q & Bu W (2008) Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of *Pentatomomorpha* (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *BMC Genomics* **9**:610.
- Huigens ME, de Almeida RP, Boons PA, Luck RF & Stouthamer R (2004) Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc Biol Sci* **271**(1538):509-515.
- Hurst GD & Jiggins FM (2000) Male-Killing Bacteria in Insects: Mechanisms, Incidence, and Implications. *Emerging Infectious Diseases* **6**(4):329-336.
- Hurst GD & Jiggins FM (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc Biol Sci* **272**(1572):1525-1534.
- Hurst LD (1991) The incidences and evolution of cytoplasmic male killers. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* **244**:91-99.

- Hutchison CA, 3rd, Newbold JE, Potter SS & Edgell MH (1974) Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* **251**(5475):536-538.
- Hwang U-W, Friedrich M, Tautz D, Park C-J & Kim W (2001) Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* **413**(6852):154-157.
- Imai H, Fujii Y & Karakawa J (1999) Analysis of the population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the coastal waters of Okayama Prefecture, by RFLPs in the whole region of mitochondrial DNA. *Fish. Sci.* **65**:655-656.
- Imura N, Weiss GB & Chambers RW (1969) Reconstitution of alanine acceptor activity from fragments of yeast tRNA-Ala II. *Nature* **222**(5199):1147-1148.
- Ivey JL & Santos SR (2007) The complete mitochondrial genome of the Hawaiian anchialine shrimp *Halocaridina rubra* Holthuis, 1963 (Crustacea: Decapoda: Atyidae). *Gene* **394**(1-2):35-44.
- Jambu P, Juchault P & Mocquard JP (1987) Étude expérimentale de la contribution du crustacé isopode *Oniscus asellus* à la transformation des litières forestières sous chêne sessile. *Pedobiologia* **32**:147-156 (Jena).
- Janke A & Pääbo S (1993) Editing of a tRNA anticodon in marsupial mitochondria changes its codon recognition. *Nucleic Acids Res* **21**(7):1523-1525.
- Janke A, Xu X & Arnason U (1997) The complete mitochondrial genome of the wallaroo (*Macropus robustus*) and the phylogenetic relationship among Monotremata, Marsupialia, and Eutheria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4):1276-1281.
- Jenner RA, Ni Dhubhghaill C, Ferla MP & Wills MA (2009) Eumalacostracan phylogeny and total evidence: limitations of the usual suspects. *BMC Evol Biol* **9**:21.
- Jiggins FM (2003) Male-killing Wolbachia and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics* **164**(1):5-12.
- Juchault P & Legrand JJ (1985) Mechanism of the refractory state of androgen hormone in *Armadillidium vulgare* Latr. (crustacean, isopod, oniscoid) harboring a feminizing bacteria. *Gen Comp Endocrinol* **60**(3):463-467.
- Juchault P & Mocquard JP (1993) Transfer of a parasitic sex factor to the nuclear genome of the host: a hypothesis on the evolution of sex determining mechanisms in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *J Evol Biol* **6**(4):511-528.
- Juchault P, Frelon M, Bouchon D & Rigaud T (1994) New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods : evolutionary implications. *C R Acad Sci III* **317**:225-230.
- Jung S-O, Lee Y-M, Park T-J, Park HG, Hagiwara A, Leung KMY, Dahms H-U, Lee W & Lee J-S (2006) The complete mitochondrial genome of the intertidal copepod *Tigriopus* sp. (Copepoda, Harpactidae) from Korea and phylogenetic considerations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **333**:251-262.



- Kambhampati S, Rai KS & Verleye DM (1992) Frequencies of mitochondrial DNA haplotypes in laboratory cage populations of the mosquito, *Aedes albopictus*. *Genetics* **132**(1):205-209.
- Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, Taya C, Lindahl KF & Yonekawa H (1995) Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10):4542-4546.
- Kann LM, Rosenblum EB & Rand DM (1998) Aging, mating, and the evolution of mtDNA heteroplasmy in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(5):2372-2377.
- Kayal E & Lavrov DV (2008) The mitochondrial genome of *Hydra oligactis* (Cnidaria, Hydrozoa) sheds new light on animal mtDNA evolution and cnidarian phylogeny. *Gene* **410**(1):177-186.
- Khrapko K (2008) Two ways to make an mtDNA bottleneck. *Nat Genet* **40**(2):134-135.
- Ki J-S, Dahms H-U, Hwang J-S & Lee J-S (2009a) The complete mitogenome of the hydrothermal vent crab *Xenograpsus testudinatus* (Decapoda, Brachyura) and comparison with brachyuran crabs. *Comp Biochem Physiol, Part D* **4**:290-299.
- Ki J-S, Park H-G & Lee J-S (2009b) The complete mitochondrial genome of the cyclopoid copepod *Paracyclopina nana*: a highly divergent genome with novel gene order and atypical gene numbers. *Gene* **435**(1-2):13-22.
- Kilpert F & Podsiadlowski L (2006) The complete mitochondrial genome of the common sea slater, *Ligia oceanica* (Crustacea, Isopoda) bears a novel gene order and unusual control region features. *BMC Genomics* **7**:241.
- Klimov PB & Oconnor BM (2009) Improved tRNA prediction in the American house dust mite reveals widespread occurrence of extremely short minimal tRNAs in acariform mites. *BMC Genomics* **10**:598.
- Klinbunga S, Penman DJ, McAndrew BJ & Tassanakajon A (1999) Mitochondrial DNA Diversity in Three Populations of the Giant Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Mar Biotechnol (NY)* **1**(2):113-121.
- Kmiec B, Woloszynska M & Janska H (2006) Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Curr Genet* **50**(3):149-159.
- Knight RD, Freeland SJ & Landweber LF (2001) Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. *Nat Rev Genet* **2**(1):49-58.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX & Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(16):6196-6200.
- Kolodner R & Tewari KK (1979) Inverted repeats in chloroplast DNA from higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(1):41-45.

- Kondo R, Satta Y, Matsuura ET, Ishiwa H, Takahata N & Chigusa SI (1990) Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* **126**(3):657-663.
- Kosa P, Valach M, Tomáška L, Wolfe KH & Nosek J (2006) Complete DNA sequences of the mitochondrial genomes of the pathogenic yeasts *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*: insight into the evolution of linear DNA genomes from mitochondrial telomere mutants. *Nucleic Acids Res* **34**(8):2472-2481.
- Kováč L, Lazowska J & Slonimski PP (1984) A yeast with linear molecules of mitochondrial DNA. *Mol Gen Genet* **197**(3):420-424.
- Kubo T & Newton KJ (2008) Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion* **8**(1):5-14.
- Kuhn K, Streit B & Schwenk K (2008) Conservation of structural elements in the mitochondrial control region of *Daphnia*. *Gene* **420**(2):107-112.
- Kumazawa Y & Nishida M (1993) Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deep-branch animal phylogenetics. *J Mol Evol* **37**(4):380-398.
- Kvist L, Martens J, Nazarenko AA & Orell M (2003) Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Mol Biol Evol* **20**(2):243-247.
- Ladoukakis ED & Zouros E (2001) Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* **18**(7):1168-1175.
- Laipis PJ, Van de Walle MJ & Hauswirth WW (1988) Unequal partitioning of bovine mitochondrial genotypes among siblings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21):8107-8110.
- Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M & Gray MW (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**(6632):493-497.
- Laslett D & Canbäck B (2008) ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. *Bioinformatics* **24**(2):172-175.
- Lavrov DV, Brown WM & Boore JL (2000) A novel type of RNA editing occurs in the mitochondrial tRNAs of the centipede *Lithobius forficatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25):13738-13742.
- Lavrov DV, Boore JL & Brown WM (2002) Complete mtDNA sequences of two millipedes suggest a new model for mitochondrial gene rearrangements: duplication and nonrandom loss. *Mol Biol Evol* **19**(2):163-169.
- Lavrov DV, Brown WM & Boore JL (2004) Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan)crustacean relationships. *Proc Biol Sci* **271**(1538):537-544.
- Lavrov DV & Lang BF (2005) Transfer RNA gene recruitment in mitochondrial DNA. *Trends Genet* **21**(3):129-133.

- Lavrov DV (2007) Key transitions in animal evolution: a mitochondrial DNA perspective. *Integrative and Comparative Biology* **47**(5):734-743.
- Lazowska J & Slonimski PP (1976) Electron microscopy of analysis of circular repetitive mitochondrial DNA molecules from genetically characterized rho- mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **146**(1):61-78.
- Legrand JJ & Juchault P (1970) Modification expérimentale de la proportion des sexes chez les crustacés isopodes terrestres: induction de la thélygénie chez *Armadillidium vulgare* Latr. *C R Acad Sci Paris* **270**:706-708.
- Legrand JJ & Juchault P (1984) Nouvelles données sur le déterminisme génétique et épigénétique de la monogénie chez le crustacé isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latr. *Genet Sel Evol* **16**:57-84.
- Legrand JJ & Juchault P (1986) Rôle de bactéries symbiotiques dans l'intersexualité, la monogénie et la spéciation chez des crustacés oniscoïdes. *Boll Zool* **53**:161-172.
- Legrand JJ & Juchault P (2006) The ontogeny of sex and sexual physiology. in J Forest & JC von Vaupel Klein, eds. *The Crustacea*. Brill Academic Publishers, Leiden. Pp. 353-460
- Legros F, Malka F, Frachon P, Lombes A & Rojo M (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* **117**(Pt 13):2653-2662.
- Leigh J & Lang BF (2004) Mitochondrial 3' tRNA editing in the jakobid *Seculamonas ecuadoriensis*: a novel mechanism and implications for tRNA processing. *Rna* **10**(4):615-621.
- Lepelletier F (2009) *Etude des endosymbiotes parasites de la reproduction chez les Isopodes terrestres*. Rapport de Master 2 Recherche Biologie Ecologie Evolution, Université de Poitiers, Poitiers, France, 26 p.
- Levinson G & Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* **4**(3):203-221.
- Lim JT & Hwang UW (2006) The complete mitochondrial genome of *Pollicipes mitella* (Crustacea, Maxillopoda, Cirripedia): non-monophyly of maxillopoda and crustacea. *Mol Cells* **22**(3):314-322.
- Lin CT, Lyu YL & Liu LF (1997) A cruciform-dumbbell model for inverted dimer formation mediated by inverted repeats. *Nucleic Acids Res* **25**(15):3009-3016.
- Lin CT, Lin WH, Lyu YL & Whang-Peng J (2001) Inverted repeats as genetic elements for promoting DNA inverted duplication: implications in gene amplification. *Nucleic Acids Res* **29**(17):3529-3538.
- Locker J, Rabinowitz M & Getz GS (1974) Tandem inverted repeats in mitochondrial DNA of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(4):1366-1370.

- Lovato MA, Chihade JW & Schimmel P (2001) Translocation within the acceptor helix of a major tRNA identity determinant. *Embo J* **20**(17):4846-4853.
- Lovato MA, Swairjo MA & Schimmel P (2004) Positional recognition of a tRNA determinant dependent on a peptide insertion. *Mol Cell* **13**(6):843-851.
- Lowe TM & Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* **25**(5):955-964.
- Lukeš J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R & Englund PT (2002) Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell* **1**(4):495-502.
- Lunt DH & Hyman BC (1997) Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* **387**(6630):247.
- Lynch M (2006) Streamlining and simplification of microbial genome architecture. *Annu Rev Microbiol* **60**:327-349.
- Lynch M, Koskella B & Schaack S (2006) Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science* **311**(5768):1727-1730.
- Lyu YL, Lin CT & Liu LF (1999) Inversion/dimerization of plasmids mediated by inverted repeats. *J Mol Biol* **285**(4):1485-1501.
- Ma C, Liu C, Yang P & Kang L (2009) The complete mitochondrial genomes of two band-winged grasshoppers, *Gastrimargus marmoratus* and *Oedaleus asiaticus*. *BMC Genomics* **10**:156.
- Macey JR, Schulte JA, 2nd, Larson A & Papenfuss TJ (1998) Tandem duplication via light-strand synthesis may provide a precursor for mitochondrial genomic rearrangement. *Mol Biol Evol* **15**(1):71-75.
- Machida RJ, Miya MU, Nishida M & Nishida S (2002) Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda). *Mar Biotechnol (NY)* **4**(4):406-417.
- Machida RJ, Miya MU, Nishida M & Nishida S (2004a) Large-scale gene rearrangements in the mitochondrial genomes of two calanoid copepods *Eucalanus bungii* and *Neocalanus cristatus* (Crustacea), with notes on new versatile primers for the srRNA and COI genes. *Gene* **332**:71-78.
- Machida RJ, Miya MU, Yamauchi MM, Nishida M & Nishida S (2004b) Organization of the mitochondrial genome of Antarctic krill *Euphausia superba* (Crustacea: Malacostraca). *Mar Biotechnol (NY)* **6**(3):238-250.
- Magoulas A & Zouros E (1993) Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* **10**(2):319-325.
- Malka F, Lombes A & Rojo M (2006) Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: focus on vertebrate nucleoids. *Biochim Biophys Acta* **1763**(5-6):463-472.

- Marande W & Burger G (2007) Mitochondrial DNA as a genomic jigsaw puzzle. *Science* **318**(5849):415.
- Marcadé I, Souty-Grosset C, Bouchon D, Rigaud T & Raimond R (1999) Mitochondrial DNA variability and *wolbachia* infection in two sibling woodlice species. *Heredity* **83**:71-78.
- Marcadé I, Cordaux R, Doublet V, Debenest C, Bouchon D & Raimond R (2007) Structure and Evolution of the Atypical Mitochondrial Genome of *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Crustacea). *J Mol Evol* **65**(6):651-659.
- Margulis L (1981) *Symbiosis in cell evolution*. Freeman, W. H., San Francisco. p. 206-227
- Marshall JL (2004) The *Allonemobius-Wolbachia* host-endosymbiont system: evidence for rapid speciation and against reproductive isolation driven by cytoplasmic incompatibility. *Evolution* **58**(11):2409-2425.
- Martin FN (1995) Linear mitochondrial genome organization in vivo in the genus *Pythium*. *Curr Genet* **28**(3):225-234.
- Martin G, Juchault P & Legrand JJ (1973) Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbiote de l'oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latr., dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation total des mâles génétiques de la lignée thélygène. *C R Acad Sci Paris* **276**:2213-2216.
- Martinez P, Del Castillo P & Bella J (2009) Cytological detection of *Wolbachia* in squashed and paraffin embedded insect tissues. *Biotech Histochem*:1-7.
- Masta SE & Boore JL (2004) The complete mitochondrial genome sequence of the spider *Habronattus oregonensis* reveals rearranged and extremely truncated tRNAs. *Mol Biol Evol* **21**(5):893-902.
- Masta SE, Longhorn SJ & Boore JL (2009) Arachnid relationships based on mitochondrial genomes: asymmetric nucleotide and amino acid bias affects phylogenetic analyses. *Mol Phylogenet Evol* **50**(1):117-128.
- Maté ML, Di Rocco F, Zambelli A & Vidal-Rioja L (2007) Mitochondrial heteroplasmy in control region DNA of South American camelids. *Samll Ruminant Research* **71**:123-129.
- Mattern D & Schlegel M (2001) Molecular evolution of the small subunit ribosomal DNA in woodlice (Crustacea, Isopoda, Oniscidea) and implications for Oniscidean phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* **18**(1):54-65.
- Mattern D (2003) New Aspects in the Phylogeny of the Oniscidea Inferred From Molecular Data. *The Biology of Terrestrial Isopods*, V. Pp. 23-37
- May-Panloup P, Chrétien M-F, Malthiery Y & Reynier P (2006) ADN mitochondrial du spermatozoïde. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* **34**(9):847-854.
- McClain WH & Foss K (1988) Changing the identity of a tRNA by introducing a G-U wobble pair near the 3' acceptor end. *Science* **240**(4853):793-796.

- McLean M, Okubo CK & Tracey ML (1983) MtDNA heterogeneity in *Panulirus argus*. *Experientia* **39**(5):536-538.
- McMillen-Jackson AL & Bert TM (2004) Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes sapidus* in the eastern United States. *Marine Biology* **145**:769-777.
- Medina M, Collins AG, Takaoka TL, Kuehl JV & Boore JL (2006) Naked corals: skeleton loss in *Scleractinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24):9096-9100.
- Meusel MS & Moritz RF (1993) Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr Genet* **24**(6):539-543.
- Michel-Salzat A (2000) *Evolution des Oniscidea (Crustacea, Isopoda) : analyse de genes mitochondriaux et implications phylogénétiques*. Thèse de Doctorat, Université Paris 6, Paris, France, 262 p.
- Michel-Salzat A & Bouchon D (2000) Phylogenetic analysis of mitochondrial LSU rRNA in oniscids. *C R Acad Sci III* **323**(9):827-837.
- Michel-Salzat A, Cordaux R & Bouchon D (2001) *Wolbachia* diversity in the *Porcellionides pruinosus* complex of species (Crustacea: Oniscidea): evidence for host-dependent patterns of infection. *Heredity* **87**(Pt 4):428-434.
- Millar CD, Dodd A, Anderson J, Gibb GC, Ritchie PA, Baroni C, Woodhams MD, Hendy MD & Lambert DM (2008) Mutation and evolutionary rates in adelic penguins from the antarctic. *PLoS Genet* **4**(10):e1000209.
- Miller AD, Nguyen TT, BurrIDGE CP & Austin CM (2004) Complete mitochondrial DNA sequence of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Crustacea: Decapoda: Parastacidae): a novel gene order revealed. *Gene* **331**:65-72.
- Miller AD, Murphy NP, BurrIDGE CP & Austin CM (2005) Complete mitochondrial DNA sequences of the decapod crustaceans *Pseudocarcinus gigas* (Menippidae) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae). *Mar Biotechnol (NY)* **7**(4):339-349.
- Mjelle KA, Karlsen BO, Jorgensen TE, Moum T & Johansen SD (2008) Halibut mitochondrial genomes contain extensive heteroplasmic tandem repeat arrays involved in DNA recombination. *BMC Genomics* **9**:10.
- Mocquard JP, Juchault P, Jambu P & Fustec E (1988) Essai d'évaluation du rôle des crustacés oniscoïdes dans la transformation des matières végétales dans une forêt feuillue de l'ouest de la France. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* **24**(3):311-327.
- Mokranjac D & Neupert W (2005) Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5):1019-1023.
- Monforte A, Barrio E & Latorre A (1993) Characterization of the length polymorphism in the A + T-rich region of the *Drosophila obscura* group species. *J Mol Evol* **36**(3):214-223.

- Moore WS (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* **49**(4):718-726.
- Moret Y, Juchault P & Rigaud T (2001) *Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. *Heredity* **86**(Pt 3):325-332.
- Mukhin AG, Papadopoulos V, Costa E & Krueger KE (1989) Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(24):9813-9816.
- Nakamura K, Ueno H & Miura K (2005) Prevalence of inherited male-killing microorganisms in Japanese population of ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ann Entomol Soc Am* **98**:96-99.
- Narita S, Nomura M, Kato Y & Fukatsu T (2006) Genetic structure of sibling butterfly species affected by *Wolbachia* infection sweep: evolutionary and biogeographical implications. *Mol Ecol* **15**(4):1095-1108.
- Nasr BS, Zghal F & Azzouna A (2009) Feminization in *Porcellio laevis* Latreille, 1802 (Isopoda, Oniscidea) from Bizerte, Tunisia. *Crustaceana* **82**(2):219-232.
- Nasri K, Juchault P, Mocquard JP & Souty-Grosset C (1996) Reproduction saisonnière chez *Hemilepistus reaumuri* (Audouin, 1826), isopode terrestre des zones semi-arides. *Crustaceana* **69**:223-235.
- Negri I, Pellecchia M, Mazzoglio PJ, Patetta A & Alma A (2006) Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. *Proc Biol Sci* **273**(1599):2409-2416.
- Neupert W & Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**:723-749.
- Newman SM, Zelenaya-Troitskaya O, Perlman PS & Butow RA (1996) Analysis of mitochondrial DNA nucleoids in wild-type and a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks the mitochondrial HMG box protein Abf2p. *Nucleic Acids Res* **24**(2):386-393.
- Nicholls DG (2005) Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* **38**(3-4):311-317.
- Nosek J, Dinouël N, Kováč L & Fukuhara H (1995) Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. *Mol Gen Genet* **247**(1):61-72.
- Nosek J, Tomáška L, Fukuhara H, Suyama Y & Kováč L (1998) Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends Genet* **14**(5):184-188.
- Nosek J & Tomáška L (2003) Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Curr Genet* **44**(2):73-84.
- Nunes MDS, Nolte V & Schlötterer C (2008) Nonrandom *Wolbachia* infection status of *Drosophila melanogaster* strains with different mtDNA haplotypes. *Mol Biol Evol* **25**(11):2493-2498.

- Oberst A, Bender C & Green DR (2008) Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. *Cell Death Differ* **15**(7):1139-1146.
- Ogoh K & Ohmiya Y (2004) Complete mitochondrial DNA sequence of the sea-firefly, *Vargula hilgendorffii* (Crustacea, Ostracoda) with duplicate control regions. *Gene* **327**(1):131-139.
- Ohtsuki T & Watanabe Y (2007) T-armless tRNAs and elongated elongation factor Tu. *IUBMB Life* **59**(2):68-75.
- Okimoto R & Wolstenholme DR (1990) A set of tRNAs that lack either the T psi C arm or the dihydrouridine arm: towards a minimal tRNA adaptor. *Embo J* **9**(10):3405-3411.
- Oldenburg DJ & Bendich AJ (1998) The structure of mitochondrial DNA from the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *J Mol Biol* **276**(4):745-758.
- Oldenburg DJ & Bendich AJ (2001) Mitochondrial DNA from the liverwort *Marchantia polymorpha*: circularly permuted linear molecules, head-to-tail concatemers, and a 5' protein. *J Mol Biol* **310**(3):549-562.
- Pallanck L & Schulman LH (1991) Anticodon-dependent aminoacylation of a noncognate tRNA with isoleucine, valine, and phenylalanine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9):3872-3876.
- Passamonti M & Scali V (2001) Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia). *Curr Genet* **39**(2):117-124.
- Passamonti M (2007) An unusual case of gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy: the mytilid *Musculista senhousia* (Mollusca Bivalvia). *BMC Evol Biol* **7** Suppl 2:S7.
- Passamonti M & Ghiselli F (2009) Doubly uniparental inheritance: two mitochondrial genomes, one precious model for organelle DNA inheritance and evolution. *DNA Cell Biol* **28**(2):79-89.
- Perna NT & Kocher TD (1995) Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *J Mol Evol* **41**(3):353-358.
- Perrichot V (2004) Early Cretaceous amber from south-western France: insight into the Mesozoic litter fauna. *Geologica Acta*, **2**(1):9-22.
- Pie MR, Oliveira-Neto JF, Boeger WA, Ostrensky A & Baggio RA (2008) The organization of the mitochondrial control region in 2 Brachyuran Crustaceans: *Ucides cordatus* (Ocypodidae) and *Cardisoma guanhumi* (Gecarcinidae). *J Hered* **99**(4):432-437.
- Pires AMS (1987) *Potiicoara brasiliensis*: a new genus and species of Spelaeogriphacea (Crustacea: Peracarida) from Brazil with a phylogenetic analysis of Peracarida. *Journal of Natural History* **21**:225-238.
- Podsiadlowski L & Bartolomaeus T (2006) Major rearrangements characterize the mitochondrial genome of the isopod *Idotea baltica* (Crustacea: Peracarida). *Mol Phylogenet Evol* **40**(3):893-899.



- Pont-Kingdon GA, Okada NA, Macfarlane JL, Beagley CT, Wolstenholme DR, Cavalier-Smith T & Clark-Walker GD (1995) A coral mitochondrial mutS gene. *Nature* **375**(6527):109-111.
- Pool JE, Wong A & Aquadro CF (2006) Finding of male-killing *Spiroplasma* infecting *Drosophila melanogaster* in Africa implies transatlantic migration of this endosymbiont. *Heredity* **97**(1):27-32.
- Poore GCB (2005) Peracarida: monophyly, relationships and evolution success. *Nauplius* **13**:1-27.
- Powers TO, Platzer EG & Hyman BC (1986) Large mitochondrial genome and mitochondrial DNA size polymorphism in the mosquito parasite, *Romanomermis culicivorax*. *Curr Genet* **11**(1):71-77.
- Race HL, Herrmann RG & Martin W (1999) Why have organelles retained genomes? *Trends Genet* **15**(9):364-370.
- Raimond R, Marcadé I, Bouchon D, Rigaud T, Bossy JP & Souty-Grosset C (1999) Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* **151**(1):203-210.
- Ramos A & Varani G (1997) Structure of the acceptor stem of *Escherichia coli* tRNA Ala: role of the G3.U70 base pair in synthetase recognition. *Nucleic Acids Res* **25**(11):2083-2090.
- Rand DM (1993) Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. *J Mol Evol* **37**(3):281-295.
- Rand DM (2001) The units of selection on mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**:415-448.
- Rasgon JL, Cornel AJ & Scott TW (2006) Evolutionary history of a mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proc Biol Sci* **273**(1594):1603-1611.
- Ravin NV, Strakhova TS & Kuprianov VV (2001) The protelomerase of the phage-plasmid N15 is responsible for its maintenance in linear form. *J Mol Biol* **312**(5):899-906.
- Rawlings TA, Collins TM & Bieler R (2003) Changing identities: tRNA duplication and remodeling within animal mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26):15700-15705.
- Rawson PD (2005) Nonhomologous recombination between the large unassigned region of the male and female mitochondrial genomes in the mussel, *Mytilus trossulus*. *J Mol Evol* **61**(6):717-732.
- Reichert AS & Mörl M (2000) Repair of tRNAs in metazoan mitochondria. *Nucleic Acids Res* **28**(10):2043-2048.
- Reilly JG & Thomas CA, Jr. (1980) Length polymorphisms, restriction site variation, and maternal inheritance of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. *Plasmid* **3**(2):109-115.

- Richter S & Scholtz G (2001) Phylogenetic analysis of the Malacostraca (Crustacea). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **39**:113-136.
- Rigaud T, Juchault P & Mocquard JP (1997) The evolution of sex determination in isopod crustaceans. *Bioessays* **19**:409-416.
- Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C & Raimond R (1999a) Mitochondrial DNA polymorphism, sex ratio distorters and population genetics in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* **152**(4):1669-1677.
- Rigaud T, Moreau J & Juchault P (1999b) *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus*: sex ratio distortion and effect on fecundity. *Heredity* **83**(Pt 4):469-475.
- Roehrdanz RL, Degrugillier ME & Black WCt (2002) Novel rearrangements of arthropod mitochondrial DNA detected with long-PCR: applications to arthropod phylogeny and evolution. *Mol Biol Evol* **19**(6):841-849.
- Rokas A, Atkinson RJ, Brown GS, West SA & Stone GN (2001) Understanding patterns of genetic diversity in the oak gallwasp *Biorhiza pallida*: demographic history or a *Wolbachia* selective sweep? *Heredity* **87**(Pt 3):294-304.
- Rokas A, Ladoukakis, E., Zouros, E. (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *TRENDS in Ecology and Evolution* **18**(8):411-417.
- Roy J, Faktorová D, Lukeš J & Burger G (2007) Unusual mitochondrial genome structures throughout the Euglenozoa. *Protist* **158**(3):385-396.
- Rozen S & Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**:365-386.
- Ryan R, Grant D, Chiang KS & Swift H (1978) Isolation and characterization of mitochondrial DNA from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(7):3268-3272.
- Rycovska A, Valach M, Tomáška L, Bolotin-Fukuhara M & Nosek J (2004) Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology* **150**(Pt 5):1571-1580.
- Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G & Reyes A (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* **238**(1):195-209.
- Saito S, Tamura K & Aotsuka T (2005) Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics* **171**(4):1695-1705.
- Sakurai M, Watanabe Y, Watanabe K & Ohtsuki T (2006) A protein extension to shorten RNA: elongated elongation factor-Tu recognizes the D-arm of T-armless tRNAs in nematode mitochondria. *Biochem J* **399**(2):249-256.
- Salinas T, Duchêne AM & Maréchal-Drouard L (2008) Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem Sci* **33**(7):320-329.

- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed. 2, Cold Spring Harbor, NY p.
- San Mauro D, Gower DJ, Zardoya R & Wilkinson M (2006) A hotspot of gene order rearrangement by tandem duplication and random loss in the vertebrate mitochondrial genome. *Mol Biol Evol* **23**(1):227-234.
- Sano N, Obata M & Komaru A (2007) Quantitation of the male and female types of mitochondrial DNA in a blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*, using real-time polymerase chain reaction assay. *Dev Growth Differ* **49**(1):67-72.
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**(5407):1488-1493.
- Satoh M & Kuroiwa T (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* **196**(1):137-140.
- Schmalzfuss H (1975) Morphologie, Funktion, und Evolution der Tergithöcker bei Landisopoden (Oniscoidea, Isopoda, Crustacea). *Z. Morph. Tiere*. **80**:287-316.
- Schmalzfuss H (1989) Phylogenetics in Oniscidea. *Monitore Zoologico Italiano (N.S.) Monografia* **4**:3-27.
- Schmalzfuss H (2003) World catalog of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscoidea). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A* **654**:1-341.
- Schmidt C & Wägele JW (2001) Morphology and evolution of respiratory structures in the pleopod exopodites of terrestrial Isopoda (Crustacea, Isopoda, Oniscoidea). *Acta Zoologica (Stockholm)* **82**:315-330.
- Schmidt C (2008) Phylogeny of the terrestrial Isopoda (Oniscoidea): a review. *Arthropod Systematics and Phylogeny* **62**(2):191-226.
- Schneider A & Maréchal-Drouard L (2000) Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol* **10**(12):509-513.
- Schneider A & Ebert D (2004) Covariation of mitochondrial genome size with gene lengths: evidence for gene length reduction during mitochondrial evolution. *J Mol Evol* **59**(1):90-96.
- Schram FR & Hof HJ (1998) Fossils and the interrelationships of major crustacean groups. Pp. 233-302. in GD Edgecombe, ed. *Arthropod fossils and phylogeny*. Columbia University Press, New York, 347 p.
- Schwartz M & Vissing J (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* **347**(8):576-580.
- Scouras A, Beckenbach K, Arndt A & Smith MJ (2004) Complete mitochondrial genome DNA sequence for two ophiuroids and a holothuroid: the utility of protein gene sequence and gene maps in the analyses of deep deuterostome phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* **31**(1):50-65.

- Scouras A & Smith MJ (2006) The complete mitochondrial genomes of the sea lily *Gymnocrinus richeri* and the feather star *Phanogenia gracilis*: signature nucleotide bias and unique *nad4L* gene rearrangement within crinoids. *Mol Phylogenet Evol* **39**(2):323-334.
- Segawa RD & Aotsuka T (2005) The mitochondrial genome of the Japanese freshwater crab, *Geothelphusa dehaani* (Crustacea: Brachyura): evidence for its evolution via gene duplication. *Gene* **355**:28-39.
- Sengupta S, Yang X & Higgs PG (2007) The mechanisms of codon reassignments in mitochondrial genetic codes. *J Mol Evol* **64**(6):662-688.
- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F & Sullivan W (2008) The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet* **42**:683-707.
- Sesterhenn TM, Slaven BE, Keely SP, Smulian AG, Lang BF & Cushion MT (2010) Sequence and structure of the linear mitochondrial genome of *Pneumocystis carinii*. *Mol Genet Genomics* **283**(1):63-72.
- Shadel GS & Clayton DA (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* **66**:409-435.
- Shah DM & Langley CH (1977) Complex mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* **4**(9):2949-2960.
- Shao R, Campbell NJ & Barker SC (2001) Numerous gene rearrangements in the mitochondrial genome of the wallaby louse, *Heterodoxus macropus* (Phthiraptera). *Mol Biol Evol* **18**(5):858-865.
- Shao R, Downton M, Murrell A & Barker SC (2003) Rates of gene rearrangement and nucleotide substitution are correlated in the mitochondrial genomes of insects. *Mol Biol Evol* **20**(10):1612-1619.
- Shao R, Kirkness EF & Barker SC (2009) The single mitochondrial chromosome typical of animals has evolved into 18 minichromosomes in the human body louse, *Pediculus humanus*. *Genome Res* **19**(5):904-912.
- Shao Z, Graf S, Chaga OY & Lavrov DV (2006) Mitochondrial genome of the moon jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): A linear DNA molecule encoding a putative DNA-dependent DNA polymerase. *Gene* **381**:92-101.
- Shen X, Sun M, Wu Z, Tian M, Cheng H, Zhao F & Meng X (2009) The complete mitochondrial genome of the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* Holthuis, 1950 (Crustacean: Decapoda: Palaemonidae) revealed a novel rearrangement of tRNA genes. *Gene* **437**(1-2):1-8.
- Shen X, Wang H, Ren J, Tian M & Wang M (2010) The mitochondrial genome of *Euphausia superba* (Prydz Bay) (Crustacea: Malacostraca: Euphausiacea) reveals a novel gene arrangement and potential molecular markers. *Mol Biol Rep* **37**(2):771-784.

- Sherengul W, Kondo R & Matsuura ET (2006) Analysis of paternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genes Genet Syst* **81**(6):399-404.
- Shi JP, Martinis SA & Schimmel P (1992) RNA tetraloops as minimalist substrates for aminoacylation. *Biochemistry* **31**(21):4931-4936.
- Shiba K, Ripmaster T, Suzuki N, Nichols R, Plotz P, Noda T & Schimmel P (1995) Human alanyl-tRNA synthetase: conservation in evolution of catalytic core and microhelix recognition. *Biochemistry* **34**(33):10340-10349.
- Siewing R (1963) Studies in malacostracan motpology: results and problems. in HB Whittington & WDI Rolfe, eds. *Phylogeny and Evolution of Crustacea*, 192p. Museum of Comparative Zoology Special Publication, Cambridge, Massachusetts. Pp. 85-103
- Signorovitch AY, Buss LW & Dellaporta SL (2007) Comparative Genomics of Large Mitochondria in Placozoans. *PLoS Genet* **3**(1):e13.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H & Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**(6):651-701.
- Skibinski DO, Gallagher C & Beynon CM (1994) Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* **138**(3):801-809.
- Slate J & Gemmell NJ (2004) Eve 'n' Steve: recombination of human mitochondrial DNA. *TRENDS in Ecology and Evolution* **19**:561-563.
- Smith DR & Snyder M (2007) Complete mitochondrial DNA sequence of the scallop *Placopecten magellanicus*: evidence of transposition leading to an uncharacteristically large mitochondrial genome. *J Mol Evol* **65**(4):380-391.
- Smith DR & Lee RW (2008) Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella capuana*: a linear molecule with an unprecedented GC content. *Mol Biol Evol* **25**(3):487-496.
- Sor F & Fukuhara H (1983) Unequal excision of complementary strands is involved in the generation of palindromic repetitions of rho- mitochondrial DNA in yeast. *Cell* **32**(2):391-396.
- Souty-Grosset C, Raimond R & Tourte M (1992) Déterminisme épigénétique du sexe et divergence génétique de l'ADN mitochondrial chez *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé Oniscoïde): variabilité inter et intrapopulations. *C. R. Acad. Sc Paris* **314**:119-125.
- Souty-Grosset C, Grandjean F, Raimond R, Frelon M, Debenest C & Bramard M (1997) Conservation genetics of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* : the usefulness of the mitochondrial DNA marker. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **347**:677-692.
- Souty-Grosset C, Badenhauer I, Reynolds JD & Morel A (2005) Investigations on the potential of woodlice as bioindicators of grassland habitat quality. *European Journal of Soil Biology* **41**:109-116.

- Spears T, DeBry RW, Abele LG & Chodyla K (2005) Peracarid monophyly and interordinal phylogeny inferred from nuclear small-subunit ribosomal DNA sequences (Crustacea: Malacostraca: Peracarida). *Proceedings of Biological Society of Washington* **118**(1):117-157.
- Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* **5**(3):233-241.
- Stanton DJ, Crease TJ & Hebert PD (1991) Cloning and characterization of *Daphnia* mitochondrial DNA. *J Mol Evol* **33**(2):152-155.
- Stouthamer R, Breeuwer JA & Hurst GD (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* **53**:71-102.
- Suga K, Mark Welch DB, Tanaka Y, Sakakura Y & Hagiwara A (2008) Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Mol Biol Evol* **25**(6):1129-1137.
- Sun H, Zhou K & Song D (2005) Mitochondrial genome of the Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis* (Brachyura: Thoracotremata: Grapsoidea) reveals a novel gene order and two target regions of gene rearrangements. *Gene* **349**:207-217.
- Sun LV, Foster JM, Tzertzinis G, Ono M, Bandi C, Slatko BE & O'Neill SL (2001) Determination of *Wolbachia* genome size by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* **183**(7):2219-2225.
- Sunderland KD & Sutton SL (1980) A serological study of Arthropod predation on woodlice in a dune grassland ecosystem. *Journal of Animal Ecology* **49**:987-1004.
- Sutherland B, Stewart DT, Kenchington ER & Zouros E (1998) The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics* **148**(1):341-347.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C & Schatten G (2000) Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* **63**(2):582-590.
- Sutovsky P, McCauley TC, Sutovsky M & Day BN (2003) Early degradation of paternal mitochondria in domestic pig (*Sus scrofa*) is prevented by selective proteasomal inhibitors lactacystin and MG132. *Biol Reprod* **68**(5):1793-1800.
- Suyama Y & Miura K (1968) Size and Structural Variations of Mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **60**(1):235-242.
- Swairjo MA, Otero FJ, Yang XL, Lovato MA, Skene RJ, McRee DE, Ribas de Pouplana L & Schimmel P (2004) Alanyl-tRNA synthetase crystal structure and design for acceptor-stem recognition. *Mol Cell* **13**(6):829-841.
- Taanman JW (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* **1410**(2):103-123.

- Taiti S, Arnedo MA, Lew SE & Roderick GK (2003) Evolution of terrestriality in Hawaiian species of the genus *Ligia* (Isopoda, Oniscidea). *Crustaceana Monog.* **2**:85-102.
- Tang S & Hyman BC (2007) Mitochondrial genome haplotype hypervariation within the isopod parasitic nematode *Thaumamermis cosgrovei*. *Genetics* **176**(2):1139-1150.
- Tatarenkov A & Avise JC (2007) Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA. *Proc Biol Sci* **274**(1619):1795-1798.
- Taylor MJ & Hoerauf A (1999) *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today* **15**(11):437-442.
- Theologidis I, Saavedra C & Zouros E (2007) No evidence for absence of paternal mtDNA in male progeny from pair matings of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* **176**(2):1367-1369.
- Theologidis I, Fodelianakis S, Gaspar MB & Zouros E (2008) Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution* **62**(4):959-970.
- Thompson WE, Ramalho-Santos J & Sutovsky P (2003) Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* **69**(1):254-260.
- Tjensvoll K, Hodneland K, Nilsen F & Nylund A (2005) Genetic characterization of the mitochondrial DNA from *Lepeophtheirus salmonis* (Crustacea; Copepoda). A new gene organization revealed. *Gene* **353**(2):218-230.
- Tomita K, Ueda T & Watanabe K (1996) RNA editing in the acceptor stem of squid mitochondrial tRNA(Tyr). *Nucleic Acids Res* **24**(24):4987-4991.
- Townsend JP & Rand DM (2004) Mitochondrial genome size variation in New World and Old World populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **93**(1):98-103.
- Tsaousis AD, Martin DP, Ladoukakis ED, Posada D & Zouros E (2005) Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. *Mol Biol Evol* **22**(4):925-933.
- Ujvari B, Dowton M & Madsen T (2007) Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. *Biol Lett* **3**(2):189-192.
- Ursprung H & Schabtach E (1965) Fertilization in tunicates: loss of the paternal mitochondrion prior to sperm entry. *J Exp Zool* **159**(3):379-383.
- Vahrenholz C, Riemen G, Pratje E, Dujon B & Michaelis G (1993) Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr Genet* **24**(3):241-247.
- Valach M, Tomáška L & Nosek J (2008) Preparation of yeast mitochondrial DNA for direct sequence analysis. *Curr Genet* **54**(2):105-109.

- Valverde JR, Batuecas B, Moratilla C, Marco R & Garesse R (1994) The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. *J Mol Evol* **39**(4):400-408.
- Vandel A (1943) Essai sur l'origine, l'évolution et la classification des Oniscoidea (Isopodes terrestres). *Bulletin Biologique de France et de Belgique, Supplément* **30**:1-136 Paris.
- Vandel A (1960) *Isopodes terrestres (première partie)*, Faune de France (64). Paul Lechevalier, Paris. Pp. 1-416
- Vandel A (1964) De l'emploi des appareils respiratoires pour l'établissement d'une classification rationnelle des isopodes terrestres (Oniscoidea). *Bulletin de la Société Zoologique de France* **89**:730-736.
- Vandel A (1965) Sur l'existence d'Oniscoides très primitifs menant une vie aquatique et sur le polyphylétisme des isopodes terrestres. *Annales de Spéléologie* **20**(4):489-518.
- Venetis C, Theologidis I, Zouros E & Rodakis GC (2006) No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males. *Proc Biol Sci* **273**(1600):2483-2489.
- Venetis C, Theologidis I, Zouros E & Rodakis GC (2007) A mitochondrial genome with a reversed transmission route in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Gene* **406**(1-2):79-90.
- Verne S (2007) *Diversité et impact des Wolbachia féminisantes sur la structuration génétique d'Armadillidium vulgare*. Thèse de Doctorat, Université de Poitiers, France, 199 p.
- Verne S, Johnson M, Bouchon D & Grandjean F (2007) Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene* **397**(1-2):58-66.
- Viker SM, Klingberg ÅN & Sundberg P (2006) The complete mitochondrial DNA sequence of the Northern Shrimp, *Pandalus borealis*. *Journal of Crustacean biology* **26**(3):433-435.
- Voigt O, Erpenbeck D & Wörheide G (2008) A fragmented metazoan organellar genome: the two mitochondrial chromosomes of *Hydra magnipapillata*. *BMC Genomics* **9**:350.
- Wägele JW (1989) Evolution und phylogenetisches System der Isopoda. *Zoologica* **140**:1-262.
- Wagner HP (1994) A monographic review of the Thermosbeanacea (Crustacea: paracarida). *Zoologische Verhandlungen* **291**:1-338.
- Wai T, Teoli D & Shoubridge EA (2008) The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet* **40**(12):1484-1488.
- Ward BL, Anderson RS & Bendich AJ (1981) The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (cucurbitaceae). *Cell* **25**(3):793-803.
- Watanabe KI, Bessho Y, Kawasaki M & Hori H (1999) Mitochondrial genes are found on minicircle DNA molecules in the mesozoan animal *Dicyema*. *J Mol Biol* **286**(3):645-650.



- Watling L (1999) Towards understanding the relationship of the peracaridan orders: the necessity of determining exact homologies. Pp. 73-89. in FR Schram & JC von Vaupel Klein, eds. *Crustaceans and the Biodiversity Crisis. Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress*. Amsterdam: The Netherlands, July 20-24, 1998, Vol. I. Brill NV, Leiden, The Netherlands, 1021p.
- Werren JH, Baldo L & Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* **6**(10):741-751.
- Wesolowski M & Fukuhara H (1981) Linear mitochondrial deoxyribonucleic acid from the yeast *Hansenula mrakii*. *Mol Cell Biol* **1**(5):387-393.
- Wetzer R (2001) Hierarchical analysis of mtDNA variation and the use of mtDNA for isopod (Crustacea: Peracarida: Isopoda) systematics. *Contributions to Zoology* **70**(1):23-39.
- Wetzer R (2002) Mitochondrial genes and Isopod phylogeny (Peracarida: Isopoda). *Journal of Crustacean biology* **22**(1):1-14.
- Wheeler WC (1998) Sampling, groundplans, total evidence and the systematics of arthropods. Pp. 87-96. in RA Fortey & RH Thomas, eds. *Arthropod relationships. The Systematics Association Special Volum Series 55*. Chapman and Hall, London, 383p.
- White DJ, Wolff JN, Pierson M & Gemmell NJ (2008) Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol Ecol* **17**(23):4925-4942.
- Wiedemann N, Frazier AE & Pfanner N (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**(15):14473-14476.
- Williamson D (2002) The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet* **3**(6):475-481.
- Wills MA (1998) A phylogeny of recent and fossil Crustacea derived from morphological characters. Pp. 189-209. in RA Fortey & RH Thomas, eds. *Arthropod relationships. The Systematics Association Special Volum Series 55*. Chapman and Hall, London, 383p
- Wills MA, Jenner RA & Dhubhghaill CN (2009) Eumalacostracan evolution: conflict between three sources of data. *Arthropod Systematics and Phylogeny* **67**(1):71-90.
- Wilson GDF (1999) Some of the deep-sea fauna is ancient. *Crustaceana* **72**(8):1019-1030.
- Wilson GDF (2009) The phylogenetic position of the Isopoda in the Peracarida (Crustacea: Malacostraca). *Arthropod Systematics and Phylogeny* **67**(2):159-198.
- Wilson K, Cahill V, Ballment E & Benzie J (2000) The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? *Mol Biol Evol* **17**(6):863-874.
- Wolff JN & Gemmell NJ (2008) Lost in the zygote: the dilution of paternal mtDNA upon fertilization. *Heredity* **101**(5):429-434.

- Wolstenholme DR, McLaren JD, Koike K & Jacobson EL (1973) Catenated oligomeric circular DNA molecules from mitochondria of malignant and normal mouse and rat tissues. *J Cell Biol* **56**(1):247-255.
- Wolstenholme DR, Macfarlane JL, Okimoto R, Clary DO & Wahleithner JA (1987) Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(5):1324-1328.
- Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol* **141**:173-216.
- Wolstenholme DR, Okimoto R & Macfarlane JL (1994) Nucleotide correlations that suggest tertiary interactions in the TV-replacement loop-containing mitochondrial tRNAs of the nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Nucleic Acids Res* **22**(20):4300-4306.
- Yamauchi MM, Miya MU & Nishida M (2003) Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Gene* **311**:129-135.
- Yang JS & Yang WJ (2008) The complete mitochondrial genome sequence of the hydrothermal vent galatheid crab *Shinkaia crosnieri* (Crustacea: Decapoda: Anomura): a novel arrangement and incomplete tRNA suite. *BMC Genomics* **9**:257.
- Yen JH & Barr AR (1973) The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *J Invertebr Pathol* **22**(2):242-250.
- Yokobori S & Pääbo S (1995a) tRNA editing in metazoans. *Nature* **377**(6549):490.
- Yokobori S & Pääbo S (1995b) Transfer RNA editing in land snail mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22):10432-10435.
- Yokobori S & Pääbo S (1997) Polyadenylation creates the discriminator nucleotide of chicken mitochondrial tRNA(Tyr). *J Mol Biol* **265**(2):95-99.
- Zhang DX, Szymura JM & Hewitt GM (1995) Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *J Mol Evol* **40**(4):382-391.
- Zhang DX & Hewitt GM (1997) Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem. Syst. Ecol.* **25**(2):99-120.
- Zhao X, Li N, Guo W, Hu X, Liu Z, Gong G, Wang A, Feng J & Wu C (2004) Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity* **93**(4):399-403.
- Zimmer M (2002) Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary-ecological approach. *Biol Rev Camb Philos Soc* **77**(4):455-493.
- Zouros E (2000) The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae. *Genes Genet Syst* **75**(6):313-318.

## X. Annexes

### *Table des annexes :*

<b>Annexe 1 : Protocole d'extraction d'ADN total</b>	<b>169</b>
<b>Annexe 2 : Protocole d'extraction d'ADNmt (Lyse Alcaline)</b>	<b>170</b>
<b>Annexe 3 : Protocole de Southern blot</b>	<b>171</b>
<b>Annexe 4 : Programmes PCR et séquences des amorces utilisées</b>	<b>172</b>
<b>Annexe 5 : Séquences des amorces utilisées pour les RT-PCR sur les ARNt d'<i>A. vulgare</i></b>	<b>173</b>
<b>Annexe 6 : Protocole de séquençage Big Dye Terminator</b>	<b>174</b>
<b>Annexe 7 : Code génétique mitochondrial des Arthropodes</b>	<b>175</b>
<b>Annexe 8 : Structures secondaires des ARNt<sup>Pro</sup> et ARNt<sup>Ala/Val</sup> d'<i>A. vulgare</i> identifiés par ARWEN</b>	<b>176</b>
<b>Annexe 9 : Séquences des ARNt potentiels identifiés à vue sur la séquence mitochondrial d'<i>A. vulgare</i></b>	<b>177</b>
<b>Annexe 10 : GC-skews des gènes mitochondriaux d'<i>A. vulgare</i>, <i>L. oceanica</i> et <i>I. baltica</i></b>	<b>178</b>
<b>Annexe 11 : Chromatogrammes et digestions enzymatique de l'hétéroplasmie des Oniscidea</b>	<b>179</b>
<b>Annexe 12 : Code génétique mitochondrial de <i>L. oceanica</i> et <i>I. baltica</i></b>	<b>184</b>
<b>Annexe 13 : Utilisation des codons dans le génome mitochondrial d'<i>A. vulgare</i></b>	<b>185</b>
<b>Annexe 14 : Comparaison des ARNt<sup>Ala</sup> mitochondriaux d'<i>A. vulgare</i> et de <i>L. oceanica</i></b>	<b>186</b>
<b>Annexe 15 : Phylogénie des Isopodes proposée par Wilson (2009)</b>	<b>187</b>
<b>Annexe 16 : Différentes phylogénies des Péracarides</b>	<b>188</b>

---

## Annexe 1 : Protocole d'extraction d'ADN total

1. Nettoyer les animaux dans un bain de Javel 3%, puis les rincer 2 à 3 fois à l'eau déminéralisée, les déposer dans une boîte (avec papier absorbant humide).
2. Préparer des tubes Eppendorfs avec 5µL de protéinase K + 400µL de tampon Wilson.

### Composition du tampon Wilson :

- Tris	100 mM
- EDTA	10 mM
- NaCl	100 mM
- SDS	0,1%
- Dithiothréitol	50 mM
- pH = 8	

3. Dissection : récupérer les tissus dans les tubes déposés dans la glace ; broyer à l'aide d'un pilon.

### **4. Incuber au bain-marie à 37°C pendant 4h.**

5. Ajouter ½ volume de Phénol (200µL) et ½ volume de Chloroforme isoamyle (200µL), agiter.
6. Centrifuger à 12000 rpm pendant 8 minutes à 15°C.
7. Récupérer le surnageant.

### **8. Répéter les étapes 5 à 7**

9. Ajouter 1 volume de Chloroforme isoamyle (400µL), bien agiter,
10. Centrifuger à 12000 rpm pendant 8 minutes à 15°C
11. Récupérer le surnageant.
12. Précipiter en ajoutant de l'Acétate de Na 3M pH 7 : 1/10 de volume (40µL) et 1 volume d'isopropanol (400µL), bien agiter.

### **13. Laisser une nuit à -20°C**

14. Centrifuger à 15000 rpm pendant 30 minutes à 4°C
15. Vider le tube (l'ADN est culotté)
16. Rincer deux fois avec 500µL d'éthanol 70%, centrifuger si le culot est décollé, vider
17. Laisser sécher sous la hotte (environ 30 minutes)
18. Ajouter 100µL d'eau stérile

### **19. Ranger à 4°C.**



## Annexe 3 : Protocole de Southern blot

### 1. Préhybridation de la membrane

- Réhydrater la membrane dans une solution 2 mM EDTA, 0,1% SDS (filtrée à 0,2  $\mu$ M) ;
- Après réhydratation, pré-hybrider la membrane 2 heures à 42°C avec un tampon d'hybridation + 400  $\mu$ l de ssDNA (4mg/ml) fraîchement dénaturé (5 min. à 95°C puis 5 min. dans la glace).

Composition du tampon d'hybridation :

- |   |   |                             |
|---|---|-----------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- 40 g de Dextran Sulfate</li> <li>- 4 ml de ssDNA (2mg/ml)</li> <li>- 160 ml de Formamide Désionisé</li> <li>- 80 ml de SSC 20X</li> <li>- 4 ml de Tris 2M (pH 7,4)</li> <li>- 4 ml de Denhardt's 100X</li> <li>- 150 ml d'eau bidistillée</li> </ul> | } | filtré au papier Whatman #1 |
|---|---|-----------------------------|

### 2. Préparation de la sonde

- Diluer ~100 ng de produits de PCR dans un volume finale de 22,5  $\mu$ l, puis dénaturer ce produit 5 min. à 95°C, puis 5 min. dans la glace ;
- Ajouter ensuite sur glace :
  - 5  $\mu$ l de solution 1 (4mg/ml BSA + 30 OD/ml Random hexamères)
  - 20  $\mu$ l de solution 2 (0,5 M HEPES pH 6,6 + 12 mM MgCl<sub>2</sub> + 25 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol + 12 mM Tris pH8 + 1  $\mu$ l de chaque dNTP 100 mM ; H<sub>2</sub>O qsp 1 ml)
  - 2  $\mu$ l d'élément radioactif [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP
  - 0,8  $\mu$ l de Klenow Polymerase (9U/ $\mu$ l)
- Incuber une heure à 37°C ;
- Arrêter la réaction avec 20  $\mu$ l d'EDTA 0,5 M et 130  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O ;
- Dénaturer la sonde marquée 5 min. à 95°C puis 5 min. dans la glace ;

### 3. Hybridation de l'ADN avec la sonde

- Remplacer le tampon de pré-hybridation par le tampon d'hybridation (même composition que précédemment) avec 400  $\mu$ l de ssDNA (4mg/ml) fraîchement dénaturé et la sonde, pour une incubation de 16 heures à 42°C ;

### 4. Lavages de la membrane

- Après avoir enlevé le tampon d'hybridation, faire 2 bains de 2X SSC, 0,1% SDS, de 30 min. à température ambiante ;
- Puis faire 2 bains de 0,1X SSC, 0,1% SDS, de 30 min. à 52°C ;

## Annexe 4 : Programmes PCR et séquences des amorces utilisées

### Protocole d'amplification par PCR de la région non-codante de l'ADNmt d'A. vulgare :

Programme de PCR :

- 3 min.	95°C	} 30x
- 30 sec.	95°C	
- 1 min. 30	54°C	
- 1 min. 30	72°C	
- 5 min.	72°C	

Amorces :

CytbVD : CTACCTTGAGGTCAAATATC (située du côté du gène *Cytb*)

VD1 : GAGATAAGTCGTAACAAAGTAG (située du côté du gène *12SARNr*)

### Protocole d'amplification par PCR pour l'étude de la synténie :

Programme de PCR :

- 3 min.	95°C	} 30x
- 30 sec.	95°C	
- 1 min. 30	50-55°C	
- 1 min. 30	72°C	
- 5 min.	72°C	

Amorces comprises dans les gènes *16SARNr* et *Cox1* :

IIIF : TTATGCTACCTTAGCACAGT

IIIR : TAAATCTGATCATCTCCAAT

Amorces comprises dans les gènes *Cox3* et *12SARNr* :

IVF : CCMCTATTAATACTGCWAT (M = bases A ou C ; W = bases A ou T)

IVR : GAGAGTGACGGGCGATATGT

Amorces comprises dans les gènes *Nad5* et *Nad4* :

IIIF : CTATAACTAARAGRGCTCA (R = bases A ou G)

IIIR : GCTAATATAKCTTATGAACG (K = bases T ou G)

### Protocole d'amplification par PCR pour tester la présence de *Wolbachia* par le gène *wsp* :

Programme de PCR :

- 2 min.	95°C	} 35x
- 1 min.	95°C	
- 1 min.	55°C	
- 1 min.	72°C	
- 5 min.	72°C	

Amorces :

81F : TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC

691R : AAAAATTAAACGCTACTCCA

## Annexe 5 : Séquences des amorces utilisées pour les RT-PCR sur les ARNt d'*A. vulgare*

**Tableau A5.** Séquences des amorces utilisées pour les RT-PCR des gènes d'ARNt d'*A. vulgare*.

Nom des amorces	Séquences
AVd	TAACAATTTAGTTTATAAAAAAC
AVc	ATAATTTCTATTTCTAGAG
Cd	AGGTTTATAGTTCTT
Cc	GTTTTTGCAATAATTGCTTGC
Fd	AATAATAAAGTTTTTAG
Fc	CCTAATATATTAGGAGATCCTGA
Hd	TATAATTTATAAATAAAATATTAAG
Hc	ATTAAGGAGAGAACCTAT
Kd	ATCTCTGAGCGATACTCTGT
Kc	AACCACTCTAAGGAAGATCT
L1d	TTTTCTAAAAAATATTAAG
L1c	AAATGTTTTGAAAACATTTG
L2d	AGCAGCAGAATGAGTGCG
L2c	TCATGCTATAATTTACTCCC
M1d	AAATAAGCTAAATTAAGCTG
M1c	AAATCAATTGAATATCAATG
M3d	ATAGAAAATTTTCGAGG
M3c	CCTTAATACGAATATAAAAAAC
Nd	ATTAAAATAAATATTATTA AAAAG
Nc	TTTTATAACATTTGTAATTGT
Pd	CAAAAATTAGTTTAATTA AAAAC
Pc	TACAAAAGTAAATTTTAG
Qd	GTATAGTGTATATTCACG
Qc	ATATAAGGTATAGATAAGTA
S2d	TGAGCAATAGCTAAAAAAGT
S2c	TTAAGTTATAAAACCTTATC
Td	TAATTATTATAATTTTTTTATTAATC
Tc	TCAGGATCTCCTAATATATTAGG
Wd	TAAAGCTTAAGTAAATAAC
Wc	CACTACTAGGGAGGAAATTC
Yd	GCATTATATAAGCTTTAAGCGG
Yc	TGCAGTTTTAAGAACTATAAACC



## Annexe 6 : Protocole de séquençage Big Dye Terminator

### Pour une séquence (1/16 ème de réaction) :

- 0.5 µl de Mix BDT
- 0.32 µl de Primer à 10 µM
- 8.18 µl H<sub>2</sub>O
- 3 µl de tampon BDT 5X
- 3 µl de matrice d'ADN (après purification)

### Programme de PCR :

- 30 sec.	96°C	
- 45 sec.	96°C	} 25x
- 30 sec.	55°C	
- 4 min.	60°C	

### Préparation des échantillons pour le séquençage :

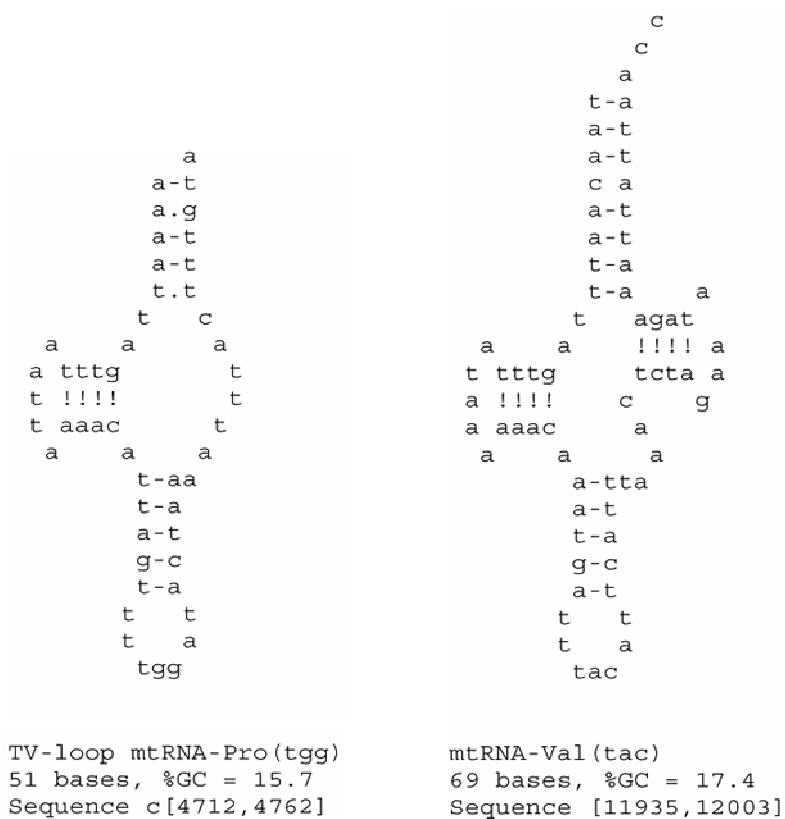
- Purification des échantillons :
  - 15 µl de produits de réaction d'amplification
  - + 10 µl d'eau stérile
  - + 2,2 µl d'Acétate de Na à 3M (pH=5,2)
  - + 50 µl d'EtOH 100% (température ambiante)
 Homogénéiser puis laisser précipiter pendant 20 min. à température ambiante.
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 20 minutes (température ambiante).
- Eliminer le surnageant à la pipette. Puis rincer avec 90µL d'EtOH 70%. Centrifuger à 14 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant, puis laisser sécher sous la hotte (30 minutes environ).
- Reprendre le culot dans 15 µL de formamide désionisée. Laisser le culot se reprendre 30 minutes à température ambiante.
- Vortexer
- Dénaturer 3 minutes à 95°C puis placer le tube dans la glace.

## Annexe 7 : Code génétique mitochondrial des Arthropodes

**Tableau A7** : Code génétique mitochondrial du genre *Drosophila* (de Bruijn 1983; Clary & Wolstenholme 1985), supposé être le même pour *A. vulgare* (cf. figure IV-1, page 61).

	U		C		A		G		
U	UUU	Phénylalanine Phe (F)	UCU	Sérine Ser-1 (S <sub>1</sub> )	UAU	Tyrosine Tyr (Y)	UGU	Cystéine Cys (C)	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leucine Leu-1 (L <sub>1</sub> )	UCA		UAA	Stop	UGA	Tryptophane Trp (W)	A
	UUG		UCG		UAG		UGG		G
C	CUU	Leucine Leu-2 (L <sub>2</sub> )	CCU	Proline Pro (P)	CAU	Histidine His (H)	CGU	Arginine Arg (R)	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Glutamine Gln (Q)	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Isoleucine Ile (I)	ACU	Thréonine Thr (T)	AAU	Asparagine Asn (N)	AGU	Sérine Ser-2 (S <sub>2</sub> )	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA	Méthionine Met (M)	ACA		AAA	Lysine Lys (K)	AGA		A
	AUG		ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Valine Val (V)	GCU	Alanine Ala (A)	GAU	Acide aspartique Asp (D)	GGU	Glycine Gly (G)	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Acide glutamique Glu (E)	GGC		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

## Annexe 8 : Structures secondaires des ARNt<sup>Pro</sup> et ARNt<sup>Ala/Val</sup> d'*A. vulgare* identifiés par ARWEN



**Figure A8** : Structures secondaires de l'ARNt<sup>Pro</sup> (à gauche) et de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup> (à droite) obtenues via le programme ARWEN (Laslett & Canbäck 2008).

## Annexe 9 : Séquences des ARNt potentiels identifiés à vue sur la séquence mitochondrial d'*A. vulgare*

**Tableau A9** : Séquences des ARNt potentiels repérés par inspection visuelle du génome mitochondrial d'*A. vulgare*.

ARNt	Séquence ( <b>anticodon</b> )
ARNt <sup>Phe(GAA)</sup>	AATAATAAAGTTTTTTAGAATATAATATT <b>GAAG</b> CTATTAAGGAGAGAACCTATTTTAAGACCA
ARNt <sup>Leu-2(UAG)</sup>	ATAAGCAGCAGAATGAGTGCGAAGGAGT <b>TAGG</b> TCCTTATATGGGAGTAAATTATAGCATGATGAAAT
ARNt <sup>Met-1(CAU)</sup>	GGCAAAATAAGCTAAATTAAGCTGGTGGGTT <b>CAT</b> ACCTCATTGATATTCAATTGATTTATATTTAA
ARNt <sup>Asn(AUU)</sup>	ATTAAATAAATATTATTAAAAAGAA <b>TTA</b> ATTTTAAAAACAATTACAAATGTTATAAAAT
ARNt <sup>Gln(UUG)</sup>	AATTGTATAGTGATATTCACGTAAGATTT <b>TTG</b> AGCCTTAAAATACTTATCTATACCTTATATAAAAT
ARNt <sup>Met-2(UAU)</sup>	ACGTAAGGATTTTAAAGTATTAATTTTTTT <b>TAT</b> AAAAAAATATTAAGTTATAAAACCTTATCAAAATGTT

## Annexe 10 : GC-skews des gènes mitochondriaux d'*A. vulgare*, *L. oceanica* et *I. baltica*

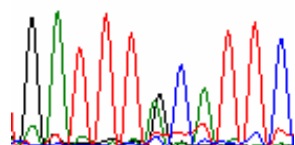
**Tableau A10** : Valeurs de GC-skews calculées pour l'ensemble des gènes du génome mitochondrial d'*Armadillidium vulgare* et comparées à celles des gènes mitochondriaux de *Ligia oceanica* et d'*Idotea baltica* (d'après Kilpert & Podsiadlowski 2006). Les gènes encodés sur le brin (-) sont montrés en gras. n.d. correspond aux valeurs non déterminées, quand les gènes ne sont pas complets et non définis entièrement.

Gène (brin)	GC skew		
	<i>A. vulgare</i>	<i>L. oceanica</i>	<i>I. baltica</i>
<i>12S ARNr</i> (+)	n.d.	0,062	0,098
<b><i>Nad1</i> (-)</b>	<b>0,000</b>	<b>0,020</b>	<b>-0,090</b>
<i>Nad3</i> (+)	0,345	0,161	0,320
<i>Cox3</i> (+)	0,063	0,048	0,029
<i>Atp6</i> (+)	0,200	0,038	0,012
<i>Atp8</i> (+)	0,238	0,000	0,100
<i>Cox2</i> (+)	0,128	0,111	0,169
<i>Cox1</i> (+)	0,112	0,083	0,122
<i>Nad2</i> (+)	0,350	0,226	0,299
<b><i>16S ARNr</i> (-)</b>	<b>0,012</b>	<b>-0,065</b>	<b>-0,103</b>
<i>Nad6</i> (+)	0,482	0,303	0,240
<b><i>Nad4L</i> (-)</b>	<b>-0,129</b>	<b>-0,118</b>	<b>-0,204</b>
<b><i>Nad4</i> (-)</b>	<b>-0,190</b>	<b>-0,235</b>	<b>-0,247</b>
<i>Nad5</i> (+)	0,420	0,335	0,246
<b><i>Cytb</i> (-)</b>	<b>-0,247</b>	<b>-0,235</b>	<b>-0,212</b>
RC	n.d.	-0,043	n.d.
Total (+)	0,180	0,136	n.d.

## Annexe 11 : Chromatogrammes et digestions enzymatique de l'hétéroplasmie des Oniscidea

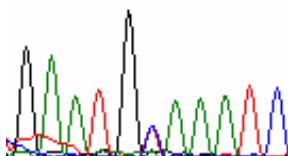
*Armadillidium assimile* (Armadillidiidae) de Corte, France : Alanine/Valine

'GATTTGCATTC.

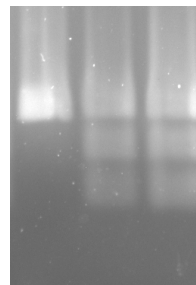


Forward

GAAATGCAAATC



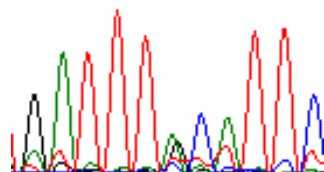
Reverse



Digestion HpyCH4 V

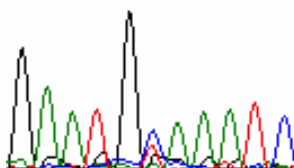
*Armadadillidium depressum* (Armadillidiidae) de France: Alanine/Valine

'GATTTACATTC

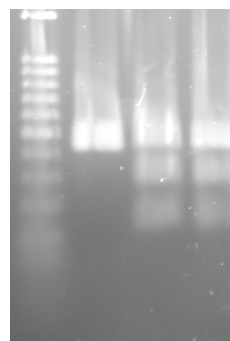


Forward

GAAATGCAAATC



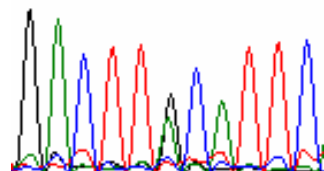
Reverse



Digestion HpyCH4 V

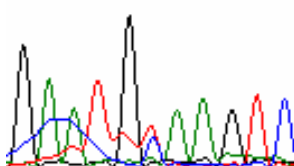
*Armadillidium nasatum* (Armadillidiidae) de Mignaloux, France : Alanine/Valine

GACTTGCATTC.

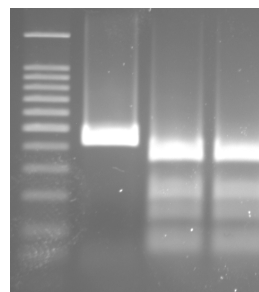


Forward

GAAATGCAAGTC



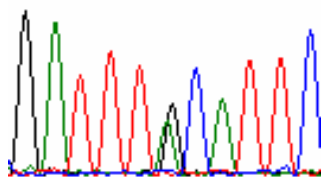
Reverse



Digestion HpyCH4 V

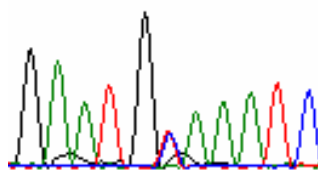
*Armadillo officinalis* (Armadillidae) de Tunis, Tunisie : Alanine/Valine

GATTTGCATTC



Forward

GAATGTAATC

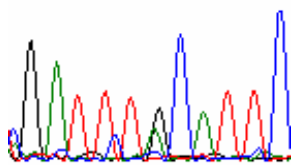


Reverse

Pas de digestions

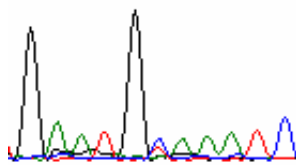
*Balloniscus sellowii* (Balloniscidae) de Porto Alegre, Brésil : Alanine/Valine

GATTTGCATTC

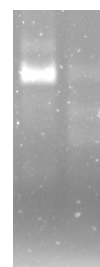


Forward

GAATGCAAATC



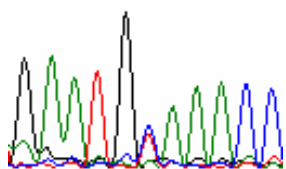
Reverse



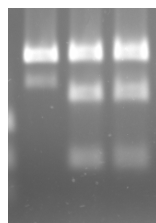
Digestion HpyCH4 V

*Cylisticus convexus* (Cylisticidae) d'Avanton, France : Alanine/Valine

GAATGCAAACC



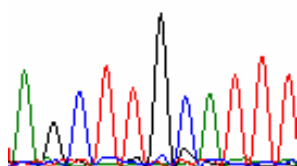
Reverse



Digestion HpyCH4 V

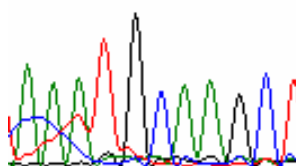
*Chaetophiloscia elongata* (Philosciidae) de Celles sur Belle : Alanine

AGCTTGCATTT

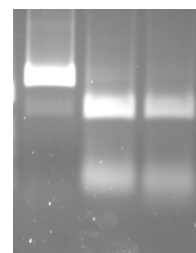


Forward

AAATGCAAGCT



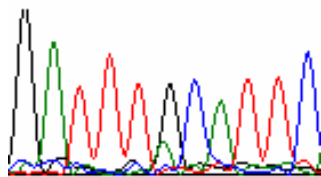
Reverse



Digestion HpyCH4 V

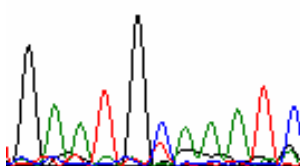
*Cubaris murina* (Armadillidae) de Guadeloupe : Alanine/Valine

GATTTGCATTC

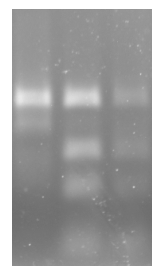


Forward

GAATGCAAATC



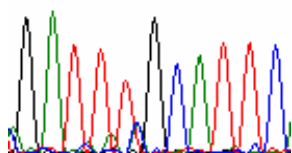
Reverse



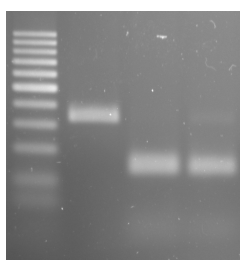
Digestion HpyCH4 V

*Dynamene bidentata* (Sphaeromatidae) de La Rochelle : Alanine

GATTTGCATTC



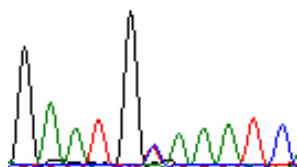
Reverse



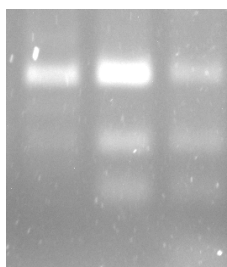
Digestion HpyCH4 V

*Helleria brevicornis* (Tylidae) de Bastia, France : Alanine/Valine

GAATGCAAATC



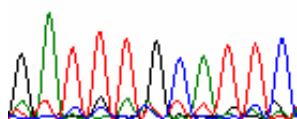
Reverse



Digestion HpyCH4 V

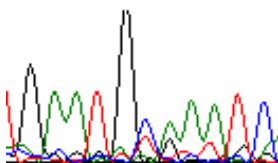
*Hemilepistus reaumuri* (Agnaridae) de Oufsa, Tunisie : Alanine/Valine

GATTTGCATTC

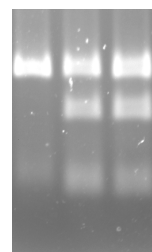


Forward

'GAATGCAAATC



Reverse

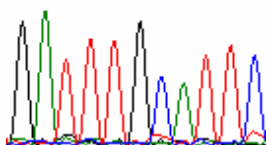


Digestion HpyCH4 V



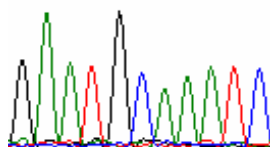
*Ligia oceanica* (Ligiidae) de La Rochelle, France : Alanine

GATTTGCATTC

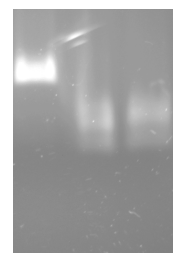


Forward

GAATGCAAATC



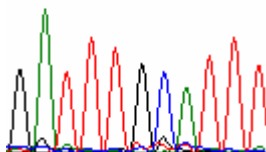
Reverse



Digestion HpyCH4 V

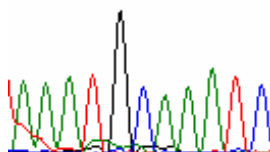
*Philoscia muscorum* (Philosciidae) de Moulières, France : Alanine

GATTTGCATTT

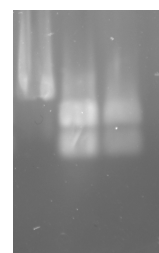


Forward

'AAATGCAAATC



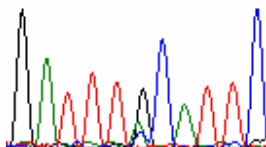
Reverse



Digestion HpyCH4 V

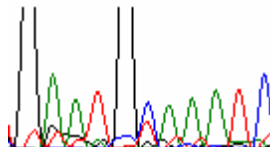
*Platyarthus caudatus* (Platyarthridae) de Sicile, Italie : Alanine/Valine

GATTTGCATTC



Forward

GAATGCAAATC

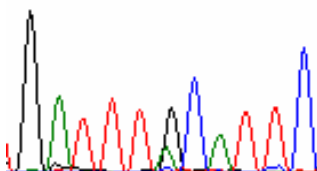


Reverse

Pas de digestion

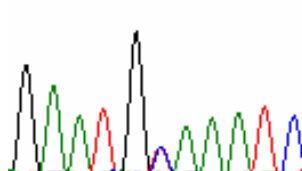
*Platyarthus hoffmanseggii* (Platyarthridae) de Poitou-Charentes, France : Alanine/Valine

'GATTTACATTC



Forward

GAATGTAAATC

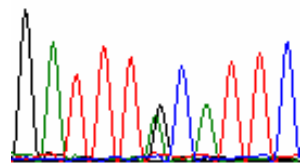


Reverse

Pas de digestion

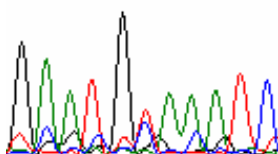
*Porcellio gallicus* (Porcellionidae) de Montpellier, France : Alanine/Valine

GATTTACATTC

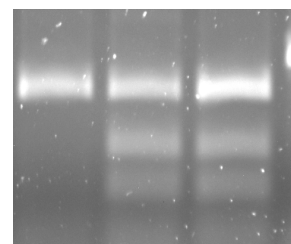


Forward

GAATGTAAATC



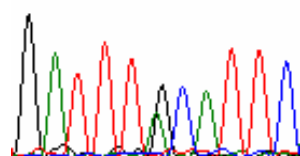
Reverse



Digestion HpyCH4 V

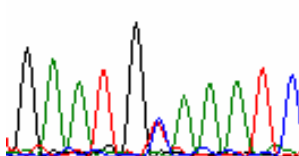
*Porcellio spinicornis* (Porcellionidae) de Poitou-Charentes, France : Alanine/Valine

GATTTACATTC

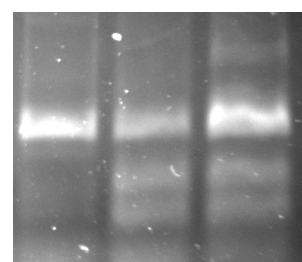


Forward

GAATGCAAATC



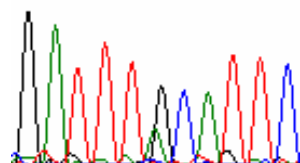
Reverse



Digestion HpyCH4 V

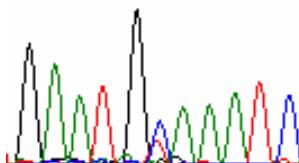
*Trichoniscus pusillus pusillus* (Trichoniscidae) de Poitou-Charentes, France : Alanine/Valine

GATTTGCATTC



Forward

GAATGCAAATC

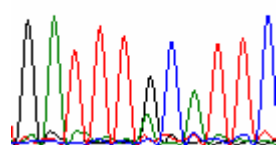


Reverse

Pas de digestion

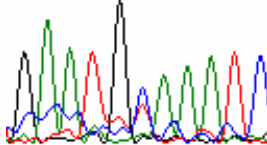
*Trachelipus rathkii* (Trachelipodidae) de Cosnes sur Loire, France : Alanine/Valine

GATTTGCATTC

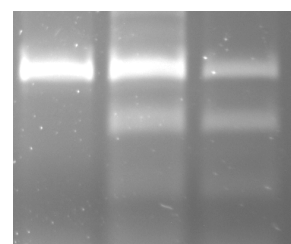


Forward

GAATGCAAATC



Reverse



Digestion HpyCH4 V

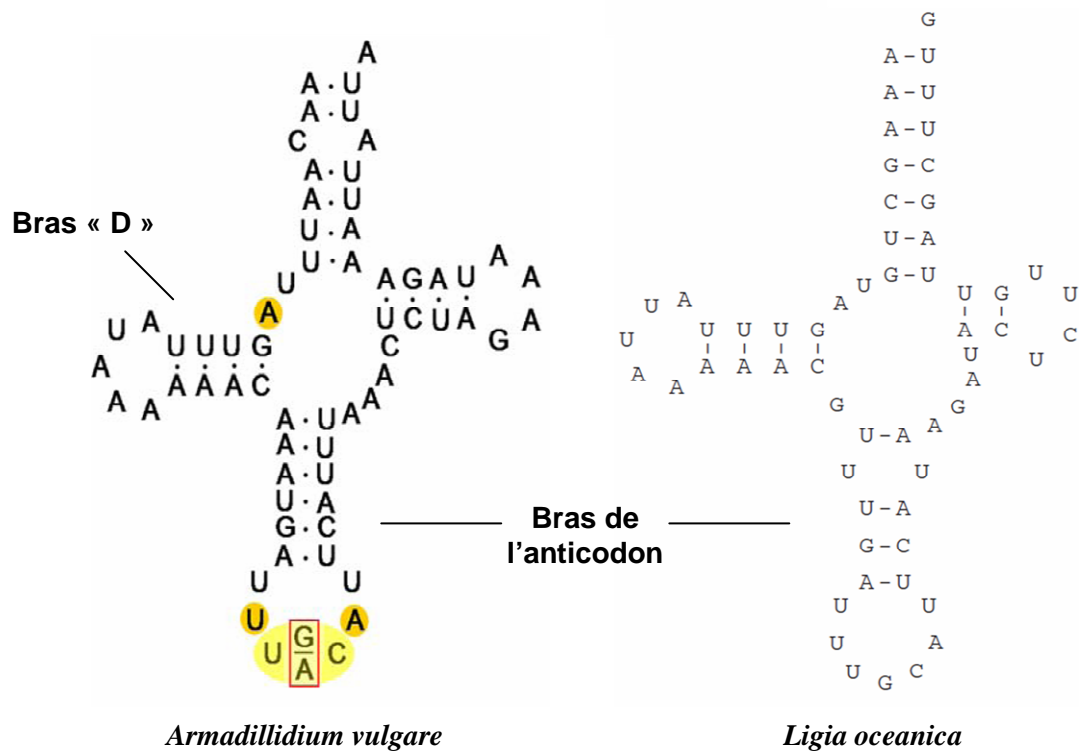


## Annexe 13 : Utilisation des codons dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*

**Tableau A13** : utilisation des codons dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*, obtenu avec le programme GenDecoder (Abascal *et al.* 2006b). Le second nombre entre parenthèses désigne le nombre de fois où le codon est présent dans le génome. Le premier nombre entre parenthèses est le nombre de codon pris en compte dans l'analyse. Les lettres présentes en face correspondent aux acides aminés associés aux codons, et leur probabilité associés dans le génome mitochondrial d'*A. vulgare*. La flèche orange pointe le codon GTA (Valine), utilisé 118 fois dans le génome, et le codon GCA (Alanine), utilisé 51 fois.

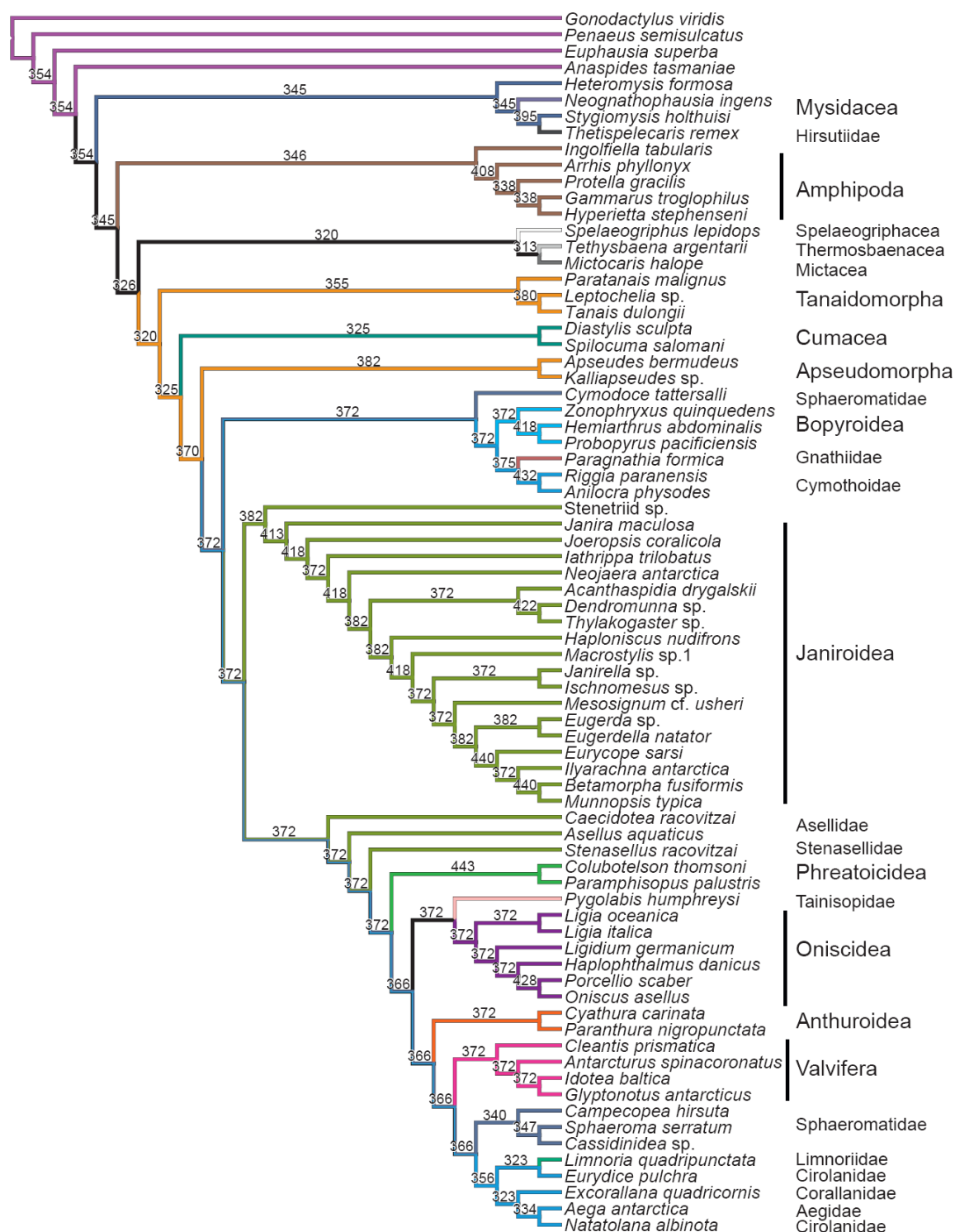
----- Count of codons and amino acid frequencies -----			
Number of codons: 64			
<a href="#">TTA</a> (160 / 355):	L: 0.64	I: 0.08 F: 0.07 M: 0.05 V: 0.05 Y: 0.03	
<a href="#">TTT</a> (144 / 287):	F: 0.70	L: 0.13 Y: 0.05 I: 0.03	
<a href="#">ATT</a> (99 / 247):	I: 0.53	L: 0.22 V: 0.15 F: 0.03	
<a href="#">ATA</a> (71 / 246):	M: 0.54	L: 0.24 I: 0.06 F: 0.04 V: 0.03	
<a href="#">GCT</a> (66 / 97):	A: 0.64	S: 0.11 G: 0.09 L: 0.05 T: 0.03	
<a href="#">CCT</a> (63 / 85):	P: 0.86	L: 0.04 S: 0.02	
<a href="#">GGA</a> (62 / 84):	G: 0.86	A: 0.04	
<a href="#">TAT</a> (60 / 112):	Y: 0.73	F: 0.10 I: 0.05 L: 0.03	
<a href="#">TCT</a> (57 / 117):	S: 0.62	T: 0.10 A: 0.10 L: 0.04 G: 0.04	
<a href="#">CTT</a> (53 / 92):	L: 0.68	I: 0.11 F: 0.06 M: 0.06	
<a href="#">GTA</a> (50 / 118):	V: 0.63	I: 0.17 L: 0.08 M: 0.02	←
<a href="#">TGA</a> (49 / 76):	W: 0.86	L: 0.03 I: 0.02	
<a href="#">CAT</a> (47 / 55):	H: 0.81	R: 0.04 D: 0.02 Q: 0.02 K: 0.02	
<a href="#">GAT</a> (42 / 70):	D: 0.91		
<a href="#">AAT</a> (41 / 128):	N: 0.69	S: 0.06 G: 0.03 E: 0.03 V: 0.02 D: 0.02 P: 0.02 Y: 0.02 M: 0.02	
<a href="#">GGG</a> (40 / 62):	G: 0.87	S: 0.04	
<a href="#">CTA</a> (40 / 78):	L: 0.68	I: 0.13 F: 0.06 V: 0.04	
<a href="#">GTT</a> (39 / 107):	V: 0.50	I: 0.18 L: 0.12 A: 0.05 M: 0.04 Y: 0.03	
<a href="#">ACT</a> (38 / 76):	T: 0.66	S: 0.11 A: 0.05 V: 0.03 I: 0.03 W: 0.02	
<a href="#">AAA</a> (37 / 105):	K: 0.77	N: 0.04 V: 0.03 W: 0.03 Q: 0.02 F: 0.02	
<a href="#">GGT</a> (35 / 56):	G: 0.80	A: 0.07 S: 0.04	
<a href="#">GAA</a> (33 / 51):	E: 0.83	D: 0.05 Q: 0.03	
<a href="#">TCA</a> (31 / 55):	S: 0.62	T: 0.14 A: 0.11 H: 0.04	
<a href="#">GCA</a> (30 / 51):	A: 0.66	S: 0.13 G: 0.07 V: 0.04	←
<a href="#">ACA</a> (29 / 46):	T: 0.69	V: 0.06 S: 0.06 I: 0.06 L: 0.03	
<a href="#">CCA</a> (26 / 28):	P: 0.81	H: 0.04 A: 0.04 G: 0.03	
<a href="#">AGA</a> (24 / 96):	S: 0.56	A: 0.14 G: 0.07 T: 0.06 D: 0.04 Q: 0.03	
<a href="#">ATC</a> (24 / 40):	I: 0.39	V: 0.23 L: 0.20 M: 0.05 S: 0.04	
<a href="#">TTC</a> (23 / 45):	F: 0.64	S: 0.13 L: 0.07 Y: 0.05 R: 0.03	
<a href="#">CAA</a> (22 / 47):	Q: 0.80	H: 0.04 R: 0.03 K: 0.03	
<a href="#">CGA</a> (21 / 22):	R: 0.86	K: 0.04	
<a href="#">TGG</a> (20 / 34):	W: 0.74	Y: 0.07 F: 0.07 G: 0.05	
<a href="#">GAG</a> (19 / 37):	E: 0.82	D: 0.05 G: 0.05	
<a href="#">TTG</a> (18 / 38):	L: 0.63	F: 0.13 I: 0.10 V: 0.04	
<a href="#">AGT</a> (17 / 49):	S: 0.31	A: 0.16 G: 0.13 V: 0.13 T: 0.07 N: 0.06 L: 0.04	
<a href="#">GTG</a> (17 / 37):	V: 0.42	I: 0.19 L: 0.13 F: 0.07 C: 0.06 W: 0.06	
<a href="#">TAC</a> (17 / 25):	Y: 0.66	F: 0.18 H: 0.07	
<a href="#">AAC</a> (16 / 30):	N: 0.55	S: 0.07 E: 0.07 T: 0.06 Q: 0.06 V: 0.05 G: 0.04	
<a href="#">AGG</a> (14 / 51):	G: 0.41	S: 0.37 A: 0.11 N: 0.05	
<a href="#">CGT</a> (14 / 15):	R: 0.87	K: 0.03	
<a href="#">GCC</a> (12 / 21):	A: 0.61	S: 0.14 I: 0.06 F: 0.05 L: 0.05	
<a href="#">CAC</a> (11 / 19):	H: 0.97		
<a href="#">TCC</a> (11 / 20):	S: 0.65	P: 0.18 A: 0.07 N: 0.03	
<a href="#">CAG</a> (10 / 16):	Q: 0.73	A: 0.10 E: 0.06 H: 0.03	
<a href="#">GGC</a> (9 / 20):	G: 0.72	A: 0.15 S: 0.11	
<a href="#">TGT</a> (8 / 27):	C: 0.73	V: 0.12 S: 0.03 L: 0.03	
<a href="#">CCC</a> (8 / 12):	P: 0.93		
<a href="#">ACC</a> (7 / 18):	T: 0.55	A: 0.12 N: 0.10 S: 0.09 K: 0.03 V: 0.02	
<a href="#">CGG</a> (7 / 8):	R: 0.90		
<a href="#">TGC</a> (7 / 11):	A: 0.32	C: 0.26 S: 0.15 G: 0.14 M: 0.05	
<a href="#">GTC</a> (6 / 11):	V: 0.57	I: 0.18 G: 0.08 S: 0.07	
<a href="#">ATG</a> (6 / 25):	M: 0.32	L: 0.21 F: 0.17 I: 0.11 W: 0.07 V: 0.07	
<a href="#">AGC</a> (5 / 20):	S: 0.35	A: 0.32 V: 0.09 N: 0.08 I: 0.07	
<a href="#">CTC</a> (5 / 13):	L: 0.62	P: 0.16 I: 0.06 V: 0.06	
<a href="#">GCG</a> (4 / 7):	A: 0.75	S: 0.15	
<a href="#">CGC</a> (4 / 4):	R: 0.96		
<a href="#">GAC</a> (3 / 5):	D: 0.56	T: 0.33 S: 0.06	
<a href="#">ACG</a> (3 / 3):	T: 0.77	S: 0.23	
<a href="#">TCG</a> (3 / 5):	S: 0.53	L: 0.21 A: 0.10 M: 0.08	
<a href="#">CTG</a> (2 / 8):	L: 0.69	M: 0.11 I: 0.07 V: 0.07	
<a href="#">AAG</a> (2 / 15):	K: 0.98		
<a href="#">CCG</a> (1 / 6):	P: 0.93		
<a href="#">TAG</a> (0 / 0):			
<a href="#">TAA</a> (0 / 0):			

## Annexe 14 : Comparaison des ARNt<sup>Ala</sup> mitochondriaux d'*A. vulgare* et de *L. oceanica*



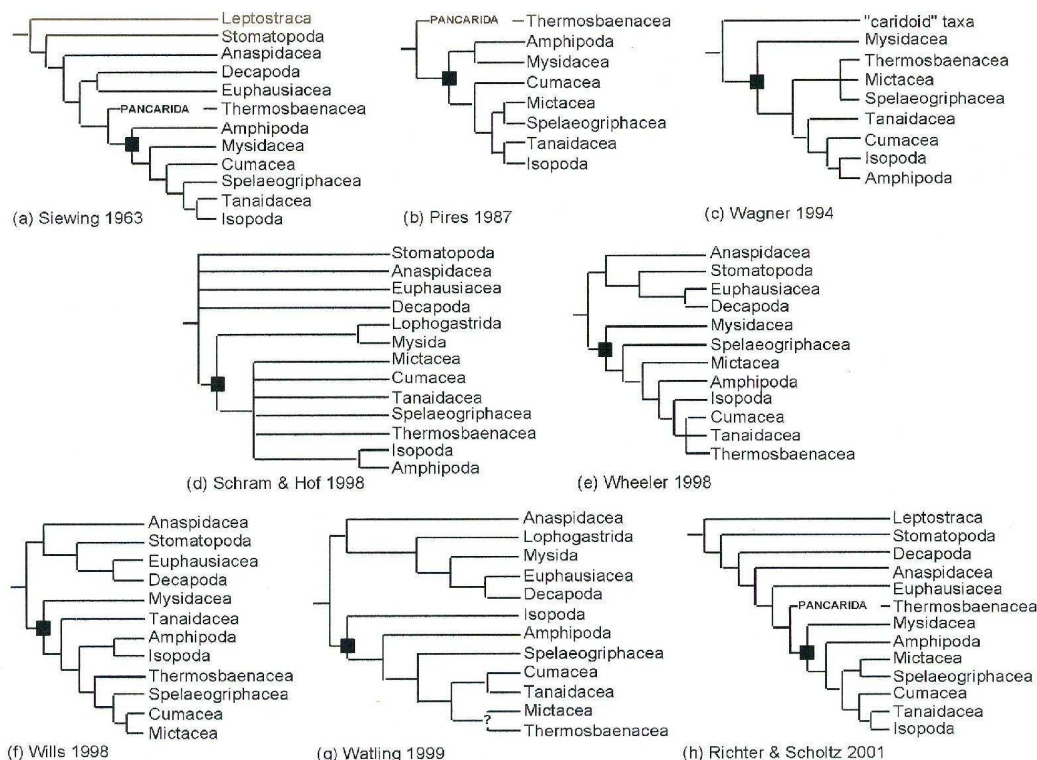
**Figure A14 :** Comparaison des ARNt<sup>Ala</sup> mitochondriaux d'*A. vulgare* (à gauche) et de *L. oceanica* (à droite). La composition nucléotidique de ces deux gènes est quasiment identique sur le bras « D » et la boucle de l'anticodon, ainsi que les trois paires de bases présentes en bas du bras de l'anticodon. Illustration de l'ARNt<sup>Ala</sup> de *L. oceanica* d'après Kilpert & Podsiadlowski (2006).

## Annexe 15 : Phylogénie des Isopodes proposée par Wilson (2009)

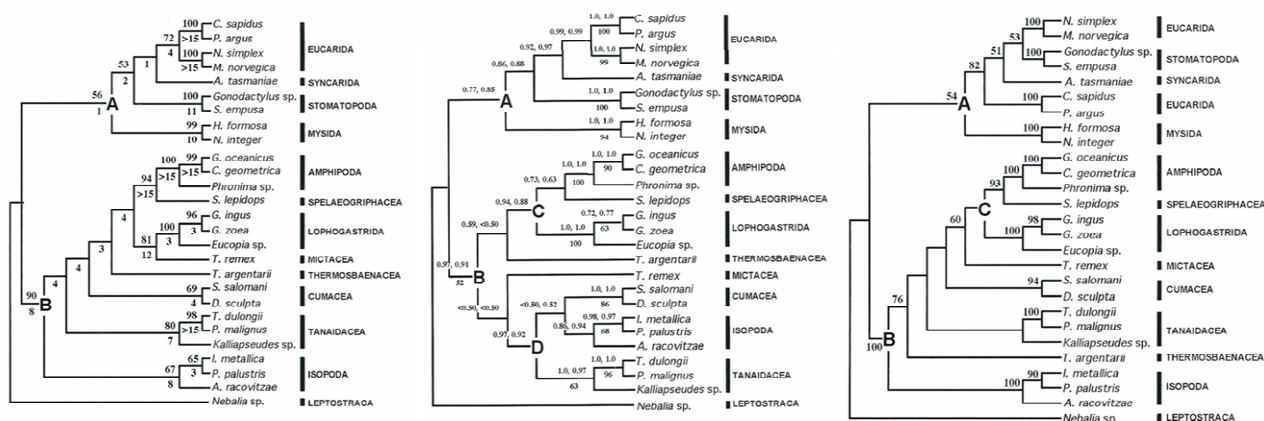


**Figure A15 :** Phylogénie des Isopodes obtenues par combinaison de données morphologiques et moléculaires (gènes nucléaire *18SARNr*), d'après Wilson (2009)

## Annexe 16 : Différentes phylogénies des Pércarides



**Figure A16.a :** Revue des études phylogénétiques des Pércarides basées sur des données morphologiques de (a) Siewing (1963), (b) Pires (1987), (c) Wagner (1994), (d) Schram & Hof (1998), (e) Wheeler (1998), (f) Wills (1998), (g) Watling (1999), (h) Richter & Scholtz (2001).



**Figure A16.b :** Analyses phylogénétiques des Pércarides basées sur des données moléculaires (gènes nucléaire 18S ADNr) effectuées par Spears *et al.* (2005).



## RESUME

L'ADN mitochondrial (ADNmt) des animaux est généralement constitué de molécules circulaires monomériques de ~16 kb. Cependant, parmi les rares exceptions qui ont été décrites, deux espèces d'Oniscidea *Armadillidium vulgare* et *Porcellionides pruinosus* (Crustacés Isopodes terrestres) présentent un ADNmt atypique composé de molécules monomériques linéaires de ~14 kb associées à des dimères circulaires et palindromiques de ~28 kb. Afin de connaître plus en détail sa structure, l'ADNmt atypique d'*A. vulgare* a été séquencé. Il contient bien les 13 gènes codants pour des protéines et les deux sous unités ribosomales généralement présents dans l'ADNmt des Métazoaires, mais en revanche il ne présente pas l'ensemble des 22 ARN de transferts (ARNt) attendus. De plus, une étonnante hétéroplasmie générant un ARNt alloaccepteur pour les acides aminés Alanine et Valine (ARNt<sup>Ala/Val</sup>) a été découverte. Cette hétéroplasmie est un exemple unique chez les Eucaryotes par la présence de deux gènes différents sur le même locus mitochondrial. De façon surprenante, cette hétéroplasmie a également été observée chez de nombreuses autres espèces d'Oniscidea qui possèdent aussi un génome mitochondrial atypique. Il semble donc que l'apparition de cet ADNmt atypique chez les Isopodes ait permis l'apparition de l'ARNt<sup>Ala/Val</sup>, et que les forces évolutives permettant le maintien de ces deux gènes essentiels à la traduction mitochondriale soient impliquées dans la conservation de cette structure atypique.

**Mots clefs :** ADN mitochondrial, hétéroplasmie, ARNt, Isopodes, Crustacés terrestres

## ABSTRACT

In animals, mitochondrial DNA (mtDNA) is generally composed of ~16 kb circular monomer molecules. However, two species of terrestrial Crustaceans *Armadillidium vulgare* and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda: Oniscidea) are exceptions. Their mtDNA is composed of ~14 kb linear monomers associated to ~28 kb circular head-to-head dimers. In order to describe its structure, the complete mtDNA sequence of *A. vulgare* has been obtained. It does contain the 13 protein coding genes and the 2 ribosomal sub-units generally found in metazoan mtDNA, but not all of the 22 expected transfer RNA (tRNAs). Besides, a surprising heteroplasmy that generates a dual tRNA alloacceptor for both amino acids Alanine and Valine (tRNA<sup>Ala/Val</sup>) has been discovered. This heteroplasmy by the presence of two different genes on a single mitochondrial locus is an unique example in eukaryotes. Interestingly, this heteroplasmy has been observed in a wide range of Oniscidea species carrying an atypical mtDNA. The appearance of the atypical mitochondrial genome in isopods may have permit the appearance of the tRNA<sup>Ala/Val</sup>, and evolutionary forces that allow the maintenance of these two genes essential for mitochondrial translation might conserve the atypical structure of mtDNA.

**Keywords:** mitochondrial DNA, heteroplasmy, tRNA, Isopoda, terrestrial crustaceans