

## BOUQUETINS DU BARGY ET INFECTION BRUCELLIQUE : QUE NOUS RÉVÈLE LA GÉNÉTIQUE ? \*

Quéméré Erwan<sup>1</sup>, Rossi Sophie<sup>2</sup>, Game Yvette<sup>3</sup>, Petit Élodie<sup>3</sup>, Galan Maxime<sup>4</sup>, Merlet Joël<sup>1</sup>,  
Toïgo Carole<sup>5</sup>, et Gilot-Fromont Emmanuelle<sup>6,7</sup>



### RÉSUMÉ

Pour comprendre les modalités d'infection d'une population naturelle par un agent pathogène et de transmission en son sein, il est nécessaire de connaître les caractéristiques génétiques et immunogénétiques de cette population. En effet, la diversité génétique est essentielle pour que les populations puissent s'adapter aux risques multi-parasitaires auxquels elles sont continuellement exposées. Or la diversité génétique d'une population est le reflet de son histoire démographique et évolutive. Lors de la réintroduction de bouquetins dans les Alpes, les populations ont subi plusieurs goulots d'étranglements successifs qui ont considérablement érodé leur variabilité génétique adaptative. Nous avons testé l'hypothèse que la sensibilité intrinsèque de la population de bouquetins (*Capra ibex*) du Bargy à la brucellose est liée à une forte consanguinité et une faible diversité génétique, notamment des gènes de l'immunité. Afin d'évaluer les risques de diffusion de l'agent pathogène, nous avons également mesuré les flux de gènes historiques et contemporains entre les différentes unités socio-spatiales du massif du Bargy et avec les populations des massifs alentours de Leschaux-Andey et des Aravis. Nos résultats suggèrent une très faible diversité génétique neutre et adaptative mais très comparable à celle observée dans un grand nombre de populations restaurées des Alpes et des populations sources. Par contre, sa taille efficace limitée ( $N_E \sim 50$  individus) présage une forte diminution de la diversité génétique à moyen terme en l'absence de renforcement/migration. Dans l'ensemble, les gènes de l'immunité étudiés sont très peu polymorphes, mais certains variants rares dans la population (du gène *SLC11A1* et dans une moindre mesure *Tlr1*) sont associés à une plus faible prévalence de brucellose, suggérant une résistance des animaux concernés. Enfin, les flux de gènes entre la population de Bargy et les populations voisines sont historiquement limités, mais nous avons détecté de nombreux mouvements contemporains entre Bargy et Aravis qui indiquent un risque de propagation de la maladie.

**Mot-clés :** *Brucella melitensis*, diversité génétique, immunogénétique, *SLC11A1*.

.../..

\* Texte de la conférence présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA, 30 mai 2018

<sup>1</sup> CEFS, INRA, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan Cedex F-31326, France

<sup>2</sup> ONCFS, Unité sanitaire de la faune, Gap, France

<sup>3</sup> Laboratoire départemental d'analyses vétérinaires de Savoie, Chambéry, France

<sup>4</sup> CBGP, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Univ. Montpellier, F-34988, Montpellier-sur-Lez Cedex, France

<sup>5</sup> ONCFS, Unité Faune de montagne, Gières, France

<sup>6</sup> Université de Lyon1, UMR CNRS 5558 Laboratoire de biométrie et biologie évolutive (LBBE), Villeurbanne, France

<sup>7</sup> Université de Lyon, VetAgro Sup - Campus vétérinaire de Lyon, Marcy l'Étoile, France

.../..

**ABSTRACT**

*To understand the mechanisms of a wild population's infection by a pathogen and how transmission works inside, we need knowledge on the genetic and immunogenetic background of this population. Indeed, genetic diversity is a prerequisite for population's adaptation to multi-pathogen pressures. The genetic diversity of a population is a reflection of his demographic history and his evolution. When alpine ibex (*Capra ibex*) has been reintroduced, populations had undergone several successive bottlenecks that considerably eroded their adaptive genetic variability. Here, we tested the hypothesis that intrinsic sensitivity to brucellosis of ibex in the Bargy Massif results from a particular high level of inbreeding and low genetic diversity, notably for immunity-related genes. To assess the risk of spreading pathogen/infection, we also evaluated the historic and contemporary gene flow between the different social-spatial units of the Bargy Massif and with the neighboring populations of Leschaux-Andey and Aravis. Our results suggested a low level of neutral and adaptive genetic diversity in Bargy Massif but very similar to levels observed in the source populations and many other recently reintroduced populations in the Alps. However, we observed a very small effective population size ( $N_E < 50$ ) that predict a strong decrease of the genetic diversity in the mid-term without migration/reinforcement. Overall, immunity-related genes showed a weak polymorphism but some rare variants (of the gene *SLC11A1* and to a lesser extent *Tlr1*) are associated with a lower rate of infection to Brucellosis, hence suggesting a better resistance of individuals carrying these variants. Lastly, gene flows between Bargy and the neighboring populations are historically limited, but we detected many recent movements (particularly between Bargy and Aravis) that indicate a risk of spreading disease.*

**Keywords:** *Brucella melitensis, Genetic diversity, Immuno-genetic, SLC11A1.*




---

**I - INTRODUCTION**


---

Pour comprendre les modalités d'infection et de transmission d'un agent pathogène au sein d'une population naturelle, il est nécessaire de connaître l'écologie, l'immunologie mais également les caractéristiques génétiques et immunogénétiques de cette population. En effet, il est désormais établi que la réceptivité des animaux aux maladies est en grande partie liée au polymorphisme d'un réseau de gènes avec des fonctions de reconnaissance de motifs antigéniques et/ou de régulation de la réponse immunitaire. L'exemple le plus connu est les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, HLA chez l'Homme), une des régions les plus variables du génome des vertébrés. Mais il existe de nombreux autres gènes, comme les gènes codant pour les récepteurs « Toll-Like », qui ont un rôle clef dans le déclenchement de la réponse innée lors du contact avec des microparasites [Acevedo-Whitehouse et Cunningham, 2006].

La diversité immunogénétique est essentielle pour que les populations puissent faire face aux risques

multi-parasitaires auxquels elles sont continuellement exposées dans des environnements façonnés par les activités humaines. La diversité génétique d'une population est le reflet de son histoire démographique et évolutive. Le bouquetin alpin (*Capra ibex*) est un succès incontestable de réintroduction : après une réduction drastique des effectifs liée à la surchasse au début du 19<sup>ème</sup> siècle (<100 individus), des programmes successifs de repeuplements des Alpes ont fait que la population totale actuelle dépasse les 50 000 individus. Néanmoins, cette histoire mouvementée, ponctuée de sévères goulots d'étranglement démographiques, a eu des conséquences génétiques toujours visibles au sein des populations actuelles : une très faible diversité génétique neutre et adaptative, un niveau élevé de consanguinité [Biebach et Keller, 2010 ; Grossen *et al.*, 2018] avec des conséquences au niveau individuel sur des traits liés à la survie ou le succès reproducteur comme la masse ou la charge parasitaire [Brambilla *et al.*, 2015].

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques génétiques et immunogénétiques de la population de bouquetins du Bargy. Cette population est issue de seulement quatorze individus lâchés entre 1974 et 1976 dans le cadre d'une action plus vaste de réintroduction du bouquetin sur différents massifs de Haute-Savoie dans les années 1970. Les bouquetins fondateurs étaient issus d'une réserve de chasse du Mont Pleureur en Suisse, elle-même issue de la Réserve royale du Grand paradis en Italie. Nous avons trois objectifs :

1. Tester l'hypothèse d'une sensibilité intrinsèque de la population du Bargy liée à une forte consanguinité et une faible diversité génétique,
2. Évaluer plus spécifiquement la diversité des gènes de l'immunité et les conséquences sur la sensibilité des individus à la Brucellose et
3. Estimer les flux de gènes entre les différentes unités sociales de bouquetins du Bargy et les populations des massifs alentours (ex : Leschaux-Andey, Aravis, Belledonne) afin de mesurer les risques de diffusion de la bactérie.

---

## II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

Dans le cadre de ce suivi génétique, nous avons étudié 226 bouquetins capturés entre 2012 et 2016 lors des opérations de lutte et de surveillance menées dans la chaîne principale du Bargy (N=136), Leschaux-Andey (N=30) et Aravis (N=59). L'ADN de ces individus a été extrait à partir de sang et génotypé à l'aide de 25 marqueurs microsatellites. Près de 50 % des génotypes ont été répliqués aléatoirement afin de contrôler la qualité du génotypage.

### OBJECTIF 1

Afin d'évaluer la diversité génétique de la population du Bargy, nous avons utilisé deux indices calculés avec le logiciel FSTAT [Goudet, 2001] : la richesse allélique moyenne (nombre moyen d'allèles par marqueur standardisé par la taille d'échantillon) (*sNA*) et l'hétérozygotie attendue (*H<sub>E</sub>*) (proportion attendue de génotypes hétérozygotes à l'équilibre de Hardy-Weinberg). Le niveau moyen de consanguinité dans la population *F* a été estimé à l'aide de la méthode de maximum de vraisemblance « *Triadic likelihood estimator* » (TrioML) [Wang, 2007] implémentée dans le logiciel COANCESTRY [Wang, 2011]. Enfin, nous avons calculé la taille efficace de la population (*N<sub>E</sub>*) avec la méthode de « déséquilibre de liaison » (« LD-*N<sub>E</sub>* ») [Hill, 1981] implémentée dans le logiciel LDNE [Waples et Do, 2010]. *N<sub>E</sub>* est ici estimée en mesurant le niveau de déséquilibre de liaison (association préférentielle d'allèles) généré par la force de dérive génétique. *N<sub>E</sub>* correspond au nombre d'individus dans une population idéale (au sens génétique du terme) qui transmet la diversité génétique à la génération suivante. Cela nous

renseigne sur la vitesse à laquelle la diversité génétique s'érode et la consanguinité s'accumule sous l'effet de la dérive génétique. Ces indices ont été comparés aux valeurs observées dans d'autres populations restaurées des Alpes (dont celles des Aravis), celle du Mont Pleureur dont sont originaires les individus fondateurs du Bargy et celle de Grand Paradis qui est la source originelle de l'ensemble des repeuplements.

### OBJECTIF 2

Nous avons étudié le polymorphisme de cinq gènes de l'immunité susceptibles de jouer un rôle important dans la réponse immunitaire à la brucellose : le gène DRB1 du Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), trois gènes codant pour des récepteurs « *Toll-like* » (*Tlr1*, *Tlr2* et *Tlr4*) et le gène SLC11A1 (solute carrier family 11 member A1). Ces gènes codent pour des récepteurs membranaires impliqués dans la reconnaissance des motifs antigéniques et le déclenchement de la réponse innée et/ou adaptative. Ces gènes ont des effets pléiotropiques et sont souvent très diversifiés car la sélection fluctuante (dans l'espace et dans le temps) exercée par les différents agents pathogènes du milieu (sélection dite « balancée ») ainsi que les mécanismes de mutation et de recombinaison favorisent le maintien et la régénération de leur polymorphisme [Schaschl *et al.*, 2006 ; Mona *et al.*, 2008 ; Quéméré *et al.*, 2015]. Cependant, lorsque la taille de la population est faible, ces forces ont un impact limité, contrairement à la dérive génétique qui peut éroder la diversité immunogénétique comme elle le fait pour la diversité génétique neutre [Ejsmond et

Radwan, 2011]. Nous avons évalué si la population du Bargy a maintenu un niveau de diversité immunogénétique (polymorphisme de ces cinq gènes) comparable à celui de la population de bouquetins de Grand Paradis (GP) qui est la population source de l'ensemble des programmes de repeuplements.

Pour le gène DRB1, nous avons séquencé l'exon 2 (région qui code pour le domaine de liaison aux antigènes) à l'aide d'un séquenceur MiSeq. Les haplotypes et génotypes individuels ont été identifiés à l'aide du logiciel SESAME barcode [Piry *et al.*, 2012]. Les gènes *Tlr1*, *Tlr2* et *Tlr4* ont été génotypés en deux étapes comme décrites dans Quéméré *et al.* [2015] :

1. Une étude pilote sur 30 individus du Bargy et de GP a été réalisée afin d'identifier les sites polymorphes (SNP) non synonymes et
2. Ces sites ont été génotypés pour l'ensemble des individus à l'aide de l'approche KASPar de Kbiosciences (Hoddesdon, UK).

Enfin pour le gène *SLC11A1*, nous avons typé un marqueur microsatellite présent dans un intron du gène [Vacca *et al.*, 2011] dont le polymorphisme est associé à la résistance à la brucellose chez le buffle [Capparelli *et al.*, 2007], chez la chèvre domestique [Lacoboni *et al.*, 2014].

Dans un second temps, nous avons évalué si certaines caractéristiques de ces gènes, comme la présence d'un allèle spécifique ou le fait ou pas de posséder deux variants différents (hétérozygotie/homozygotie), étaient associées à une plus faible prévalence de l'agent pathogène

(mise en évidence de gène de résistance). Pour cela, nous avons utilisé des modèles linéaires généralisés à effet mixte *via* la fonction glmer implémentée dans le programme R lme4 [Bates *et al.*, 2012]. Le statut d'infection des individus a été traité en variable binomiale. En utilisant le critère d'Akaike corrigé pour les petits effectifs (AICc), nous avons comparé nos modèles avec effet génétique à un modèle de référence comprenant uniquement les variables écologiques et environnementales qui influent sur la probabilité d'exposition : une interaction entre le sexe et l'âge des bouquetins, et le secteur car la dynamique d'infection est variable entre les cinq secteurs du massif [Marchand *et al.*, 2017]. Nous avons sélectionné le modèle avec la plus faible valeur d'AICc indiquant un bon compromis entre qualité d'ajustement et simplicité du modèle.

### OBJECTIF 3

Afin d'estimer les flux de gènes historiques au sein de la population du Bargy et avec les populations voisines, nous avons utilisé l'indice  $F_{ST}$  qui calcule les différences de fréquences alléliques entre populations ou lots d'individus. Ensuite, afin d'évaluer les échanges génétiques récents entre les noyaux de populations et identifier les éventuels individus migrants et/ou hybrides, nous avons utilisé une analyse discriminante en composante principale (DAPC) implémentée dans le logiciel R ADEGENET [Jombart *et al.*, 2010]. Cette analyse identifie le nombre optimal d'unité(s) génétique(s) et calcule les probabilités d'assignation (Q) de chacun des individus à ces unités.

---

## III - DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET CONSANGUINITÉ DES BOUQUETINS DU BARGY

---

Avec une richesse allélique moyenne  $sNA=2,82$  (écart-type  $sd=0,8$ ) allèles par marqueur, et une hétérozygotie attendue  $H_E=0,41$  ( $sd=0,18$ ), la population de Bargy possède une diversité génétique neutre faible au regard de ce qui est observé classiquement chez les autres espèces d'ongulés sauvages (ex. en France :  $H_E=0,56-0,67$  chez le chevreuil, [Quéméré *et al.*, 2015] ;  $H_E=0,58-0,67$  chez le cerf, [Zachos *et al.*, 2016]). La taille efficace de la population est également limitée ( $N_E=51$  individus [41-64 CI 95 %]), ce qui laisse présager d'une forte diminution de la diversité génétique à moyen terme (-40 % de  $H_E$  en 50

générations). Enfin, le coefficient moyen de consanguinité est de  $F \sim 10\%$ , qui est le niveau attendu lorsque deux demi-frères/sœurs se reproduisent ensemble. Ces différents indices suggèrent une faible variabilité adaptative et une capacité modérée à déclencher une réponse micro-évolutive face à un changement de son environnement. Cependant, les niveaux sont équivalents à ceux observés dans un grand nombre de populations restaurées de bouquetins des Alpes [Biebach et Keller, 2009]. Par exemple,  $H_E$  est de 0,41 et 0,39 pour les populations sources de Mont Pleureur et Grand Paradis respectivement. Le

niveau de consanguinité est également dans la moyenne des valeurs estimées pour les autres populations alpines ( $F=0,11$  [Biebach et Keller, 2010]). La faible diversité génétique actuelle et le niveau de consanguinité plutôt élevé à Bargy ne peuvent à eux-mêmes expliquer la réceptivité de la population à la brucellose. Par contre, la taille

efficace de la population de Bargy est dans la moyenne basse des valeurs de  $N_E$  des autres populations [ $N_E=102$  individus pour les 41 populations étudiées par Biebach et Keller, 2010]. À titre de comparaison, la population d'Aravis a une taille efficace de  $N_E \sim 80$  individus et celle du Mont Pleureur de plus de 800.

---

#### IV - DIVERSITÉ DES GÈNES DE L'IMMUNITÉ ET CONSÉQUENCE SUR LA RÉCEPTIVITÉ DES BOUQUETINS À LA BRUCELLOSE

---

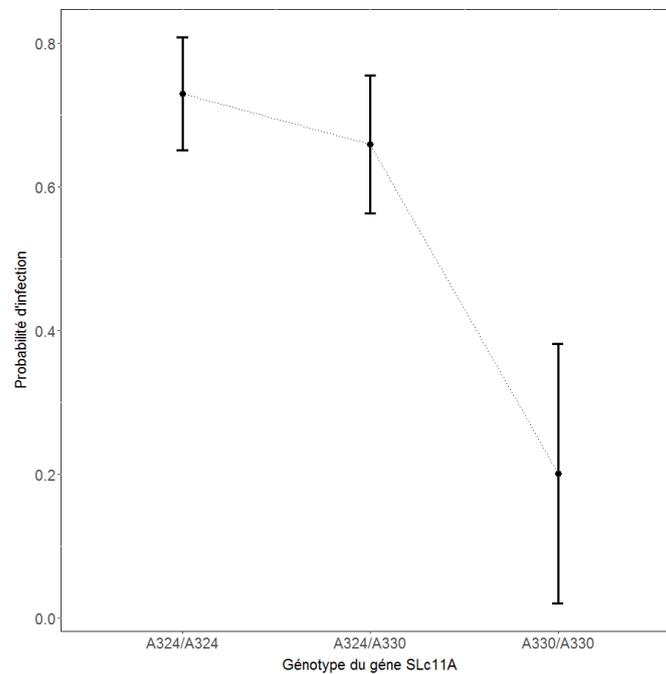
Le gène DRB1 du CMH présente un unique allèle dans la population de Bargy comme c'est le cas pour la grande majorité des populations de bouquetins de l'Est des Alpes [Grossen *et al.*, 2018]. À titre de comparaison, la population récemment restaurée dans les Pyrénées présente quatre allèles (travail en cours) et plusieurs dizaines d'allèles sont observés chez la chèvre domestique et de nombreuses espèces d'ongulés sauvages [Schaschl *et al.*, 2006]. Aucune association n'a été trouvée entre le génotype de DRB1 et le statut brucellique des individus.

Les trois gènes *Tlr* étudiés présentent un niveau très faible de polymorphisme mais équivalent dans les deux populations, Bargy et Grand Paradis (origine de repeuplement). Dans les deux cas, nous avons pu isoler 7 SNPs non-synonymes : 1 SNP pour *Tlr1* (2 haplotypes), 3 pour *Tlr2* (4 haplotypes) et 3 pour *Tlr4* (4 haplotypes). Là encore, on est loin des niveaux observés chez le chevreuil pour lequel une dizaine d'haplotypes sont présents pour *Tlr2* et *Tlr4* [Quéméré *et al.*, 2015]. Nous avons détecté une unique association entre le statut d'infection des individus et le génotype de *Tlr1* ( $\Delta AIC=-4,38$  avec le modèle de référence non-génétique). Les individus ayant deux copies de l'allèle 2 du *Tlr1* (allèle présent chez 96 % des individus) tendent à être moins souvent infectés que les autres ( $OR=0,16$  [0,04-0,95]). Cette relation a déjà été mise en évidence par Prakash *et al.* [2017] chez les bovins.

Le gène *SLC11A1* présente deux allèles, nommés ici nommés « A324 » et « A330 » en référence à la taille des motifs amplifiés. Dans la population de Bargy, les fréquences des allèles A324 et A330 sont de 77 % et 23 % respectivement. La majorité des individus (~60 %) sont homozygotes A324/A324, ~35 % des individus sont hétérozygotes A324/A330 et ~5 % sont homozygotes A330/A330. La présence de l'allèle A330 est significativement liée au statut d'infection des individus ( $\Delta AIC=-2,37$ ) : cela est particulièrement le cas pour les rares individus homozygotes A330/A330 qui ont une probabilité très faible d'être infectés ( $OR=0,09$  [0,005-0,59]) (figure 1). Les individus hétérozygotes A324/A330 ont également une probabilité réduite d'infection bien que ce ne soit pas significatif ( $OR=0,71$  [0,38-1,33]). Une telle association entre un allèle du gène *SLC11A1* et la résistance à la brucellose a déjà été observée chez la chèvre domestique et le buffle d'Asie (*Bubalus bubalis*) [Capparelli *et al.*, 2007 ; Lacoboni *et al.*, 2014]. Une expérience *in vitro* chez le buffle d'Asie a montré que certains variants de *SLC11A1* étaient associés à une plus grande expression d'ARNm de NRAMP1 et une meilleure capacité à contrôler la répllication de la *Brucella* [Borriello *et al.*, 2006]. Il faut noter que l'allèle A330 présente des fréquences assez similaires dans tous les secteurs de la chaîne principale de Bargy (18 à 32 %) sauf à Charmieux où sa fréquence est de 10 %. La fréquence de l'allèle A330 est plus faible à Bargy que dans la population de Grand-Paradis (40 %).

Figure 1

**Probabilité d'infection à la brucellose en fonction du génotype du gène SLC11A1,  
à partir des données obtenues sur 226 bouquetins du massif du Bargy échantillonnés entre 2012 et 2016**



## V - STRUCTURATION GÉNÉTIQUE DES BOUQUETINS DE BARGY ET ARAVIS

Nous n'avons pas observé de différenciation génétique entre les individus des quatre unités socio-spatiales de la chaîne principale du Bargy (Charmieux, Grand Bargy, Jallouvre et Petit Bargy) ( $F_{ST} \sim 0\%$ ,  $P > 0,05$ ). Ce résultat était attendu car les domaines vitaux des mâles recouvrent les quatre sites [Marchand *et al.*, 2017]. Par contre, la 5<sup>ème</sup> unité (Leschaux-Andey) est significativement différente de celles de la chaîne principale ( $F_{ST} = 4,3\%$ ), ce qui suggère un flux de gènes historique limité. Une différenciation génétique modérée mais significative existe également entre les bouquetins de la chaîne principale de Bargy et

ceux des Aravis ( $F_{ST} = 3,3\%$ ). Cela suggère là encore peu d'échanges historiquement entre les deux massifs (<7 bouquetins par génération sous l'hypothèse d'un flux symétrique). L'analyse discriminante en composantes principales (DAPC) confirme la présence de trois unités génétiques (Chaîne principale du Bargy, Aravis et Leschaux-Andey) mais suggère de nombreux mouvements contemporains entre ces massifs : 11 individus sont clairement assignés ( $Q > 0,8$ ) à une population différente de celle d'échantillonnage et 14 individus sont potentiellement des hybrides de première génération ( $Q > 0,35$  à deux populations différentes).

## VI - CONCLUSION

La population de bouquetins du Bargy possède une diversité génétique et immunogénétique très faible mais équivalente à celle observée dans un grand nombre de populations restaurées des Alpes. Cela

ne suffit donc pas à expliquer sa forte réceptivité à la brucellose. Il faut noter cependant la très petite taille efficace de la population qui prédit une forte diminution de la diversité génétique à moyen terme

en l'absence de renforcement et/ou migration. La situation a probablement empiré suite à l'abattage massif d'individus ces dernières années. Parmi les gènes de l'immunité analysés, seul le gène *SLC11A1* présente une association sans ambiguïté avec le statut brucellique des individus : les individus porteurs de l'allèle A330 ont un plus faible niveau d'infection, notamment les homozygotes. Cet allèle est présent à un niveau plus faible dans le Bargy que dans la population de référence du Grand Paradis. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour montrer le lien entre la présence de cet allèle

A330 et le niveau d'expression de la protéine NRAMP1 comme cela a été fait chez le buffle *Bubalus bubalis*. Enfin, les analyses génétiques ont mis en évidence une très faible différenciation génétique au sein de la chaîne principale du Bargy. À l'opposé, les flux de gènes avec les populations des massifs alentours (Aravis, Leschaux-Andey) sont historiquement limités. Mais nous avons détecté de nombreux mouvements contemporains entre le Bargy et la population de bouquetins des Aravis et donc un risque de propagation de la maladie vers les Aravis est présent.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Acevedo-Whitehouse K., Cunningham A. - Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *Trends Ecol. Evol.*, 2006, **21**, 433-438.
- Bates D., Maechler M., Bolker B. - lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and Eigen++, 2012.
- Biebach I., Keller L.F. - A strong genetic footprint of the re-introduction history of Alpine ibex (*Capra ibex ibex*). *Mol. Ecol.*, 2009, **18**, 5046-5058.
- Biebach I., Keller L.F. - Inbreeding in reintroduced populations: the effects of early reintroduction history and contemporary processes. *Conserv. Genet.*, 2010, **11**, 527-538.
- Borriello G., Capparelli R., Bianco M., Fenizia D., Alfano F., Capuano F., Ercolini D., Parisi A., Roperto S., Iannelli D. - Genetic resistance to *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect. Immun.*, 2006, **74**, 2115-2120.
- Brambilla A., Biebach I., Bassano B., Bogliani G., von Hardenberg A. - Direct and indirect causal effects of heterozygosity on fitness-related traits in Alpine ibex. *Proc. Biol. Sci.*, 2015, **282**, 20141873.
- Capparelli R., Alfano F., Amoroso M.G., Borriello G., Fenizia D., Bianco A., Roperto S., Roperto F., Iannelli D. - Protective effect of the Nramp1 BB genotype against *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect. Immun.*, 2007, **75**, 988-996.
- Ejzmond M.J., J. Radwan - MHC diversity in bottlenecked populations: a simulation model. *Conserv. Genet.*, 2011, **12**, 129-137.
- Goudet J. - FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3), 2001.
- Grossen C., Biebach I., Angelone-Alasaad S., Keller L.F., Croll D. - Population genomics analyses of European ibex species show lower diversity and higher inbreeding in reintroduced populations. *Evol. Appl.*, 2018, **11**, 123-139.
- Hill W.G. - Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet. Res.*, 1981, **38**, 209-216.
- Iacoboni P.A., Hasenauer F.C., Caffaro M.E., Gaido A., Rossetto C., Neumann R.D., Salatin A., Bertoni E., Poli M.A., Rossetti C.A. - Polymorphisms at the 3' untranslated region of *SLC11A1* gene are associated with protection to *Brucella* infection in goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2014, **160**, 230-234.
- Jombart T., Devillard S., Balloux F. - Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.*, 2010, **11**, 94.
- Marchand P., Freycon P., Herbaux J.P., Game Y., Toïgo C., Gilot-Fromont E., Rossi S., Hars J. - Sociospatial structure explains marked variation in brucellosis seroprevalence in an Alpine ibex population. *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 15592.
- Mona S., Crestanello B., Bankhead-Dronnet S., Pecchioli E., Ingrosso S., D'Amelio S., Rossi L., Meneguz P., Bertorelle G. - Disentangling the effects of recombination, selection, and demography on the genetic variation at a major histocompatibility complex class II gene in the alpine chamois. *Mol. Ecol.*, 2008, **17**, 4053-4067.

- Piry S., Guivier E., Realini A., Martin J. - SESAME Barcode: NGS-oriented software for amplicon characterization—application to species and environmental barcoding. *Mol. Ecol. Resour.*, 2012, **12**, 1151-1157.
- Quéméré E., Galan M., Cosson J.F., Klein F., Aulagnier S., Gilot-Fromont E., Merlet J., Bonhomme M., Hewison A.J., Charbonnel N. - Immunogenetic heterogeneity in a widespread ungulate: the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Mol. Ecol.*, 2015, **24**(15), 3873-3887.
- Schaschl H., Wandeler P., Suchentrunk F., Obexer-Ruff G., Goodman S.J. - Selection and recombination drive the evolution of MHC class II DRB diversity in ungulates. *Heredity*, 2006, **97**, 427-437.
- Vacca G.M., Pazzola M., Pisano C., Carcangiu V., Diaz M.L., Nieddu M., Robledo R., Mezzanotte R., Dettori M.L. - Chromosomal localisation and genetic variation of the SLC11A1 gene in goats (*Capra hircus*). *Vet. J.*, 2011, **190**, 60-65.
- Wang J. - COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Mol. Ecol. Resour.*, 2011, **11**, 141-145.
- Wang J. - Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genet. Res.*, 2007, **89**, 135-153.
- Waples R.S., Do C. - Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evol. Appl.*, 2010, **3**, 244-262.
- Zachos F.E., Frantz A.C., Kuehn R., Bertouille S., Colyn M., Niedzialkowska M., Pérez-González J., Skog A., Sprëm N., M.-C. Flamand M.C. - Genetic structure and effective population sizes in European red deer (*Cervus elaphus*) at a continental scale: insights from microsatellite DNA. *J. Hered.*, 2016, **107**, 318-326.

