

Université de Montréal

LA TOXOPLASMOSE CHEZ LES INUITS :
INVESTIGATION DE L'ÉCOLOGIE DE *TOXOPLASMA*
GONDII DANS L'ARCTIQUE CANADIEN

par

AUDREY SIMON

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option épidémiologie

Avril 2012

© Audrey Simon, 2012

Résumé

Toxoplasma gondii, un protozoaire très répandu dans le monde, peut infecter de nombreuses espèces homéothermes incluant les mammifères et les oiseaux qui développent alors une toxoplasmose. L'impact de la toxoplasmose en termes de santé publique est majeur, particulièrement chez les personnes immunodéprimées et les fœtus. Les niveaux d'infection humaine dans certaines régions de l'Arctique Canadien sont parmi les plus élevés au monde et ce, malgré l'absence de félidés qui sont les seuls hôtes capables d'excréter *T. gondii*. Plusieurs études ont suggéré la consommation de viande crue de mammifères marins et notamment de phoques comme source d'infection des Inuits.

Notre travail de recherche visait à comprendre les mécanismes de dispersion de *T. gondii* dans les écosystèmes aquatiques menant à la contamination du milieu marin de l'Arctique par des oocystes, et à évaluer l'importance de cette voie de dispersion dans l'infection des phoques et conséquemment dans celle des Inuits. Notre hypothèse était que les oocystes de *T. gondii*, excrétés durant l'hiver par des félidés dans le Subarctique et transportés par les rivières pendant la fonte printanière, contaminaient les estuaires de l'Arctique Canadien.

Dans un premier temps, une étude transversale de séroprévalence chez les phoques de l'Arctique Canadien a montré que ces populations étaient infectées par *T. gondii* et pouvaient ainsi *a priori* constituer une source d'infection pour les Inuit. Des variations spatio-temporelles de la séroprévalence étaient observées suggérant un lien potentiel avec des variations dans la contamination environnementale par les oocystes.

Un schéma conceptuel explicitant les mécanismes de transport et de devenir des oocystes de *T. gondii*, du phénomène de la fonte de la neige jusqu'à l'exposition des organismes marins, a été proposé dans le chapitre suivant. Des interactions entre les différents mécanismes identifiés, qui agissent sur des échelles spatio-temporelles variées, devraient favoriser l'apparition de concentrations relativement élevées aux estuaires permettant ainsi l'exposition et potentiellement l'infection de phoques.

Pour évaluer la contamination environnementale par les oocystes excrétés par la population de lynx du bassin versant de l'Arctique Canadien (les seuls félidés

majoritairement distribués dans ce vaste territoire), nous avons mené une étude sérologique de type transversale dans cette population. Cette étude a permis de montrer que des lynx étaient infectés par *T. gondii* et a également suggéré que la dynamique des cycles de populations lynx-lièvres pouvait être un processus important dans la transmission de *T. gondii*.

Finalement, la modélisation du transport hydrique des oocystes a indiqué que les concentrations hypothétiques d'oocystes dans l'eau de la fonte pourraient être suffisantes pour permettre l'exposition au niveau des estuaires de bivalves filtreurs, qui sont des proies pour les phoques et donc potentiellement des sources infectieuses pour ces derniers.

Dans des écosystèmes nordiques en pleine mutation, la compréhension des mécanismes de transmission d'agents pathogènes d'origine hydrique comme *T. gondii* est plus que nécessaire, notamment dans le but de protéger les populations fragilisées de ces régions.

Mots-clés : *Toxoplasma gondii*, Inuit, Arctique Canadien, santé publique, contamination fécale, transport des rivières à la mer, fonte de la neige, modélisation hydrologique.

Abstract

Toxoplasmosis results from infection with *Toxoplasma gondii*, a widespread protozoan that can infect many species including warm-blooded mammals and birds. The public health impact of toxoplasmosis is important, particularly in immunocompromised individuals and the foetus. Levels of human infection in parts of the Canadian Arctic are among the highest in the world, despite the absence of felids that are the only hosts that can excrete *T. gondii*. Several studies have suggested that consumption of raw meat of marine mammals including seals is a source of infection for the Inuit.

Our research sought to understand the dispersal mechanisms of *T. gondii* in aquatic ecosystems leading to contamination of the marine environment of the Arctic by oocysts, and to assess the importance of this route of dispersion for infection in seals and consequently in the Inuit. We hypothesized that the *T. gondii* oocysts excreted during the winter by felids in the subarctic area and transported by rivers during spring melt contaminated the estuaries of the Canadian Arctic.

Initially, a cross-sectional study of seroprevalence in seals from the Canadian Arctic showed that these populations were infected with *T. gondii* and thus a priori could be a source of infection for Inuit. Spatio-temporal variations in seroprevalence were observed suggesting a potential link with variations in environmental contamination by oocysts.

A conceptual diagram of the possible mechanisms of transport and fate of *T. gondii* oocysts, from the melting snow to the exposure of marine organisms, is proposed in the following chapter. Interactions between the various mechanisms identified, which act on various temporal and spatial scales, should favour the appearance of relatively high concentrations in estuaries allowing exposure and potential infection of seals.

To assess environmental contamination by oocysts excreted by the lynx population living in the watershed of the Canadian Arctic (the only felines largely distributed in this vast territory), we conducted a serological cross sectional study in this population. This

study showed that lynx were infected with *T. gondii* and also suggested the dynamics of lynx-hare population cycles as an important process in the transmission of *T. gondii*.

Finally, the modeling of hydrological transport of oocysts indicated that the hypothetical concentrations of oocysts in meltwater could be sufficient to permit significant exposure in estuarine filter-feeding bivalves on which seals prey and therefore potentially representing sources of infection for them.

In changing northern ecosystems, understanding the mechanisms of transmission of waterborne pathogens, including *T.gondii* is essential, especially in order to protect vulnerable populations that live in these regions.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Inuit, Canadian Arctic, public health, fecal contamination, river-to-sea transport, snowmelt period, hydrological modelling.

Table des matières

Introduction.....	1
Objectifs	2
Recension des écrits	3
Le protozoaire <i>Toxoplasma gondii</i>	3
Cycle parasitaire.....	4
Diversité génétique	6
Diagnostic et détection.....	8
Toxoplasmose chez l'Homme.....	13
Toxoplasmose chez les Inuits	20
Une problématique importante de santé publique.....	21
Recherche des sources d'infection	27
Stratégies de prévention	29
Epidémiologie de la toxoplasmose dans l'Arctique Canadien.....	30
La toxoplasmose dans les écosystèmes terrestres (sub)arctiques	31
La toxoplasmose dans les écosystèmes marins (sub)arctiques	38
Cadre conceptuel de transmission de <i>Toxoplasma gondii</i> dans l'Arctique Canadien .	42
Exposé et analyse des résultats	45
Spatio-temporal variations and age effect on <i>Toxoplasma gondii</i> seroprevalence in seals from the Canadian Arctic	46
Summary	47
Introduction.....	47
Materials and methods	49
Results.....	51
Discussion	53
Acknowledgements.....	56
References.....	57
Figures.....	61
Tables	62

Fate and transport of <i>Toxoplasma gondii</i> oocysts via snowmelt runoff: development of a conceptual framework from melting snowpack to the Canadian Arctic coasts	64
Abstract	65
Introduction.....	65
The framework.....	67
Conclusion	74
Acknowledgments.....	75
References.....	75
Figures.....	79
Evidence for spatio-temporal dynamics of <i>Toxoplasma gondii</i> infection in Canadian lynx (<i>Lynx canadensis</i>) in western Québec, Canada.....	80
Abstract	81
Introduction.....	82
Materials and Methods.....	83
Results.....	86
Discussion and conclusion	87
Acknowledgments.....	92
Literature cited	92
Tables	96
Figure	97
Hydrological modelling of <i>Toxoplasma gondii</i> oocysts transport to investigate potential infection of marine mammals in the Canadian Arctic from terrestrial sources	98
Abstract	99
Introduction.....	100
Materials and Methods.....	102
Results.....	111
Discussion	114
Conclusion	117
Acknowledgments.....	118
References.....	118
Figures.....	123

Tables	129
Discussion générale.....	132
Contamination des phoques de l'Arctique Canadien par <i>Toxoplasma gondii</i> lors de la fonte printanière	133
La fonte comme mécanisme de contamination des écosystèmes côtiers	133
Ordres de grandeur des concentrations	134
Facteurs favorisant des concentrations élevées dans les estuaires	135
Cyclicité de l'exposition	137
Exposition menant à la contamination des phoques	138
Mécanisme de la fonte printanière : propagation des agents pathogènes, santé des écosystèmes et santé publique.....	142
Le cas de <i>Toxoplasma gondii</i>	143
Impact des changements climatiques	144
Principales limites	146
Modélisation hydrologique	146
Tests diagnostiques	148
Conclusion et perspectives de recherche.....	150
Analyse quantitative du risque d'exposition des phoques dans l'Arctique Canadien ...	151
Appréciation quantitative du risque d'infection des Inuits par la consommation de viande de phoque	152
Sources documentaires.....	155

Liste des tableaux

Tableau I. Tests utilisés pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose chez les animaux avec leurs principaux avantages et inconvénients.....	9
Tableau II. Synthèse des études transversales publiées de séroprévalence de la toxoplasmose chez les Inuits d'Amérique du Nord.....	22
Tableau III. Synthèse des études transversales publiées de séroprévalence de la toxoplasmose chez différentes espèces de mammifères terrestres (sub)arctiques d'Amérique du Nord.....	33
Tableau IV. Synthèse des études transversales publiées de séroprévalence de la toxoplasmose chez différentes espèces de mammifères marins des régions (sub)arctiques d'Amérique du Nord.....	39
Table V. Prevalence of specific antibodies to <i>Toxoplasma gondii</i> among ringed seals from Nunavut and the Northwest Territories, Canada, according to sex, age class, community and year of sampling, and level of significance for unconditional association between <i>T. gondii</i> seropositivity and each explanatory variable. Significant effect ($P < 0.05$) are shown in bold.....	62
Table VI. Statistically significant explanatory variables in the multivariable logistic regression model of the presence of specific antibodies against <i>Toxoplasma gondii</i> in 738 ringed seals from six communities in the Canadian Arctic.....	63
Table VII. Antibody prevalence for <i>Toxoplasma gondii</i> with 95% confident intervals (95% CI) (Wald's test) in Canadian lynx trapped during the 1997 and 2009 winters in Abitibi-Témiscamingue, Québec, Canada.....	96
Table VIII: Parameters and values used to calibrate the GIBSI model.....	129
Table IX: Summary of the experimental design (i.e., simulated scenarios).....	130
Table X: Parameters of snowmelt period over ten years in the Montmorency watershed. The maximum and minimum values of each parameter are in dark and light grey, respectively. Years with asterisks are those for which the simulated concentrations of oocysts at the watershed outlet were the largest. Those years are characterised by low precipitations and short snowmelt periods (2001), or by low mean temperatures and low runoff rates (2003 and 2004).....	131

Liste des figures

Figure 1. Schéma du cycle de <i>Toxoplasma gondii</i>	4
Figure 2. Niveaux de séroprévalence de la toxoplasmose dans le monde au cours des 20 dernières années (d'après Dubey et al (2010) et Afssa (2005))......	13
Figure 3. Population inuite dans les différentes provinces et territoires du Canada (recensement du Canada de 2006. Produit par la Division de la géographie, Statistique Canada, 2007).	21
Figure 4. Variations géographiques de la séroprévalence de la toxoplasmose dans la population inuite du Nunavik (les séroprévalences élevées, intermédiaires et faibles sont indiquées respectivement en rouge, jaune et bleu) (d'après (Messier et al. 2009).	24
Figure 5. Définition des frontières géographiques de l'Arctique et du Subarctique.....	31
Figure 6. Gradient nord sud dans la séroprévalence de la toxoplasmose chez le caribou (<i>Rangifer tarandus</i>) et le bœuf musqué (<i>Ovibos moschatus</i>) des régions (sub)arctiques du Canada (d'après Kutz et al. 2000, 2001)......	36
Figure 7. Cycles de transmission de <i>Toxoplasma gondii</i> dans les régions (sub)arctiques d'Amérique du Nord (HD = Hôte Définitif, HI = Hôte Intermédiaire).	43
Figure 8. Location of the seven (7) Canadian Arctic Inuit communities where arctic seals were sampled from 1999 to 2006.....	61
Figure 9. Prevalence of antibodies against <i>Toxoplasma gondii</i> (%) among ringed seals from the Canadian Arctic by age class: pup (<1 year old), juvenile (1-5 years old) and adult (>5 years old). Error bars indicate the standard deviation.	61
Figure 10. Diagram of the fate and transport of <i>Toxoplasma gondii</i> oocysts from the melting snowpack to the Canadian arctic coast via the freshwater runoff within the Canadian Arctic watershed.	79
Figure 11. Map of the trapping area in Abitibi Témiscamingue, Québec, Canada, located in part within the Hudson Bay watershed (in grey color on the map of Canada) and showing the origin of the Canadian lynx serum samples tested for antibodies against <i>Toxoplasma gondii</i> . The locations where lynx were trapped in 1997 are indicated by triangles, and the locations where lynx were captured in 2009 are indicated by circles.	

- In either case, black symbols indicate that the lynx were seropositive for *T. gondii*, and grey symbols indicate that the lynx were seronegative..... 97
- Figure 12: The structure and the input variables of models used in the GIBSI system..... 123
- Figure 13: Map of Quebec, Canada, showing the Necopastic and Montmorency pilot watersheds. The arrows indicate the location of oocysts release in the upstream, middle stream and downstream portions draining the lynx habitats; the stars show the watershed outlets..... 124
- Figure 14: Probabilities (y axis) of exceeding the concentrations of oocysts (x-axis) at the watershed outlet during the snowmelt period under different scenarios (Sc) for timing and type (continuous or discrete) of oocyst release. Comin and Comax are the concentrations at the watershed outlet following the release of minimum and maximum amounts of overland oocysts in the stream flow, respectively. Sc1 and Sc2: continuous release of oocysts in the stream flow of the Montmorency and Necopastic watersheds over ten- and three- year periods, respectively. Sc3 to Sc6: discrete (one point-in-time) release of oocysts in the early (Sc3&4) and in the peak (Sc5&6) portions of the meltwater season into the stream flow of the Montmorency watershed over a ten- year period..... 125
- Figure 15: Box plots showing the proportionality relationship between the maximum terrestrial amounts of oocysts (varied according to different values for the prevalence of infection: 1%, 5%, 10%, 50% and 75%) and the concentrations Comaxinc of oocysts at the Montmorency outlet simulated using continuous release and 1998-1999 meteorological data (Sc7). 126
- Figure 16: Concentrations Comax of *T. gondii* oocysts at the Montmorency outlet following continuous (Sc2) and discrete release (Sc4&6) of a maximum amount of overland oocysts. The mean, maximum and minimum Comax for Sc2 and the mean Comax for Sc4 and Sc6 (release at the onset and the peak of snowmelt period, respectively) are shown..... 126
- Figure 17: Probabilities (y-axis) of exceeding the concentrations of oocysts (x-axis) at the Montmorency outlet during the snowmelt period following the continuous release of identical amounts of overland oocysts at the downstream, middle stream and upstream points (Sc8). The amount of overland oocysts discharged in the stream flow was based

on the maximum amount of oocysts in the portion of watershed drained by the middle stream point..... 127

Figure 18: Box plots showing the annual variability of oocyst concentrations (Comax) at the watershed outlet following the continuous release of maximum amounts of overland oocysts in the stream flow (Sc2). The whiskers extend to the most extreme data point which is no more than 1.5 times the interquartile range from the box..... 127

Figure 19: Normalized annual hydrographs (on the left) and cumulative pollutographs (on the right) calculated for a continuous release of a maximum amount of overland oocysts for the Montmorency and the Necopastic watersheds. On the hydrographs, the normalized monthly mean rate flows were defined as the ratio between the monthly mean rate flows and the watershed area; on the pollutographs, the normalized mean loads of oocysts were defined as the ratio between the daily quantity of oocysts and the total quantity of oocysts flowing at the watershed outlet..... 128

Figure 20. Schéma résumant les principales étapes de l'appréciation quantitative du risque de toxoplasmose suite à la consommation de phoque par les Inuits. 153

Liste des sigles et des abréviations

°C = Degré Celsius

°N = Degré Nord

ADN = Acide désoxyribonucléique

AL = Alaska

AQR = Appréciation quantitative du risque

C = Carbone

CI = Intervalle de confiance (*Confidence interval*)

cm = Centimètre

CTA = Complexe Tachyzoïtes-Anticorps

d = Jour (*Day*)

DT = Test de lyse (*Dye-test*)

E = Environnement

ELISA = Test immunoenzymatique (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*)

g = Gramme

GIS = Système d'information géographique (*Geographic information system*)

ha = Hectare

i. e. = C'est-à-dire (*id est*)

IFAT = Test d'immunofluorescence indirecte (*Indirect fluorescent antibody test*)

IgG = Immunoglobulines de type G

IHAT = Test d'hémagglutination indirecte (*Indirect hemagglutination test*)

HD = Hôte définitif

HI = Hôte intermédiaire

km = Kilomètre

L = Litre

LAT = Test d'agglutination sur latex (*Latex agglutination test*)

µm = Micromètre

MAT = Test d'agglutination directe modifiée (*Modified agglutination test*)

m = Mètre

min = Minute

ml = Millilitre

mm = Millimètre

N = Nitrogène

NI = Nunavik

NU = Nunavut

OR = Rapport des cotes (*Odd ratio*)

PCR = Réaction de polymérase en chaîne (*Polymerase chain reaction*)

QC = Québec

RHHUs = Unités hydrologiques relativement homogènes (*Relatively homogeneous hydrological units*)

rpm = Tour par minute (*Rotation per minute*)

s = Seconde

Sc = Scénario

Se = Sensibilité

SI = Isotope stable (*Stable isotope*)

SIDA = Syndrome d'immunodéficience acquise

Sp = Spécificité

T. gondii = *Toxoplasma gondii*

TNO = Territoires du Nord Ouest

UV = Rayons ultraviolets (*Ultraviolet light*)

y = Year

YU = Yukon

« *Any organism that shares our brain with us*
is worthy of study » Bill Hutchison

Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche, le Dr Nicholas H. Ogden, pour m'avoir proposé cette aventure et m'avoir soutenue tout au long de ces cinq années notamment sur le plan financier. J'ai beaucoup apprécié ses encouragements, son positivisme et son enthousiasme dans ce projet.

Je remercie également mon codirecteur de recherche, le Dr Michel Bigras-Poulin, pour sa grande disponibilité et toutes nos discussions passionnantes, ainsi que pour son élan visionnaire qui m'a guidée dans ce projet.

Mes remerciements vont aussi à mon codirecteur de recherche, le Dr Alain N. Rousseau, qui a accepté avec enthousiasme de m'encadrer et qui m'a accueillie à l'INRS-ETE pour m'initier à l'hydrologie. Son soutien pédagogique, sa disponibilité et ses encouragements ont été grandement appréciés.

Je désire également remercier plusieurs personnes de la FMV, de l'ASPC et de l'INRS-ETE qui, à un moment donné du parcours, m'ont fait profiter de leur expertise : Julie Arseneault, Guy Beauchamp, Louise Beausoleil, Philippe Berthiaume, Julie David, Rebecca Guy, Patrick Leighton, André Ravel, Stéphane Savary, Sébastien Tremblay, Alain Villeneuve. Un merci tout spécial à Stéphanie Brazeau et Yann Pelcat pour leur soutien fort apprécié en géomatique, et aux membres de mon Comité conseil : Benoit Levesque, Jean-François Proulx, Manon Simard, Brian Ward.

Merci à tous ceux qui m'ont accompagnée durant toutes ces années, pour leur soutien moral et leur amitié : Catherine et Alexandre, Pavine, Brite, Julie, Antoinette, Paul, Jacques et Aline, Marie-Ève, Alain, Linda et Claude. Un grand merci à toi Mélanie pour toutes nos aventures. Et mille mercis à Hélène, Robert et leurs enfants pour m'avoir accueillie avec chaleur dans leur famille, et en particulier à Fannie pour son support inconditionnel.

Et finalement, je remercie de tout mon cœur mes parents pour m'avoir encouragée dans les études et m'avoir offert la chance de découvrir cet horizon de liberté. Merci à vous

deux ainsi qu'à mes chères sœurs pour votre amour et votre soutien par pensée, par téléphone, par courrier et en chair et en os ! Ma Vio, un grand merci également pour ton soutien scientifique tout au long de ce doctorat.

Finalement, je tiens à souligner le soutien financier du réseau de centres d'excellence du Canada ArcticNet, de l'Agence de la santé publique du Canada, de l'Institut national de santé publique du Québec (Ouranos) et du GREZOSP.

Introduction

Distribué mondialement, le protozoaire *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) peut infecter un large spectre d'hôtes homéothermes (mammifères et oiseaux). Cependant, seulement les espèces appartenant à la famille des félinés sont capables d'excréter *T. gondii*. On estime qu'un tiers de la population humaine est infecté par ce parasite (Tenter et al. 2000). L'infection par *T. gondii* (toxoplasmose) est traditionnellement reconnue comme une infection asymptomatique chez les individus immunocompétents, mais peut entraîner de graves lésions irréversibles et potentiellement létales chez les fœtus et chez les immunodéprimés comme les sidéens.

D'après les études épidémiologiques réalisées chez les Inuits de l'Arctique Canadien, la toxoplasmose est endémique dans ces populations où le niveau d'infection est l'un des plus élevés au monde (Peterson et al. 1974; Gyorkos 1980; Tanner et al. 1987; Messier et al. 2009). Cette découverte est surprenante quand on considère l'absence de félinés dans les écosystèmes arctiques et pose la question des sources d'infection pour les Inuits. Une étude récente a suggéré que l'ingestion d'eau ainsi que la consommation de gibier à plumes et de viande de phoque étaient des facteurs de risque d'infection à *T. gondii* pour ces populations (Messier et al. 2009). Les phoques sont plus particulièrement suspectés de représenter un risque infectieux relativement important car ils constituent des sources alimentaires essentielles pour les Inuits, leur viande est consommée principalement crue (ce qui favorise la transmission de *T. gondii*) et l'infection par *T. gondii* a été documentée chez plusieurs espèces.

Pour expliquer la présence de *T. gondii* chez les mammifères marins dont les phoques, plusieurs chercheurs suspectent une contamination du milieu marin d'origine terrestre (Dubey 2010). Des toxoplasmes excrétés par des félinés seraient transportés par les rivières jusqu'aux océans, exposant ainsi les organismes aquatiques. L'importance du transport hydrique de *T. gondii* comme mécanisme d'exposition menant à l'infection potentielle des organismes aquatiques est largement inconnue.

Objectifs

Dans une démarche globale d'investiguer l'écologie de *T. gondii* dans l'Arctique Canadien, ce projet visait à étudier la contamination hydrique du milieu marin par *T. gondii* afin d'évaluer son importance dans l'exposition des phoques menant potentiellement à l'infection des Inuits.

Plus spécifiquement, les objectifs de ce travail étaient :

- la détermination du niveau d'infection des phoques et l'évaluation de leur rôle comme sources de toxoplasmose pour la population inuite ;
- l'identification des principaux processus dans le transport hydrique de *T. gondii* du milieu terrestre au milieu marin ;
- la détermination du rôle des félidés dans la contamination du bassin versant de l'Arctique canadien par *T. gondii* ;
- l'étude de la dynamique du transport hydrique de *T. gondii* à l'échelle du bassin versant.

Recension des écrits

L'objectif de cette recension des écrits est de synthétiser les connaissances nécessaires à la compréhension des différents travaux effectués dans le cadre de ce projet de doctorat, et également de définir un cadre d'étude global et général de l'écologie de *T. gondii* dans l'Arctique Canadien. Dans un premier temps, nous présentons le protozoaire *T. gondii* (plus particulièrement son cycle de vie, sa diversité génétique et les méthodes microbiologiques utilisées pour sa détection) et l'épidémiologie de l'infection chez l'Homme. Dans la partie suivante, nous exposons la problématique de la toxoplasmose chez les Inuits et les stratégies de prévention mises en place. Enfin, grâce à la synthèse des études épidémiologiques réalisées dans l'Arctique Canadien, nous proposons dans la dernière partie un cadre conceptuel de transmission de *T. gondii*.

Le protozoaire *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, capable d'infecter un très large spectre d'hôtes, est l'un des parasites les plus répandus sur terre. D'importance vétérinaire et médicale, il est responsable de l'infection zoonotique appelée toxoplasmose. Seule espèce du genre *Toxoplasma*, *T. gondii* est un protozoaire coccidien appartenant au Phylum des *Apicomplexa*, phylum qu'il partage avec les autres espèces de coccidies, les piroplasmes et les plasmodiums. Découvert conjointement en 1908 par Nicolle et Manceau dans les tissus d'un rongeur nord africain, le gundi (*Ctenodactylus gundi*), et par Splendore chez un lapin au Brésil, ce n'est que dans les années 70 que son cycle de vie complet a été élucidé avec la découverte de son développement sexuel dans les intestins des chats (Dubey 2010).

Cycle parasitaire

Un cycle de vie complexe

Le cycle de vie de *T. gondii* est hétéroxène (cycle complexe), c'est-à-dire qu'il peut infecter deux types d'hôtes : un hôte définitif (HD), membre de la famille des félidés, chez lequel se déroulent les phases sexuée et asexuée, et un hôte intermédiaire homéotherme (HI), oiseau ou mammifère, chez lequel se déroule exclusivement la multiplication asexuée du parasite (Figure 1). Trois stades infectieux de *T. gondii* sont reconnus dans le cycle parasitaire: les sporozoïtes contenus dans les oocystes excrétés dans l'environnement par les félidés, les tachyzoïtes intracellulaires (formes invasives chez l'hôte infecté) et les bradyzoïtes présents dans des kystes tissulaires (formes latentes chez l'hôte infecté) (Dubey 2010).

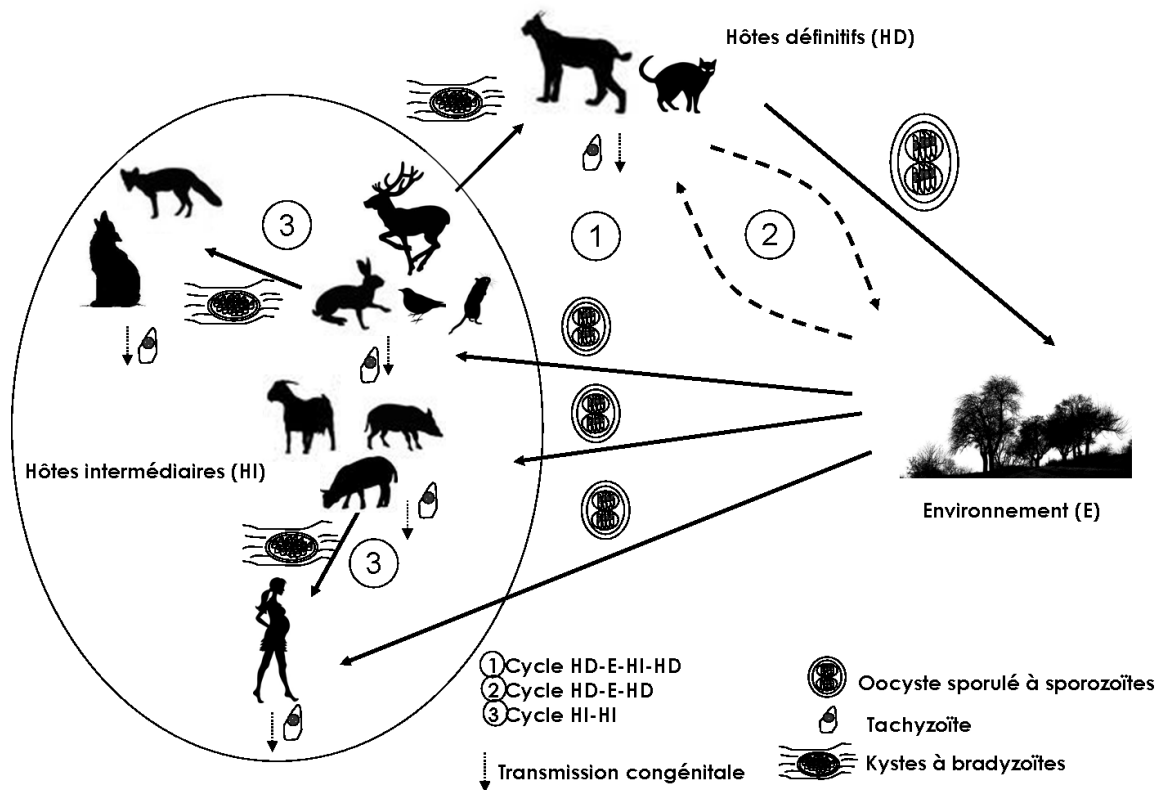


Figure 1. Schéma du cycle de *Toxoplasma gondii*.

Les modalités du cycle hétéroxène (cycle 1 sur la Figure 1) sont les suivantes. Les chats domestiques (*Felis catus*) et d'autres espèces de félinés, suite à leur infection, excrètent dans leurs fèces des millions d'oocystes non sporulés (non infectieux) pendant une à trois semaines (Afssa 2005). Dans le milieu extérieur, ces oocystes sporulent en 1 à 5 jours devenant ainsi infectieux (Afssa 2005). Les oocystes sporulés sont particulièrement résistants dans l'environnement et peuvent rester viables et infectieux pendant plus d'une année dans le sol (Afssa 2005). Les HI se contaminent via l'ingestion d'oocystes présents sur les végétaux, dans le sol ou dans l'eau. Après rupture de la paroi de l'oocyste dans l'épithélium de son hôte, les sporozoïtes évoluent en tachyzoïtes qui se dispersent dans les tissus via les systèmes lymphatique et sanguin. Les tachyzoïtes colonisent rapidement les cellules où ils se multiplient et s'enkystent se transformant en bradyzoïtes. Plusieurs centaines de bradyzoïtes sont présents à l'intérieur des kystes intracellulaires et peuvent persister potentiellement pendant toute la durée de vie de l'hôte (Afssa 2005). Les kystes tissulaires sont surtout présents dans les tissus nerveux et musculaires (cerveau, yeux, muscles squelettiques et cardiaques) (Afssa 2005). Les félinés se contaminent alors via l'ingestion des kystes tissulaires (ou des tachyzoïtes) dans leurs proies infectées et, à la suite d'une phase de multiplication sexuée au niveau de l'épithélium intestinal, excrètent des oocystes dans leurs fèces.

Différents cycles de transmission

Comme montré dans la Figure 1, le passage de *T. gondii* par les deux types d'hôtes (HD et HI) n'est pas obligatoire, permettant la coexistence de plusieurs cycles de transmission qui ont chacun le potentiel d'assurer la transmission du parasite (Tenter et al. 2000). Les oocystes peuvent se transmettre directement à l'HD sans passage préalable par un HI (cycle 2). Un troisième cycle de transmission est possible entre les HI, via les interactions proies prédateurs (cycle 3). L'ingestion de kystes tissulaires présents chez les proies infectées permet ainsi l'infection de prédateurs ou de charognards qui ne sont pas des félinés. En plus de la possibilité d'infection à partir des oocystes disséminés dans

l'environnement et des kystes tissulaires, l'infection congénitale est possible lors de la phase aiguë de parasitémie maternelle durant laquelle les tachyzoïtes peuvent franchir la barrière placentaire.

En fonction des types d'hôtes infectés, on distingue les cycles de transmission se déroulant entièrement en milieu sauvage (cycles sauvages) des cycles impliquant les chats vivant dans les milieux anthropisés (cycles domestiques). Ces cycles se déroulent dans des niches écologiques distinctes mais peuvent s'hybrider lors d'interaction entre faunes sauvage et domestique. À l'interface entre cycles domestiques et sauvage, de nouvelles souches de *T. gondii* peuvent alors émerger (Grigg et Sundar 2009).

Diversité génétique

D'une population clonale...

Traditionnellement, trois lignées clonales de *T. gondii* sont définies (types I, II, III), se distinguant par leurs marqueurs génétiques et leur pouvoir pathogène chez la souris (Howe et Sibley 1995). Très peu de variations génétiques sont observées entre ces trois souches, ce qui suggère que leur expansion clonale a eu lieu récemment (Grigg et Sundar 2009). Les deux principales hypothèses pour expliquer la propagation récente de souches clonales de *T. gondii* sont : une meilleure capacité de ces souches à la transmission orale entre HI ou leur expansion via le commerce maritime des siècles derniers (Su et al. 2003; Lehmann et al. 2006).

... à une structure génétique plus diverse

L'hypothèse de haute clonalité dans la structure de population de *T. gondii* repose sur l'analyse de souches prélevées sur des hommes et des animaux domestiques malades vivants en Europe et en Amérique du Nord. Ce biais d'échantillonnage et l'utilisation de

marqueurs génétiques à faible pouvoir discriminant, ont mené à une sous estimation de la diversité génétique de *T. gondii* (Lehmann et al. 2006). En effet, l'échantillonnage de souches isolées chez différents hôtes en Amérique du sud, en Afrique et en Asie a littéralement changé notre perception de la diversité génétique de *T. gondii* et du rôle respectif de la recombinaison sexuelle et de la propagation clonale dans le cycle parasitaire (Ajzenberg et al. 2004; Lehmann et al. 2006; Dubey et al. 2007; Dubey et al. 2008c; Mercier et al. 2010). En particulier dans les régions tropicales d'Amérique du Sud, une haute diversité génétique des souches est observée, lesquelles divergent de celles isolées en Europe et en Amérique du Nord (Lehmann et al. 2006; Pena et al. 2008; Rajendran et al. 2012). Cette plus grande diversité génétique pourrait s'expliquer entre autres par une reproduction sexuée relativement fréquente du parasite dans ces régions et par une adaptation à l'importante diversité d'hôtes dans les environnements tropicaux (Ajzenberg et al. 2004; Carne et al. 2009). En Amérique du Nord, un quatrième groupe clonal appelé type 12, a récemment été mis en évidence (Khan et al. 2011). Principalement trouvé chez les animaux sauvages, et occasionnellement chez l'Homme, ce génotype a été isolé notamment chez les loutres de mer (*Enhydra lutris*) et les félidés sauvages des côtes californiennes (Miller et al. 2008; Khan et al. 2011). Il s'agit du génotype dominant dans la faune sauvage d'Amérique du Nord, suivi par les génotypes II et III ; alors que chez les espèces domestiques aux Etats-Unis (cochons et moutons) le génotype de type II semble dominer (Dubey et al. 2011). Davantage d'études sont nécessaires pour déterminer si le génotype de type 12 en Amérique du Nord représente un cycle sauvage de *T. gondii* distinct du cycle domestique (Khan et al. 2011). La structure génétique de *T. gondii* reflète ainsi la diversité des cycles de transmission du parasite, adaptés à des environnements plus ou moins anthropisés et impliquant des hôtes variés (Carne et al. 2009). La variation dans la distribution du type de souches circulantes de *T. gondii* indiquent que les cycles de transmission se déroulent sur plusieurs échelles spatio-temporelles et soulignent la nécessité d'étudier ces cycles à différentes échelles et dans des environnements différents (Lehmann et al. 2006; Mercier et al. 2010).

Diagnostic et détection

Pour évaluer le degré d'infection dans une population, on dispose de deux types d'indicateurs épidémiologiques : la prévalence sérologique et la prévalence parasitaire. Pour estimer ces deux indicateurs, plusieurs méthodes de laboratoire ont été développées que nous présentons dans les parties suivantes.

Diagnostic sérologique

Le diagnostic immunologique de la toxoplasmose chez l'animal est basé principalement sur la détection d'immunoglobulines de type G (IgG) (Afssa 2005). Les tests sérologiques sont les mêmes que ceux utilisés chez l'Homme, mais présentent des limites importantes chez les animaux qui sont présentées dans le Tableau I (Dubey et al. 2003; Gajadhar et al. 2004; Afssa 2005; Dubey 2010).

Très peu de tests sérologiques ont été validés et ce seulement chez quelques espèces domestiques ; aucun test n'a fait l'objet d'une validation pour son utilisation chez les espèces sauvages. Actuellement, le MAT est le test le plus utilisé dans les études de séroprévalence chez de nombreuses espèces animales sauvages et domestiques, notamment chez les mammifères marins (Tenter et al. 2000; Dubey et al. 2003). De plus, son utilité a été démontrée dans la seule infection expérimentale de phoques réalisée, où le MAT a été capable de détecter les anticorps des phoques infectés (Gajadhar et al. 2004). C'est principalement pour ces raisons que nous avons choisi ce test sérologique dans les différentes études de prévalence réalisées dans le cadre de ce projet de doctorat.

Tableau I. Tests utilisés pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose chez les animaux avec leurs principaux avantages et inconvénients.

Tests	Principe	Avantages	Inconvénients
Test de lyse (DT) Test de référence chez l'Homme	Non incorporation du bleu de méthylène par le CTA ¹	- très bonne Se ² et Sp ³ - détection précoce des IgG - standardisation en plaques de microtitrage	- coût - technicité importante - dangerosité - faible Se et Sp chez ruminants - non applicable sur sérums aviaires
Hémagglutination indirecte (IHAT)	Agglutination des globules rouges-CTA	- nombreux kits commerciaux - simple à réaliser	- déficient pour infections aiguës - faible Se pour infections congénitales et chez porcs et chevaux - faible Sp
Agglutination directe modifiée (MAT)	Agglutination CTA	- très simple à réaliser - kit commercial disponible - validation chez porc et poulet - utilité chez phoques gris	- faible Se en début d'infection
Agglutination au latex (LAT)	Agglutination particules de latex-CTA	- simple à réaliser - kit commercial disponible	- faible Se chez bétail
Immunofluorescence indirecte (IFAT)	Fluorescence des anticorps conjugués-CTA	- bonne Sp - évaluation chez les loutres de mer	- nécessite un antisérum et un microscope à fluorescence - faible Sp
Test immunoenzymatique (ELISA)	Coloration par réaction enzymatique des anticorps conjugués-CTA	- standardisation et automatisation de la technique - quantification - bonne Se et Sp chez plusieurs espèces	- nécessite un antisérum et un appareil de lecture

¹ CTA = Complexe Tachyzoïtes-Anticorps

² Se = Sensibilité

³ Sp = Spécificité

Diagnostic parasitaire

La séropositivité n'est qu'un élément de suspicion, la preuve de l'infection toxoplasmique n'étant apportée qu'avec la mise en évidence des tachyzoïtes ou des bradyzoïtes dans les tissus.

Méthode directe : observation microscopique des tissus

Le diagnostic peut être fait par observation directe de *T. gondii* dans les tissus biopsiés ou nécropsiés. Une coloration des tissus par immunohistochimie permet d'améliorer la spécificité du diagnostic (Dubey 2010). Ce type de diagnostic manque cependant de sensibilité lorsque les parasites sont peu nombreux (Afssa 2005).

Méthode indirecte : bio essai

Le bio essai est considéré comme le test de référence pour le diagnostic d'une infection à *T. gondii*. Cette méthode, consistant à infecter expérimentalement des souris ou des chats avec des tissus contaminés, permet non seulement de détecter la présence de *T. gondii* mais aussi de déterminer la viabilité et le pouvoir infectieux des parasites (Afssa 2005). Cependant, son utilisation se limite à la détection de souches auxquelles les souris et les chats sont sensibles et ne permet pas de quantification des parasites. Chez la souris le test présente une bonne sensibilité avec un seuil de détection d'un kyste tissulaire pour 100 g de tissu prélevé chez le porc naturellement infecté (Dubey et al. 1995). Le test est plus sensible chez le chat qui peut ingérer une plus grande quantité de tissus et excréter des oocystes même si l'inoculum parasitaire est faible ; cependant le coût et la complexité du test limite son utilisation chez cette espèce (Afssa 2005).

Biologie moléculaire : PCR (Réaction de polymérase en chaîne)

Cette technique est utilisée depuis peu pour amplifier l'ADN de *T. gondii* à partir de tissus, d'organes ou de liquides biologiques, mais actuellement il n'existe pas de PCR standardisée (Afssa 2005). Le gène B1 (35 copies) et l'élément 529-pb (300 copies) sont les marqueurs les plus fréquemment utilisés parmi les nombreux marqueurs qui ont été développés. Cette technique est très sensible et spécifique, et avec le développement de la PCR en temps réel (Real-time PCR), elle permet de quantifier l'ADN et donc la charge parasitaire (Maubon et al. 2007). Fournissant un diagnostic rapide, elle est par exemple

utilisée dans le diagnostic étiologique des avortements chez les ovins et les bovins (Afssa 2005).

Détection dans l'eau et les denrées alimentaires

Les différentes méthodes présentées ci-dessus présentent plusieurs défis quand il s'agit de détecter *T. gondii* dans l'environnement (oocystes dans l'eau et le sol) ou dans les aliments contaminés (kystes tissulaires). Actuellement, il n'existe pas de protocole standardisé comme pour la détection de *Cryptosporidium* et *Giardia* dans l'eau (USEPA 2005). Les méthodes de détection de *T. gondii* dans les échantillons environnementaux, et particulièrement dans l'eau dont la contamination est responsable de plusieurs épidémies de toxoplasmose, sont en développement.

Défis et stratégies de détection des oocystes dans l'eau

À la différence d'autres protozoaires comme *Giardia* ou *Cryptosporidium* qui peuvent être excrétés par un grand nombre d'espèces, les oocystes de *T. gondii* sont excrétés uniquement par les félidés. Ainsi, même si les quantités d'oocystes excrétées par un chat sont de l'ordre de plusieurs millions, la quantité d'oocystes présents dans un échantillon pris aléatoirement dans l'environnement devrait être très faible, et donc difficilement détectables (Dumetre et Darde 2003). Ceci explique probablement l'absence de détection de *T. gondii* lors d'épidémies de toxoplasmose associées à la contamination de l'eau potable. L'enrichissement préalable des échantillons est une étape cruciale pour augmenter ainsi la probabilité de détection d'oocystes dans l'eau. Cet enrichissement peut se faire par des techniques de concentration comme la floculation ou la filtration et des techniques de purification comme la flottation (Dumetre et Darde 2003). La combinaison de différentes techniques permet d'améliorer la sensibilité ou la spécificité de la détection. Dans le futur, les méthodes d'immunoséparation magnétique et de centrifugation en flux continu, déjà utilisées pour la détection de *Cryptosporidium* et *Giardia* dans l'eau, semblent prometteuses pour améliorer la capacité de détection des oocystes de *T. gondii* dans l'eau

(Dumetre et Darde 2007; Borchardt et al. 2009). Egalement, les mollusques pourraient être utilisés pour concentrer les oocystes présents dans l'eau grâce à leur capacité de filtration élevée (jusqu'à 100 L par jour). Ils servent d'ailleurs déjà de sentinelles et sont mis à profit dans la surveillance de la qualité des eaux littorales aux Etats-Unis (Mussel Watch) ou en France (Réseau microbiologique-REMI) (Robertson 2007).

Défis et stratégies de détection des kystes dans les denrées alimentaires

La distribution et le nombre des kystes dans les tissus devraient varier en fonction de l'espèce hôte, ce qui complique grandement leur détection (Tenter et al. 2000; Dubey 2010). La recherche des kystes tissulaires se fait préférentiellement sur le cœur, le cerveau et les muscles (Afssa 2005; Dubey 2010). Une étape préalable de digestion enzymatique est nécessaire pour libérer les bradyzoïtes et augmenter la sensibilité de la détection (Afssa 2005). Pour détecter *T. gondii* dans des échantillons de viande, le bio essai chez la souris et le chat est le test de référence. Cependant, comme mentionné précédemment, ce test est complexe, coûteux et long à mettre en œuvre, ce qui limite son utilisation pour le traitement d'un grand nombre d'échantillons. La quantité limitée de tissus pouvant être analysée par PCR, combinée à la distribution hétérogène des kystes tissulaires, limite sa capacité à détecter l'ADN toxoplasmique malgré la bonne sensibilité de cette technique (Garcia et al. 2006; Hill et al. 2006). De plus, la PCR ne permet pas de déterminer le risque d'infection associé à la consommation de la viande car elle ne donne aucune information sur la viabilité et l'infectiosité des bradyzoïtes dans les kystes tissulaires. Néanmoins, la PCR devrait constituer une bonne alternative au bio essai pour la recherche qualitative et quantitative de kystes dans la viande, particulièrement dans le cadre d'études à grande échelle (Garcia et al. 2006; Opsteegh et al. 2010).

Toxoplasmose chez l'Homme

Une distribution mondiale

Un tiers de la population humaine est infecté par *T. gondii*, ce qui fait de la toxoplasmose l'une des zoonoses parasitaires les plus fréquentes au monde (Tenter et al. 2000). Les résultats d'études de séroprévalence réalisées au cours des 20 dernières années dans le monde, dans la population générale et la population de femmes, ont été synthétisés par Dubey et al (2010) et le groupe de travail de l'Afssa (2005). Ils sont présentés dans la Figure 2. Ces données sont agrégées au niveau national, même si dans la majorité des cas, il s'agit de données de prévalence au niveau d'une population ou d'une région particulière. Dans plusieurs pays, aucune donnée récente de séroprévalence de la toxoplasmose était disponible (non colorés dans la Figure 2).

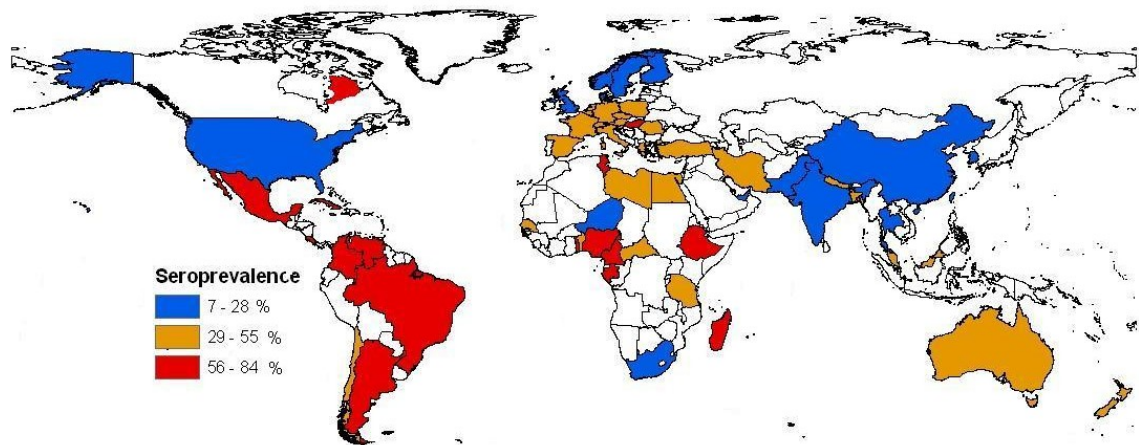


Figure 2. Niveaux de séroprévalence de la toxoplasmose dans le monde au cours des 20 dernières années (d'après Dubey et al (2010) et Afssa (2005)).

Même si ces données ne sont pas comparables du fait de l'utilisation de populations échantillonnées différentes et de tests sérologiques variés, elles montrent la vaste

distribution de *T. gondii* dans le monde et la fréquence élevée de l'infection toxoplasmique dans plusieurs pays. Elles permettent également de dégager certaines tendances géographiques dans la distribution de *T. gondii*. Les séroprévalences sont relativement élevées en Amérique latine et en Afrique de l'Ouest, où le climat chaud et humide pourrait favoriser la survie et la sporulation des oocystes de *T. gondii*, alors que dans les pays où le climat est froid et sec comme en Scandinavie, elles sont relativement faibles (Figure 2). D'ailleurs plusieurs études ont tenté d'expliquer les variations géographiques de la prévalence par les facteurs climatiques (Afssa 2005). D'autres facteurs que les conditions environnementales, comme la population de félinés, les habitudes culinaires, l'hygiène devraient également expliquer ces variations (Dubey 2010). Aux États-Unis, les séroprévalences sont relativement faibles (environ 10%) (Dubey et Jones 2008). Au Canada, très peu d'études ont été réalisées et elles remontent pour la plupart aux années 70. Les niveaux de séroprévalence, difficilement comparables, varient d'une province à une autre, allant de 4.8% chez les femmes enceintes du Manitoba jusqu'à 40.8% chez les femmes enceintes vivant à Montréal (Viens et al. 1977; Sekla et al. 1981; Dabritz et Conrad 2010). La prévalence actuelle de la toxoplasmose dans la population générale canadienne n'est pas connue. En revanche plusieurs études ont été réalisées dans les populations autochtones canadiennes et révèlent des niveaux de séroprévalence étrangement élevés dans les communautés inuites (voir plus loin).

Personnes à risque et symptomatologie

Du dogme d'une infection asymptomatique chez les immunocompétents...

Les études sérologiques ont suggéré que la plupart des infections à *T. gondii* était asymptomatique, entraînant des symptômes principalement chez les fœtus des femmes non immunes infectées en cours de grossesse et chez les personnes immunodéprimées. En cas de transmission intra-utérine des tachyzoïtes, la sévérité de l'infection chez le fœtus dépend du stade de la grossesse. En début de grossesse, l'infection provoque la mort du fœtus ou

du nouveau né ou la naissance d'enfants avec de graves symptômes d'inflammation systémique. Les enfants qui survivent à l'infection souffrent de retards mentaux ou d'autres problèmes neurologiques (Tenter et al. 2000). Lors d'une infection en fin de grossesse, les symptômes sont moins sévères, et la majorité des enfants infectés naissent apparemment sains. Ils développent plus tard essentiellement des lésions oculaires (rétinchoroïdites, strabisme, cécité) (Tenter et al. 2000). Chez les personnes immunodéprimées, des atteintes sévères cérébrales (encéphalites) sont observées, majoritairement à la suite de la réactivation d'une infection acquise antérieurement (Afssa 2005). Dans la population immunocompétente, l'infection est le plus souvent asymptomatique, mais peut être responsable d'atteintes ganglionnaires ou oculaires dans environ 20% des cas, et dans de rares cas d'atteintes cutanées et multi viscérales plus sévères (Afssa 2005).

...Vers la reconnaissance d'une symptomatologie plus complexe

Traditionnellement reconnue chez les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées, la toxoplasmose est de plus en plus considérée comme une infection importante chez les personnes immunocompétentes. Ainsi, les lésions oculaires toxoplasmiques sont maintenant considérées comme principalement dues à des infections acquises plutôt qu'à des infections congénitales (Kijlstra et Jongert 2008). Certaines souches atypiques de *T. gondii* sont particulièrement virulentes même chez les individus immunocompétents et ont également été incriminées dans des cas de toxoplasmose congénitale chez des femmes enceintes immunes (Grigg et Sundar 2009; Lindsay et Dubey 2011). Les viandes importées et les voyages augmentent l'exposition des populations à ce type de souches (Elbez-Rubinstein et al. 2009; Pomares et al. 2011). En Guyane Française où la prévalence du SIDA est importante, l'émergence d'une forme sévère de toxoplasmose acquise associée à des souches atypiques constitue une préoccupation majeure pour les instances de santé publique (Carme et al. 2009). Globalement, la variation dans la sévérité des symptômes suite à l'infection par un même génotype de *T. gondii* suggère que d'autres facteurs que le génotype, incluant le système immunitaire de l'hôte, le stade infectieux et la dose infectieuse influencent la sévérité d'une toxoplasmose chez un individu (Dubey 2010). Plusieurs études ont suggéré une association entre l'infection latente et des modifications

comportementales et psychologiques comme la schizophrénie (McAllister 2005; Yolken et al. 2009). D'ailleurs des études expérimentales chez le rat mettent en évidence la capacité de *T. gondii* à manipuler le comportement de son hôte (Vyas et al. 2007). Ces nouvelles découvertes soulignent la nécessité de réévaluer l'impact de la toxoplasmose en termes de santé publique.

Impact de la toxoplasmose

Malgré le faible risque de toxoplasmose congénitale (1-15 cas pour 10 000 naissances) (EFSA 2007; Dubey et Jones 2008; Villena et al. 2010), son coût socio-économique est élevé du fait de sa sévérité et de son traitement (Kijlstra et Jongert 2008). Dans les pays où la thérapie antirétrovirale n'est pas disponible, l'infection par *T. gondii* est responsable d'encéphalite sévère chez près de 40% des patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et provoque la mort d'environ un tiers de ces patients (Tenter et al. 2000). Chez les individus immunocompétents, les cas symptomatiques de toxoplasmose acquise (environ 20%) devraient être sous-diagnostiqués, notamment les cas de toxoplasmose oculaire (Afssa 2005; EFSA 2007; Dubey et Jones 2008; Villena et al. 2010). Aux États-Unis, jusqu'à 2% des personnes infectés par *T. gondii* développerait des lésions oculaires (Jones et Holland 2010). Dans certaines régions au Brésil, où la prévalence de la toxoplasmose est très élevée (Figure 2), la prévalence de maladie oculaire lors de toxoplasmose acquise est supérieure à 20%, faisant de cette maladie une cause majeure de cécité en Amérique du Sud (EFSA 2007; Ajzenberg 2011). Parmi les infections d'origine alimentaire, la toxoplasmose est responsable d'un des fardeaux de maladie les plus élevés dans plusieurs pays (EFSA 2007; Havelaar et al. 2010; Scallan et al. 2011), du fait de la sévérité des symptômes observés et ce, malgré les relativement rares cas enregistrés. Ainsi, aux États-Unis, la toxoplasmose est considérée comme la deuxième cause de mortalité après la salmonellose et la quatrième cause d'hospitalisation après la salmonellose, la norovirose et la campylobactériose (Scallan et al. 2011). Les Centres pour le contrôle des maladies (CDC) classent cette infection parmi les cinq infections parasitaires négligées aux États-Unis qui sont ciblées en priorité pour des actions de santé publique.

Sources d'infection chez l'Homme

L'Homme s'infecte principalement par ingestion de kystes présents dans les produits carnés ou par consommation d'eau contaminée par les oocystes présents dans les fèces de félinés (Figure 1).

Consommation de produits carnés contaminés par des bradyzoïtes

Cette source d'infection est considérée globalement comme la plus importante dans l'infection humaine (EFSA 2007; Kijlstra et Jongert 2008). Lorsque la viande n'est pas suffisamment cuite (température à cœur inférieure à 67 °C) ou bien dans certains processus de fumage, salage ou séchage de la viande, les bradyzoïtes peuvent rester viables et infectieux (Kijlstra et Jongert 2008). Le risque de contamination associé à la consommation de viande contaminée dépend de la présence, de la distribution et du nombre de kystes tissulaires chez les animaux de boucherie ou le gibier. Le type de viande à risque pour une population va également dépendre de sa culture, de sa religion et de ces méthodes de préparation culinaire (Kijlstra et Jongert 2008). La prévalence de la toxoplasmose est globalement plus importante chez les travailleurs d'abattoir et autres personnes qui manipulent la viande crue contaminée par des kystes toxoplasmiques (Dubey 2010). Un grand nombre d'études de séroprévalence ont été réalisées chez les animaux de consommation et indiquent que l'infection est largement répandue chez de nombreuses espèces (Dubey 2010). En revanche, la recherche de *T. gondii* dans les produits carnés a été rarement effectuée, principalement du fait des difficultés techniques associées (Afssa 2005). Actuellement, les méthodes de détection de *T. gondii* dans les aliments sont encore au stade expérimental (techniques moléculaires) ou bien ne sont pas adéquates à la détection routinière à l'abattoir (EFSA 2007).

Ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par des oocystes

La présence de *T. gondii* chez des végétariens et les récentes épidémies de source environnementale (notamment à partir de l'eau) soulignent l'importance de la transmission d'oocystes dans la toxoplasmose humaine (Benenson et al. 1982; Bowie et al. 1997; Hall et al. 1999; Dubey 2004; de Moura et al. 2006). En 1979, plus de 30 soldats en exercice au Panama ont souffert de toxoplasmose, probablement suite à la consommation d'eau contaminée par des fèces de félinés sauvages (Benenson et al. 1982). En Guyane française, l'origine hydrique de l'infection de soldats en exercice dans la jungle est reconnue et est associée à la découverte de souches de génotype atypique particulièrement virulentes et responsables de formes sévères de toxoplasmose chez des individus immunocompétents (Ajzenberg et al. 2002; Carme et al. 2002). En Amazonie, un cycle sauvage est identifié comme source principale d'infection chez l'Homme. Ce cycle serait efficace pour contaminer les eaux de surface et provoquer des épidémies humaines. Une des plus importantes épidémies de toxoplasmose reliée à la contamination de l'eau par des oocystes a eu lieu sur l'Ile de Vancouver en Colombie Britannique de 1994 à 1995 avec près de 100 cas rapportés (Bowie et al. 1997). Une incidence élevée de toxoplasmose oculaire (environ 21%) était observée lors de cette épidémie (Burnett et al. 1998). Les enquêtes épidémiologiques ont suggéré la consommation d'eau provenant d'un réservoir de distribution comme source de l'épidémie. Malgré la découverte de 11 cougars (*Felis concolor vancouverensis*) infectés sur les 12 tués en 1996 sur l'Ile de Vancouver, dont un excrétaait des oocystes de *T. gondii*, les oocystes n'ont pas pu être détectés dans le réservoir d'eau incriminé (Aramini et al. 1998; Isaac-Renton et al. 1998; Aramini et al. 1999). Au Brésil, près de 300 cas de toxoplasmose ont été diagnostiqués entre 2001 et 2002, et une étude cas témoin a suggéré la consommation d'eau provenant d'un réservoir comme principal facteur de risque d'infection (de Moura et al. 2006). Pour la première fois en situation épidémique, *T. gondii* a été isolé de ce réservoir, probablement contaminé par des fèces de chats lessivées dans le réservoir par les pluies (de Moura et al. 2006). Au Brésil, où la toxoplasmose est endémique, on estime que environ 60% des enfants de 6 à 8 ans ont développé des anticorps anti-*T. gondii* probablement suite à l'ingestion d'oocystes dans l'eau non traitée (Bahia-Oliveira et al. 2003). D'autres épidémies de toxoplasmose reliées à l'eau entre 2004 et 2010 ont été récemment résumées dans Baldursson et Karanis (2011).

Globalement, ces épidémies soulignent l'importance de filtrer l'eau provenant de source à risque de contamination environnementale par des oocystes de félinés sauvages ou de chats domestiques. Dans de rares études, l'ADN de *T. gondii* a été détecté en dehors de tout contexte épidémique, et à des prévalences relativement élevées : 8% dans des échantillons d'eau de surface, souterraine et de consommation dans une région en France et plus de 20% dans des échantillons provenant d'une zone rurale en Pologne (Villena et al. 2004; Sroka et al. 2006; Sroka et al. 2010).

Chez l'Homme, la dose infectieuse pourrait être aussi basse que celle pour le cochon et la souris, chez qui l'ingestion d'un oocyste est suffisante pour induire l'infection (Dubey et al. 1996; Dubey et al. 1997b). Aux Etats-Unis, environ la moitié des 90 millions de chats domestiques ont un accès à l'extérieur et peuvent ainsi déféquer dans l'environnement et potentiellement le contaminer avec des oocystes (Dabritz et Conrad 2010). La population de chats errants n'est pas connue mais des estimations mentionnent qu'elle pourrait atteindre 40 millions (Dabritz et Conrad 2010). Cette population importante de chats domestiques devrait contaminer lourdement l'environnement qui représente un risque infectieux non négligeable pour l'Homme.

Importance relative de ces sources

La relative contribution des différentes sources de *T. gondii* dans l'infection humaine n'est pas connue. L'approche la plus commune utilisée pour l'estimer est l'analyse des facteurs de risque dans une étude épidémiologique (Kijlstra et Jongert 2008). En Europe, grâce à une enquête cas témoin de type prospectif, on estime que 30 à 60% des infections à *T. gondii* sont acquises suite à la consommation de viande, et la source de viande la plus importante varie selon les pays (Cook et al. 2000). Dans l'étude de Cook et al (2000), 14 à 49% des infections restent non expliquées. La prévalence de la toxoplasmose a diminué de façon importante dans les pays développés depuis plusieurs dizaines d'années, et cette diminution est probablement liée aux méthodes modernes d'élevage qui offrent moins d'opportunités à *T. gondii* de se transmettre aux animaux de boucherie (Kijlstra et Jongert 2008). Le maintien d'un certain niveau de contamination

environnementale et notamment hydrique par des oocystes de *T. gondii*, associé à l'augmentation du nombre des personnes non immunisées, devraient améliorer la part de la contamination hydrique dans l'infection humaine. Récemment, la mise au point d'un test capable de détecter spécifiquement les anticorps dirigés contre les sporozoïtes à l'intérieur des oocystes (permettant ainsi de différencier les oocystes des kystes tissulaires comme source d'infection) a permis de découvrir que la contamination de l'eau et des aliments par les oocystes était une cause majeure d'infections chez l'Homme aux Etats-Unis (Boyer et al. 2011; Hill et al. 2011).

Toxoplasmose chez les Inuits

Les Inuits sont des autochtones d'origine asiatique et de langue esquimaude-aléoute dont l'habitat et la civilisation sont historiquement liés au milieu arctique. Les Inuits habitent la Sibérie, le Groenland, l'Alaska (États-Unis) et le Canada. Dans cette partie, nous exposons la problématique de la toxoplasmose dans les populations inuites d'Amérique du Nord ainsi que les voies et les sources d'infection potentielles. La Figure 3 présente la distribution de la population inuite au Canada.

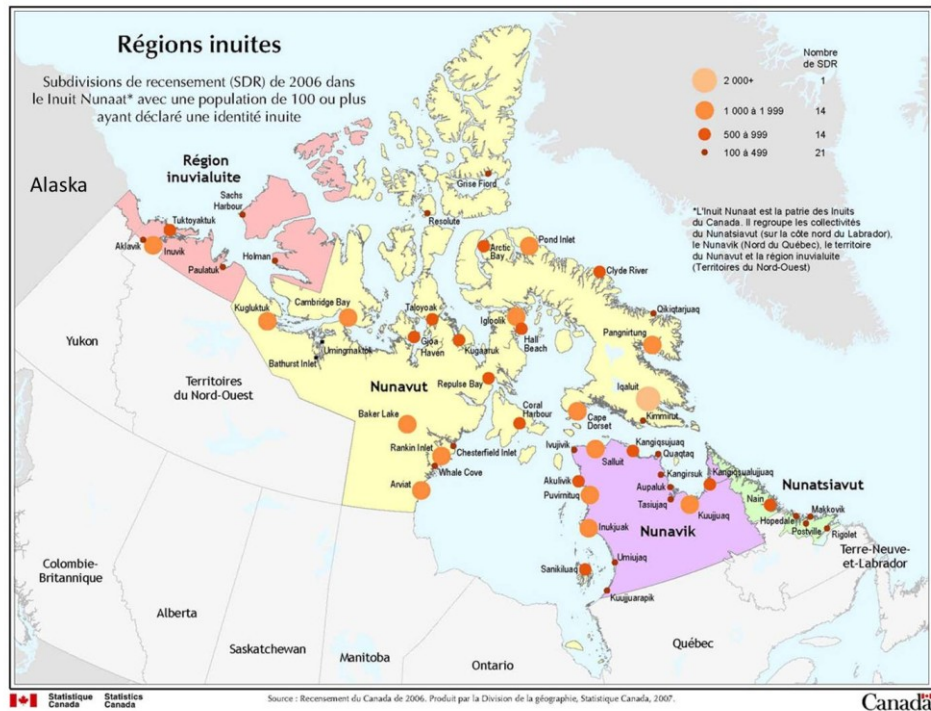


Figure 3. Population inuite dans les différentes provinces et territoires du Canada (recensement du Canada de 2006. Produit par la Division de la géographie, Statistique Canada, 2007).

Une problématique importante de santé publique

Etudes de prévalence

Dans le Tableau II sont présentées toutes les études publiées effectuées chez les Inuits en Amérique du Nord. Les études qui ne distinguaient pas la population inuite des autres populations (blanches et amérindiennes) ne sont pas présentées dans ce tableau. La tranche d'âge des populations étudiées est indiquée étant donné que l'âge est un facteur important à prendre en compte dans l'interprétation des résultats sérologiques. En effet, la séroprévalence augmente en général avec l'âge étant donné que les individus sont exposés à

T. gondii tout au long de leur vie et qu'une fois infecté, les anticorps devraient persister très longtemps (Afssa 2005).

Tableau II. Synthèse des études transversales publiées de séroprévalence de la toxoplasmose chez les Inuits d'Amérique du Nord.

Population	Localité ^a	Période	Séroprévalence (N)	Test utilisé ^b	Référence
Générale 5-39 ans	AL	1956	0% (21)	DT ₁₆	Feldman and Miller (1956)
Générale 10-60+ ans	AL	1970-1971	32.9% (870)	IFAT ₁₆	Peterson et al. (1974)
			19.7% (870)	IHAT ₃₂	
Générale >= 3 ans	TNO	1977-1978	25.0% (104)	IFAT ₂₅₆	Gyorkos (1980)
Hospitalisée 0-40+ ans	NI	1984-1986	48% (759)	IHAT ₂₅₆	Tanner et al. (1987)
Générale 18-74 ans	NI	2004	59.8% (917)	ELISA _{3 UI}	Messier et al. (2009)

^a AL : Alaska (Etats-Unis); NI : Nunavik, Québec (Canada) ; TNO : Territoires du Nord Ouest (Canada).

^b Le seuil diagnostique du test utilisé est indiqué en indice.

Ces études de séroprévalence indiquent un niveau d'infection à *T. gondii* relativement important chez les Inuits et supérieur au 30% de séroprévalence moyenne dans le monde (Figure 2) (Tenter et al. 2000). Les Inuits du Nunavik, dans le Grand Nord québécois (Figure 3) semblent particulièrement exposés avec environ 60% de séropositifs dans la population (Messier et al. 2009). Dans cette région, les niveaux de séroprévalence dans les années 80 sont similaires à ceux plus récents (Tanner et al. 1987; Messier et al. 2009), malgré les importants changements observés dans le mode de vie des communautés au 20^{ème} siècle (sédentarisation, alimentation différente) (Petit et al. 2011). Ce haut degré d'infection dans les populations inuites est surprenant compte tenu du fait de la rareté voire de l'absence de félinidés dans le milieu de vie de ces populations. De plus, globalement, il est assez inhabituel d'observer de fortes séroprévalences dans des pays au climat froid et sec (Figure 2).

Dans la première étude de séroprévalence datant de 1956, aucun anticorps anti-*T. gondii* n'a été détecté parmi les 21 sérums testés (Feldman et Miller 1956). Cependant, la faible taille d'échantillon et la population testée relativement jeune pourraient expliquer la séroprévalence nulle trouvée dans cette étude. La première étude publiée qui a détecté des anticorps anti-*T. gondii* chez les Inuits remonte aux années 70 dans les populations autochtones de l'Alaska (Peterson et al. 1974). Compte tenu de la faible densité de félinés dans cette région, le niveau relativement élevé de la séroprévalence dans les populations inuites avait déjà surpris Peterson et al. (1974). Ces chercheurs ont trouvé une population de chats domestiques plus conséquente que prévu dans les villages et ont conclu sur la nécessité d'évaluer leur importance dans l'infection des Inuits. Dans l'étude de Gyorkos, 55% des sérums échantillonnés ont présenté un certain degré de réactions positives avec le test IFAT, mais seulement 25% avait des titres supérieurs ou égaux au titre diagnostique (1:256) (Gyorkos 1980). L'étude de Tanner et al. (1987) constitue la première enquête de séroprévalence chez les Inuits du Nunavik, effectuée dans le cadre d'un projet sur les infections zoonotiques dans le Grand Nord québécois. Dans cette étude, 74% des Inuits hospitalisés étaient positifs au test sérologique IHAT avec un seuil diagnostique de 1:32 et 48% au seuil de 1:256 qui était le titre diagnostique choisi dans cette étude (Tanner et al. 1987). Réalisée 20 ans après, l'enquête santé Quanuippitaa avait comme objectif de dresser un état de la santé des résidents des 14 communautés du Nunavik (Figure 3). La séroprévalence de l'infection à *T. gondii* était estimée à 59.8% avec le test ELISA qui est le test actuellement le plus utilisé dans le sérodiagnostic de la toxoplasmose humaine (Messier et al. 2009). La séroprévalence était plus importante dans la partie ouest du Nunavik (secteur de la Baie d'Hudson) que dans la partie est (secteur de la Baie d'Ungava) suggérant que le risque infectieux variait entre ces deux régions (Messier et al. 2009). Également, un gradient géographique nord sud de séroprévalence était observé: l'exposition à *T. gondii* semblait plus importante au sud puis décroître en allant vers le nord du Nunavik (Figure 4) (Messier et al. 2009). Pour expliquer ce gradient, on dispose de plusieurs hypothèses : une densité d'HD diminuant du sud vers le nord, différentes espèces de gibier consommées dans les communautés, des variations géographiques dans la prévalence d'infection du gibier, une différence de climat avec une moindre survie des oocystes au nord. En Suède, l'hypothèse d'une relation avec la température pour expliquer un même type de gradient a été mentionnée (Ljungstrom et al. 1995). Tizard et al (1976) ont

également remarqué une corrélation significative entre la séroprévalence dans 10 villes canadiennes et le degré de sécheresse durant l'été (Tizard et al. 1976).

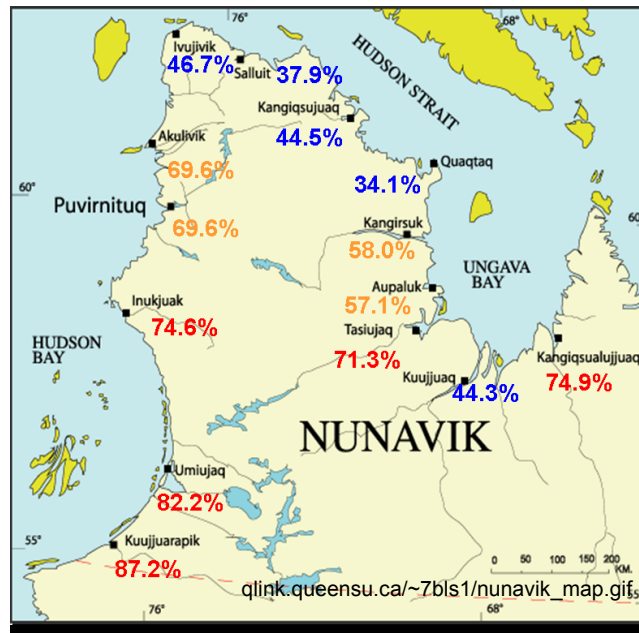


Figure 4. Variations géographiques de la séroprévalence de la toxoplasmose dans la population inuite du Nunavik (les séroprévalences élevées, intermédiaires et faibles sont indiquées respectivement en rouge, jaune et bleu) (d'après (Messier et al. 2009)).

La comparaison de ces différentes études est difficile, notamment du fait de l'utilisation de seuils et de tests sérologiques différents. Cependant, elles soulignent l'aspect endémique de l'infection à *T. gondii* dans les populations inuites d'Amérique du nord, et soulèvent la question des sources infectieuses dans les écosystèmes arctiques dépourvus d'HD.

Situation particulière au Nunavik

Au Nunavik, les séroprévalences observées chez les Inuits sont bien plus élevées que dans le reste du Québec, voire même que dans d'autres communautés autochtones (les Cree) partageant le même écosystème (Tizard et al. 1976; Tanner et al. 1987; Levesque et al. 2007; Messier et al. 2009; Campagna et al. 2011; Sampasa-Kanyinga et al. 2012). D'ailleurs, la toxoplasmose y est reconnue comme l'infection zoonotique la plus fréquente et constitue un problème de santé publique important (Messier et al. 2009).

Programme de dépistage chez la femme enceinte

Le Nunavik est la seule région du Québec où un programme de prévention et de contrôle de la toxoplasmose congénitale est en place. Implanté depuis 1982 dans la partie est du Nunavik (secteur de la Baie d'Ungava), il s'est généralisé en 1987 à l'ensemble du Nunavik suite à des niveaux anormaux de séroconversion chez les femmes enceintes (Proulx 1999). Sur une période de quatre mois, des anticorps ont en effet été détectés en cours de grossesse chez quatre femmes parmi les 30 qui étaient enceintes cette année-là (McDonald et al. 1990). A la suite de cette épidémie, 2 enfants sur 4 avaient des signes cliniques de toxoplasmose congénitale (calcifications cérébrales, kyste ventriculaire, chorioretinite et retard de développement) (McDonald et al. 1990). Le programme consiste en un dépistage prénatal chez les femmes enceintes, des conseils alimentaires pour la prévention de la contamination chez les femmes non immunisées et un protocole d'investigation et de traitement chez les femmes infectées en cours de grossesse ainsi que chez leur enfant (Proulx 1999).

Efficacité du programme de dépistage

La principale raison d'être d'un programme de dépistage de la toxoplasmose congénitale est la mise en place précoce d'un traitement visant à éviter la transmission de *T. gondii* au fœtus ou à limiter la sévérité des symptômes chez les enfants infectés

congénitalement. Cependant, la question du coût bénéfice d'un tel programme, en lien avec l'absence de preuve tangible en faveur de l'efficacité du traitement prénatal, est largement débattue à l'heure actuelle à travers le monde (Ajzenberg 2011).

D'après l'analyse rétrospective de dossiers périnataux de femmes inuites enceintes entre 1994 et 2003, le risque d'infections potentielles en cours de grossesse au Nunavik était de l'ordre de 1 cas pour 1000 grossesses (Lavoie et al. 2008). A titre de comparaison, le risque était d'environ 6 cas pour 1000 grossesses la fin des années 90 en France (Afssa 2005). Aucune conséquence de la toxoplasmose congénitale n'a été observée au cours de la période d'étude (Lavoie et al. 2008).

Impact dans la population générale

L'évaluation de l'impact de la toxoplasmose en termes de santé publique présente des défis particuliers au Nunavik, principalement du fait de la difficulté du suivi médical dans des communautés isolées géographiquement. Si le programme de dépistage a permis de documenter l'absence de toxoplasmose congénitale sur une période de 10 ans, nous n'avons pas de données concernant les cas de toxoplasmose oculaire et de toxoplasmose chez les personnes immunodéprimés qui pourraient être sous-diagnostiqués. Dans cette région hautement endémique et d'après les coûts socio-économiques importants de la toxoplasmose dans plusieurs pays, le fardeau de cette infection devrait être sous-évalué au Nunavik. Basé sur une population d'environ 10 000 Inuits au Nunavik, les données de séroprévalence indiquent que 6000 personnes seraient infectées et, d'après les estimations de Jones et Holland (2010) aux Etats-Unis, plus de 100 personnes parmi ces 6000 développeraient des lésions oculaires.

Recherche des sources d'infection

À ce jour, aucune source d'exposition particulière à *T. gondii* n'a été identifiée mais un lien avec le mode de vie traditionnel autour de la chasse et de la pêche, qui expose les populations inuites aux agents pathogènes présents dans l'environnement et la faune sauvage, est fortement suspecté. Dans cette section, nous présentons les différents facteurs associés à l'infection toxoplasmique d'après les études épidémiologiques.

Eau contaminée

L'enquête Qanuippitaa a conclu à une association positive de la probabilité d'être séropositif avec la consommation d'eau de surface non filtrée ainsi qu'avec la fréquence de nettoyage des réservoirs domestiques (Messier et al. 2009). D'ailleurs, la découverte de bactéries entériques et de *Cryptosporidium* dans le système d'alimentation en eau de villages inuits soulève l'hypothèse de la présence de *T. gondii* dans l'eau potable (Messier et al. 2009). Des échantillons d'eau ont été analysés dans cinq communautés; aucun oocyste de *T. gondii* n'a pu y être détecté par PCR (Messier et al. 2009). Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous avons échantillonné le biofilm d'une quarantaine de réservoirs à Kuujuaq (Figure 4). Malgré l'utilisation du biofilm, qui devrait améliorer la probabilité de détection des oocystes (Angles et al. 2007), aucun oocyste n'a été détecté par PCR dans notre étude (résultats non publiés). Les résultats de ces études de prévalence n'écartent pas l'hypothèse d'une contamination des réservoirs d'eau, mais suggèrent qu'elle ne devrait pas être suffisante pour expliquer le haut niveau de prévalence de la toxoplasmose observé dans les populations inuites du Nunavik.

Consommation et manipulation de viande crue

Les Inuits mangent certaines viandes crues, congelées ou séchées, particulièrement le phoque, le béluga, le morse, le poisson et le caribou, ce qui devrait les exposer aux kystes

potentiellement présents dans les tissus de ces animaux, qui sont normalement détruits par la cuisson (Messier et al. 2009). Forbes et al. (2009) ont évalué la capacité infectieuse de certains mets traditionnels à base de phoque: le nikku (viande séchée), l'igunak (viande fermentée) et les saucisses (viande épicée et salée). Aucune séroconversion ou excrétion d'oocyste n'ont été observées chez les chats qui ont consommé ces mets. Mais le devis de cette étude ne permet pas de conclure à l'absence d'infectivité de ces mets de façon générale (Forbes et al. 2009). De plus, la souche porcine de type III utilisée pour infecter les phoques dans cette étude ne devrait pas être représentative de la ou des souches que l'on retrouve dans l'Arctique, et les auteurs concluent à un besoin de davantage d'études sur ces aliments traditionnels (Forbes et al. 2009). Dans tous les villages alaskiens où Peterson et al. (1974) ont trouvé des Inuits séropositifs, des ruminants étaient consommés au moment du sondage (orignaux, caribous ou cerfs) (Peterson et al. 1974). L'enquête épidémiologique lors de l'épidémie en 1987 a suggéré un certain nombre de sources potentielles d'infection : la consommation fréquente de viande de caribou crue ou insuffisamment cuite, de viande de phoque séchée et de foie de phoque, ainsi que les activités d'écorchage d'animaux à fourrure (loup, renard et martre) (McDonald et al. 1990). Il est toutefois important de noter que les données qui dérivent d'une épidémie de toxoplasmose aiguë, en général liée à une source ponctuelle et occasionnelle d'infection, ne reflètent pas forcément la source d'infection d'intérêt majeur sur le plan épidémiologique pour l'ensemble de la population (Tenter 2009). L'interprétation de ces résultats est également à faire avec précaution du fait d'une faible taille d'échantillons dans cette étude (n=22). Dans l'enquête santé de 2004, la probabilité d'être séropositif augmente avec la fréquence de consommation de viande de phoque et de gibier à plumes (lagopèdes, perdrix, oies et canards) (Messier et al. 2009). Plusieurs études de prévalence montrent que les mammifères marins sont sensibles à l'infection par *T. gondii* (Dubey 2010). Expérimentalement, les phoques développent des kystes tissulaires infectieux (Gajadhar et al. 2004) et seraient donc capable de transmettre l'infection aux Inuits via la consommation de viande crue dans laquelle les kystes restent viables. En conditions naturelles, des toxoplasmes viables ont été isolés d'un phoque commun du Pacifique (*Phoca vitulina richardsi*) et d'un lion de mer californien (*Zalophus californianus*) (Miller et al. 2001; Conrad et al. 2005).

La consommation et la manipulation de viande crue semblent être les sources principales d'infection pour les Inuits. L'eau ne devrait pas être une source importante comme suggéré par les résultats de notre étude, mais également par les différences de séroprévalence observées entre les amérindiens et les Inuits. En effet, plusieurs études ont montré que la séroprévalence chez les amérindiens est très inférieure à la séroprévalence chez les Inuits alors que les amérindiens, vivant dans un milieu plus propice aux félidés, devraient être davantage exposés aux oocystes présents dans l'eau (Tanner et al. 1987; Levesque et al. 2007; Campagna et al. 2011). Les habitudes culinaires diffèrent entre ces deux groupes ethniques au mode de vie très proche, ce qui suggère que la cuisson de la viande chez les amérindiens, en détruisant les kystes toxoplasmiques, devrait protéger cette population de l'infection par *T. gondii* en comparaison avec les Inuits qui consomment traditionnellement leur viande crue.

Stratégies de prévention

Les recommandations pour prévenir la contamination des femmes enceintes du Nunavik tournent essentiellement autour de la consommation des viandes traditionnelles qui doit être évitée à moins de bien cuire la viande. Ces recommandations concernent uniquement la population des femmes enceintes non immunisées et touchent tous les types de viande traditionnelle, étant donné qu'aucune source d'infection particulière n'a été identifiée actuellement. L'élargissement de ces recommandations à l'ensemble de la population inuite n'est pas envisageable. En effet, la consommation de viande traditionnelle crue chez les Inuits, en particulier provenant de mammifères marins, est importante sur les plans socioculturels et économiques. Cette composante clef de l'identité inuite est d'ailleurs vivement encouragée par les instances de santé publique pour son apport nutritionnel bénéfique. Les stratégies de prévention de la toxoplasmose associée à la viande de chasse doivent donc être adaptées au contexte particulier des populations inuites. La décontamination de la viande par destruction des kystes toxoplasmiques n'est pas possible. En effet, la cuisson de la viande n'est pas culturellement acceptable et la congélation,

nécessitant une certaine température et une certaine durée de traitement pour être efficace (Kijlstra et Jongert 2008), est difficile techniquement et culturellement à mettre en place. Pour améliorer la prévention de la toxoplasmose dans le contexte particulier du Nunavik et éventuellement l'élargir à l'ensemble de la population inuite, il est donc essentiel de cibler davantage les sources d'infection pour cette population. Dans la suite de la revue, nous avons synthétisé les différentes études de prévalence de *T. gondii* dans la faune, en partie afin de tenter d'évaluer qualitativement l'importance potentielle des différentes espèces chassées par les Inuits dans la contamination de ces derniers.

Epidémiologie de la toxoplasmose dans l'Arctique Canadien

Dans la suite de l'exposé, nous faisons référence à l'Arctique et au Subarctique, zones que nous présentons dans la Figure 5. L'Arctique est souvent défini comme la région où la température moyenne pendant le mois le plus chaud est en dessous de 10 °C ; cette limite correspond à la ligne rouge sur la carte de la Figure 5. Le Subarctique correspond grossièrement à la zone couverte par la forêt boréale et est limité au Nord par la ligne des arbres (Figure 5). La population inuite d'Amérique du Nord vit dans la zone de l'Arctique.

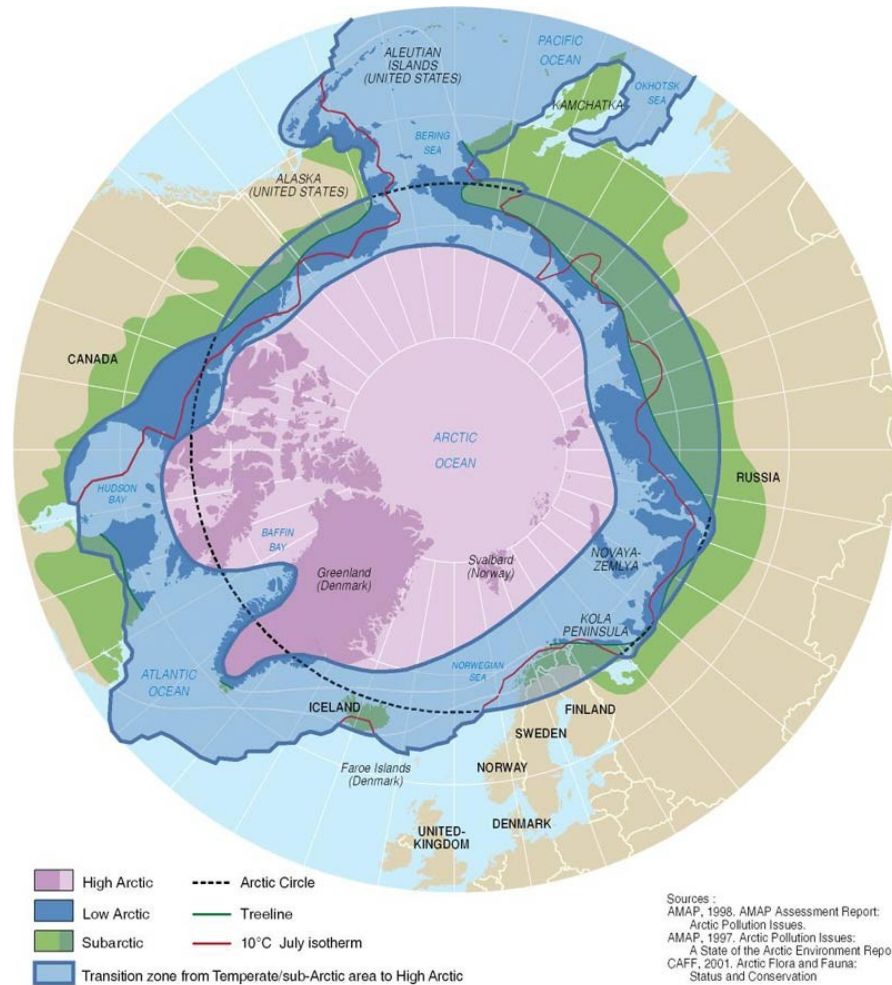


Figure 5. Définition des frontières géographiques de l'Arctique et du Subarctique.

La toxoplasmose dans les écosystèmes terrestres (sub)arctiques

Prévalence dans la faune terrestre

Plusieurs études de séroprévalence chez les mammifères terrestres (sub)arctiques d'Amérique du Nord ont été publiées. Nous les présentons dans le Tableau III. Les différentes couleurs, caractérisant la place des espèces dans la chaîne alimentaire (carnivores, omnivores ou herbivores), indiquent la voie la plus probable de contamination des hôtes (par les kystes via la prédation ou par les oocystes via le contact avec

l'environnement contaminé). Ces études de séroprévalence, en majorité réalisées en Alaska, indiquent que *T. gondii* est présent dans les écosystèmes terrestres de l'Arctique et du Subarctique américain. La séroprévalence varie d'une espèce à l'autre mais également à l'intérieur d'une même espèce. Les résultats sérologiques de ces études, difficilement comparables du fait de protocoles différents, permettent toutefois de dégager certaines tendances intéressantes.

Carnivores et omnivores

On dispose de peu de données sur la prévalence d'infection chez le lynx du Canada (*Lynx canadensis*). Il pourrait être important dans la transmission de *T. gondii* au niveau des zones nordiques canadiennes car, mis à part le chat domestique, il s'agit du seul représentant de la famille des félidés, et donc de la seule espèce source d'oocystes. Expérimentalement, les lynx sont capables d'excréter des oocystes, mais leur capacité d'excrétion n'a jamais été évaluée en conditions naturelles (Miller et al. 1972). En Suède ils pourraient être responsables du maintien de *T. gondii* dans la faune sauvage (Ryser-Degiorgis et al. 2006). De manière générale, de fortes séroprévalences sont observées chez les lynx dans le monde (44 à 88%), lesquelles contrastent avec la proportion de lynx séropositifs trouvée en Alaska (15%) (Zarnke et al. 2001; Jones et Dubey 2010).

Globalement, les séroprévalences sont moins élevées chez les carnivores que chez les omnivores terrestres, probablement du fait que le régime alimentaire de ces derniers les expose à la fois aux kystes tissulaires et aux oocystes présents dans l'environnement (Elmore et al. 2012). Ainsi, les deux espèces d'ours nord américaines et les carcajous (*Gulo gulo*) semblent particulièrement exposés en Alaska et au Nunavut. La prévalence de *T. gondii* chez les renards arctiques (*Alopex lagopus*) d'Amérique du Nord est inconnue, mais elle pourrait être importante. En effet, au Svalbard (archipel norvégien de l'Océan Arctique), de hauts niveaux de séroprévalence sont observés chez les renards arctiques et des cas de toxoplasmose aiguë ont également été signalés, soulignant l'impact potentiellement important de l'infection à *T. gondii* chez cette espèce (Sorensen et al. 2005; Prestrud et al. 2007).

Tableau III. Synthèse des études transversales publiées de séroprévalence de la toxoplasmose chez différentes espèces de mammifères terrestres (sub)arctiques d'Amérique du Nord.

Espèce	Région ^a	Période	Séroprévalence (N)	Test utilisé ^b	Référence
Lynx du Canada (<i>Lynx canadensis</i>)	AL	?	15.3% (255)	MAT ₂₅	Zarnke et al. (2001)
	QC	1997-1998	44.3% (106)	MAT ₂₅	Labelle et al. (2001)
Loup (<i>Canis lupus</i>)	AL	1976-1996	8.8% (125)	MAT ₂₅	Zarnke et al. (2000)
		1996-2008	17.8% (320)	MAT ₃₂	Stieve et al. (2010)
Coyote (<i>Canis latrans</i>)	AL	2005	0% (12)	MAT ₃₂	Stieve et al. (2010)
Grizzly (<i>Ursus arctos</i>)	AL	1973-1987	24.7% (892)	MAT ₂₅	Zarnke et al. (1997)
		1988-1991	18.0% (480)	LAT ₆₄	Chomel et al. (1995)
Ours noir (<i>Ursus americanus</i>)	AL	1988-1991	15.0% (40)	LAT ₆₄	Chomel et al. (1995)
		1976-1996	43.4% (143)	MAT ₂₅	Zarnke et al. (2000)
Renard roux (<i>Vulpes vulpes</i>)	AL	1985-2006	12.5% (8)	MAT ₃₂	Stieve et al. (2010)
Carcajou (<i>Gulo gulo</i>)	NU	2006-2007	41.5% (41)	MAT ₂₅	Reichard et al. (2008)
Orignal (<i>Alces alces</i>)	AL	1974-1982	22.7% (110)	IHAT ₆₄	Kocan et al. (1986)
		1976-1996	1.3% (240)	MAT ₂₅	Zarnke et al. (2000)
		2001-2005	0% (202)	MAT ₃₂	Stieve et al. (2010)
Caribou (<i>Rangifer tarandus</i>)	AL	1976-1996	6.6% (241)	MAT ₂₅	Zarnke et al. (2000)
		1994-2006	0.4% (452)	MAT ₃₂	Stieve et al. (2010)
	TNO, NU	1993-1994	36.7% (117) 4.3% (23)	MAT ₂₅	Kutz et al. (2001)
	TNO	2003-2006	2.9% (104)	IHAT ₆₄	Johnson et al. (2010)
Bœuf musqué (<i>Ovibos moschatus</i>)	NI	?	62.5% (40)	DT ₂	McDonald et al. (1990)
	TNO, NU	1991	40.0% (10)	MAT ₂₅	Kutz et al. (2000)
Mouflon de Dall (<i>Ovis dalli</i>)		1994, 1998	4.7% (193)		
	AL	1976-1996	6.9% (319)	MAT ₂₅	Zarnke et al. (2000)
Cerf hémione (<i>Odocoileus hemionus</i>)	AL	1980-2000	0% (55)	MAT ₃₂	Stieve et al. (2010)

■ Carnivores ■ Omnivores ■ Herbivores

^a AL : Alaska (Etats-Unis); NI : Nunavik, Québec (Canada) ; NU : Nunavut (Canada) ; QC : Québec (Canada) ; TNO : Territoires du Nord Ouest (Canada) ; YU : Yukon (Canada).

^b Le seuil diagnostique du test utilisé est indiqué en indice.

Herbivores

Globalement, le niveau de séropositivité est moins élevé chez les espèces herbivores que chez les espèces carnivores et omnivores. En effet, la probabilité de contamination des herbivores par ingestion d'oocystes disséminés dans l'environnement devrait être plus faible que celle des carnivores et omnivores par consommation de proies qui concentrent les toxoplasmes dans leurs tissus. Un processus de bio-magnification de *T. gondii* dans la chaîne alimentaire permet ainsi une exposition plus importante des carnivores versus des herbivores (Smith et Frenkel 1995). Les séoprévalences chez les herbivores terrestres de l'Arctique et du Subarctique américains varient entre 0 et 20%, et ce faible niveau de séoprévalence se retrouve également dans d'autres régions de l'Arctique chez le caribou (*Rangifer tarandus*), différentes espèces de cerfs et les orignaux (*Alces alces*) (Elmore et al. 2012). Dans certaines régions, le caribou pourrait être un important réservoir sauvage de *T. gondii*, comme le cerf à queue blanche (*Odocoileus virginianus*) aux Etats-Unis (Dubey et al. 2009). Au Nunavik, McDonald et al. (1990) ont trouvé une séoprévalence très élevée chez le caribou (62.5%); cependant, l'utilisation du test de lyse, reconnu pour manquer de spécificité chez la vache (apparition de faux positifs), pourrait avoir mené à surestimer la séoprévalence dans cette étude. D'ailleurs, Leclair and Doidge (2001), dans une autre étude réalisée entre 1996 et 2000 (étude non publiée) et utilisant le test MAT (seuil 1:25), ont trouvé des séoprévalences de 1.2% (1/82) et 0.7% (4/535) dans les deux troupeaux de caribous du Nunavik, suggérant que dans cette région les caribous ne devraient pas constituer des réservoirs importants de *T. gondii*.

L'exposition des herbivores aux oocystes de *T. gondii* devrait varier en fonction de la densité des HD dans leurs territoires. Plusieurs études ont mentionné le rôle important des félinés et plus particulièrement des chats dans l'épidémiologie de la toxoplasme, et leur absence de certains écosystèmes insulaires a été invoquée pour expliquer la rareté voire l'absence de *T. gondii* dans ces milieux (Munday 1972; Wallace et al. 1972; Dubey et al. 1997a). Dans les communautés inuites, les chats domestiques ne sont pas populaires comme animaux domestiques et cet environnement n'est pas favorable à leur vie en dehors des maisons (températures froides et chiens en densité importante). Dans le Subarctique américain, peu densément peuplé par l'Homme, les populations de chats devraient être éparpillées sur un vaste territoire. Par contre, cette région, majoritairement couverte par la

forêt boréale, offre globalement un habitat optimal pour le lynx du Canada (Mowat et al. 2000). Leur aire de répartition est limitée par la ligne des arbres, qui devrait ainsi délimiter les territoires contaminés par des oocystes de ceux qui ne le sont pas. La séroprévalence chez les caribous est globalement plus élevée dans les populations continentales (36.7%) qui utilisent des territoires qui chevauchent l'aire de répartition des lynx que dans les troupeaux insulaires (4.3%) où les lynx sont *a priori* absents (Tableau III) (Kutz et al. 2001). Les séroprévalences trouvées chez le bœuf musqué (*Ovibus moschatus*), espèce vivant dans la toundra, appuie également ces variations dans la contamination environnementale (Kutz et al. 2000). Ainsi, comme illustré dans la Figure 6, la séroprévalence chez les caribous et les bœufs musqués diminue en allant vers le nord, plus on s'éloigne de l'habitat du lynx (forêt boréale). Les relativement faibles séroprévalences chez les caribous du Nunavik suggèrent d'autres facteurs influençant l'infection par *T. gondii* que la distribution du lynx. Dans d'autres régions du Subarctique, plusieurs études ont également trouvé un gradient nord sud dans la séroprévalence chez des espèces d'herbivores, qui était plus élevée chez les cervidés du sud que chez les cervidés du nord où les félidés sont plus rares (Vikoren et al. 2004; Jokelainen et al. 2010; Malmsten et al. 2011). La proximité à la ligne des arbres (et donc à l'habitat du lynx) a également été identifiée comme un facteur important dans l'exposition à *T. gondii* d'une espèce omnivore, le carcajou (Reichard et al. 2008). A une échelle moins locale, le climat qui influence la survie des oocystes dans l'environnement est également un facteur qui pourrait faire varier l'exposition de la faune. Ainsi, pour expliquer les différences de séroprévalence entre les populations de lynx du sud du Québec et celles d'Alaska, Labelle et al. (2001) suggèrent les variations climatiques entre les deux régions.

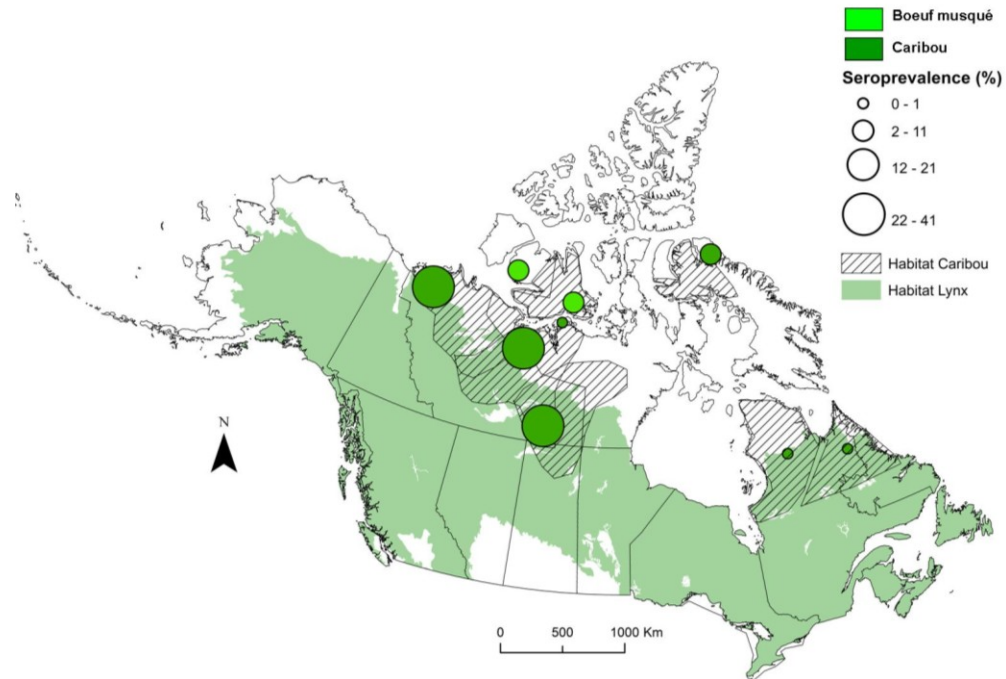


Figure 6. Gradient nord sud dans la séroprévalence de la toxoplasmose chez le caribou (*Rangifer tarandus*) et le bœuf musqué (*Ovibos moschatus*) des régions (sub)arctiques du Canada (d'après Kutz et al. 2000, 2001).

A priori, aucune donnée sur la prévalence d'infection chez les oiseaux et les lièvres des régions nordiques américaines n'a été publiée. Ces hôtes pourraient pourtant jouer des rôles importants dans l'épidémiologie de la toxoplasmose dans les régions nordiques (voir plus loin). Au Nunavik, Leclair et Doidge (1998) ont trouvé des séroprévalences de 4.2% (1/24) chez des oies et de 2.5% (2/79) chez des lagopèdes en utilisant le MAT à un seuil de 1:25 (données non publiées).

Les études mentionnées ci-dessus ont été réalisées en grande majorité chez des espèces dont tout ou une partie du territoire chevauche l'aire de répartition des lynx du Canada. Cependant, la détection d'anticorps chez les bœufs musqués qui n'ont pas de contact avec l'habitat du lynx ainsi que chez les renards arctiques de l'Archipel du Svalbard où aucun félinid n'est présent soulève la question des voies d'introduction de *T. gondii* dans les zones arctiques dépourvues de félinidés.

Introduction de *Toxoplasma gondii* via les espèces migratrices

Le transport de *T. gondii* sur de vastes distances par les migrations aviaires a été suggéré comme mécanisme d'exposition à *T. gondii* des renards arctiques au Svalbard, une région dépourvue de félidés (Prestrud et al. 2008). Les bernaches nonnettes (*Branta leucopsis*) revenant d'Ecosse pourraient être une source d'infection importante pour les renards arctiques du Svalbard (Prestrud et al. 2007). Plus encore, la découverte chez ces derniers de souches de *T. gondii* des types II et III, qui sont des souches isolées dans les cycles domestiques à travers le monde, suggère que le Svalbard et potentiellement l'ensemble des régions arctiques ne sont pas isolés des cycles épidémiologiques mondiaux de *T. gondii* (Prestrud et al. 2008). L'introduction de *T. gondii* dans l'Arctique Canadien pourrait également se faire via les migrations aviaires. De nombreuses espèces d'oiseaux entreprennent des migrations sur de longues distances à travers le continent américain, nidifiant dans l'Arctique et hivernant au Sud. Exposés potentiellement à des environnements contaminés par des oocystes durant leur trajet de migration ou leur hivernage, des oiseaux migrateurs comme les oies pourraient permettre l'introduction saisonnière de *T. gondii* dans le réseau trophique de l'Arctique. D'ailleurs, Dubey et al. (2004) ont découvert chez une oie infectée (bernache du Canada, *Branta canadensis*) une souche de *T. gondii* de type III. L'introduction de *T. gondii* dans l'Arctique Canadien pourrait également s'effectuer via les migrations de caribous. Ces derniers, devenant infectés dans leurs aires d'hivernage potentiellement contaminées par des lynx, remonteraient par la suite vers leurs zones de mise bas dans la toundra arctique. Porteurs de kystes tissulaires, ils pourraient ainsi constituer des sources infectieuses majeures pour les prédateurs qui les consomment, à l'image des cervidés suédois (Ryser-Degiorgis et al. 2006). Ces migrations ont été suggérées comme mécanisme permettant l'exposition des grizzly (*Ursus arctos*) dans le nord de l'Alaska, où les densités de lynx sont faibles (Zarnke et al. 1997). Plus d'études sont nécessaires pour évaluer l'importance de cette voie de propagation de *T. gondii* dans l'exposition de la faune terrestre de l'Arctique Canadien.

La toxoplasmose dans les écosystèmes marins (sub)arctiques

Prévalence dans la faune marine

Plusieurs études de séroprévalence de la toxoplasmose chez les mammifères marins de l'Arctique et du Subarctique américain ont été publiées. Nous les présentons dans le Tableau IV à la page suivante.

Les différentes études réalisées dans la faune marine de l'Arctique américain démontrent la présence de *T. gondii* dans le milieu marin. Comparée aux études sur la faune terrestre, la séroprévalence est relativement faible chez les mammifères marins, voire nulle dans certaines populations. Les études sont réalisées à une échelle très locale avec une grande majorité concentrées autour de l'Alaska. Globalement, très peu d'études sont réalisées chez les pinnipèdes. Le phoque annelé (*Phoca hispida*) est une espèce d'un intérêt particulier, étant donné son importance dans l'alimentation traditionnelle des populations inuites.

La séroprévalence chez les ours polaires (*Ursus maritimus*) de l'ouest de l'Arctique américain est faible comparée à celle trouvée chez les ours polaires du Svalbard (environ 50%) (Jensen et al. 2010). Jensen et al. (2010) suggèrent que les courants marins de l'Atlantique Nord, associés au transport et à la survie des oocystes, devraient être davantage favorables à l'exposition des proies consommées par les ours que ceux présents dans les zones marines de l'Alaska (voir plus loin). Comme super prédateurs, les ours polaires devraient s'infecter via la prédation de phoques annelés et de phoques barbus, qui sont leurs proies principales et chez lesquels des anticorps anti-*T. gondii* ont été détectés en Alaska (Dubey et al. 2003). Un autre point intéressant est la différence de prévalence d'infection entre *Trichinella* et *Toxoplasma* dans une même population d'ours polaires (Rah et al. 2005). Ces parasites utilisent la même voie de transmission pour infecter les ours, c'est-à-dire la consommation de kystes tissulaires présents dans les proies ou dans les charognes. Pourtant, la séroprévalence pour la trichinellose est dix fois plus élevée que pour la toxoplasmose. Le cycle de transmission des trichines pourrait être ainsi plus efficace dans les écosystèmes arctiques par rapport à celui des toxoplasmes.

Tableau IV. Synthèse des études transversales publiées de séroprévalence de la toxoplasmose chez différentes espèces de mammifères marins des régions (sub)arctiques d'Amérique du Nord.

Espèce	Région ^a	Période	Séroprévalence (N)	Test utilisé ^b	Référence
Ours polaire (<i>Ursus maritimus</i>)	NU	1997	0% (60)	ELISA ₅₀	Philippa et al. (2004)
	AL, YU, TNO	1982-1994	5.4% (389)	LAT ₆₄	Rah et al. (2005)
	AL	2005-2006	13.2% (136)	LAT ₁₆	Kirk et al. (2010)
Morse (<i>Obobenus rosmarus</i>)	AL	1976-1998	5.6% (53)	MAT ₂₅	Dubey et al. (2003)
Phoque annelé (<i>Phoca hispida</i>)	AL	1976-1998	15.6% (32)	MAT ₂₅	Dubey et al. (2003)
Phoque barbu (<i>Erignathus barbatus</i>)	AL	1976-1998	50.0% (8)	MAT ₂₅	Dubey et al. (2003)
Phoque commun (<i>Phoca vitulina</i>)	AL	1976-1998	16.4% (311)	MAT ₂₅	Dubey et al. (2003)
Phoque à ruban (<i>Phoca fasciata</i>)	AL	1976-1998	0% (14)	MAT ₂₅	Dubey et al. (2003)
Phoque veau marin tacheté (<i>Phoca largha</i>)	AL	1976-1998	11.1% (9)	MAT ₂₅	Dubey et al. (2003)
Phoque à capuchon (<i>Cystophora cristata</i>)	QC	1996-1997	1.7% (60)	MAT ₂₅	Measures et al. (2004)
Phoque du Groenland (<i>Phoca groenlandica</i>)	QC	1996-1997	0% (112)	MAT ₂₅	Measures et al. (2004)

^a AL : Alaska (Etats-Unis); NI : Nunavik, Québec (Canada) ; NU : Nunavut (Canada) ; QC : Québec (Canada) ; TNO : Territoires du Nord Ouest (Canada) ; YU : Yukon (Canada).

^b Le seuil diagnostique du test utilisé est indiqué en indice.

Ces études ainsi que de nombreuses autres réalisées chez les mammifères marins à travers le monde (Dubey 2010) suggèrent que *T. gondii* est présent dans les écosystèmes marins, ce qui est surprenant si on considère l'absence d'HD dans ces écosystèmes. La voie d'introduction de *T. gondii* dans les écosystèmes marins questionne de nombreux chercheurs (Dubey 2010).

Apport d'oocystes par les rivières

L'hypothèse d'une contamination globale des océans par des oocystes transportés par les rivières est avancée pour expliquer la découverte de *T. gondii* chez de nombreuses espèces de mammifères marins. Ce mécanisme de contamination est documenté pour *Cryptosporidium* et *Giardia*, des protozoaires apparentés à *T. gondii* (Ferguson et al. 2003). Plusieurs études ont détecté ces protozoaires dans les eaux douces, et dans une moindre mesure dans les eaux côtières et marines (Robertson 2007). Très peu d'étude ont détecté *T. gondii* dans l'eau (voir précédemment) et à notre connaissance la présence de *T. gondii* dans les eaux côtières et marines n'a jamais été démontrée. On ne dispose donc que de preuves indirectes en faveur de la transmission hydrique de *T. gondii* aux mammifères marins. Les effluents d'égout ont été fortement suspectés dans le cas d'une méningo-encéphalite toxoplasmique chez un lamantin (*Trichechus manatus*) (Oksanen et al. 1998). La proximité avec des villes et des populations de chats domestiques a été identifiée comme facteur de risque d'infection des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent (Mikaelian et al. 2000). Inversement, une faible exposition aux eaux usées pourrait expliquer l'absence d'anticorps chez des mammifères marins d'Atlantique Nord (Oksanen et al. 1998). Dans le milieu marin, des souches de type II ont été isolées de loutres de mer et de dauphins, suggérant que le milieu marin devrait être connecté au milieu terrestre (Dubey et al. 2008a; Dubey et al. 2011). De plus un lien phylogénétique a été récemment établi entre les écosystèmes terrestre et marin avec la découverte d'une souche particulière (génotype de type 12) chez les loutres et les carnivores terrestres vivant dans une même région côtière (Miller et al. 2008). À notre connaissance, aucune souche de *T. gondii* n'a été isolée de mammifères marins de l'Arctique.

Sources d'infection des mammifères marins

Du fait essentiellement de l'énorme dilution des oocystes dans les océans, la contamination des mammifères marins directement par l'eau de boisson est improbable. Cependant, des comportements spécifiques chez certains mammifères marins, comme le toilettage ou l'ingestion de sédiments, pourraient favoriser la contamination directe par les

oocystes (Mikaelian et al. 2000; Conrad et al. 2005). La découverte de 100% de séropositivité chez des dauphins échantillonnés aux Etats-Unis, alors que ces cétacés boivent très peu voire pas d'eau, suggère d'autres modes de contamination (Dubey et al. 2003). De nombreuses espèces de mammifères marins sont piscivores ou se nourrissent d'invertébrés. Des oocystes pourraient être concentrés dans ce type de proies. Plusieurs chercheurs proposent que la grande capacité de filtration des mollusques permettrait de concentrer suffisamment les oocystes pour constituer des sources de contamination pour les mammifères marins qui les consomment (Arkush et al. 2003; Lindsay et al. 2004; Conrad et al. 2005). Les contaminations expérimentales de crustacés ou de coquillages ont démontré que ce mécanisme de concentration des oocystes était plausible (Arkush et al. 2003; Fayer et al. 2004; Lindsay et al. 2004). Les loutres de mer californiennes, grandes consommatrices de mollusques, devraient se contaminer par prédation de ces invertébrés, comme suggéré par la découverte chez une moule d'une souche de *T. gondii* communément isolée de loutres de mer le long des côtes californiennes (Miller et al. 2008). Si l'infection des mammifères marins à partir de ces sources est envisageable, il convient néanmoins de rester prudent car on ne sait rien de la capacité infectieuse des oocystes chez ces hôtes. De plus même si ces derniers seraient capables de survivre et de sporuler pour devenir infectant dans l'eau de mer, on ne connaît pas l'effet de ces conditions à long terme sur leur viabilité (Lindsay et al. 2003; Gajadhar et al. 2004; Lindsay et Dubey 2009).

Contamination de l'Océan Arctique via la fonte de la neige

Chez les loutres de mer californiennes, le risque d'être séropositif pour la toxoplasmose augmente avec l'importance des écoulements d'eau douce (Miller et al. 2002; Conrad et al. 2005). Ce lien a d'ailleurs été identifié pour plusieurs protozoaires qui peuvent se transmettre par l'eau comme *Sarcocystis*, *Cryptosporidium* et *Giardia* (Ferguson et al. 2003; Miller et al. 2010). Ainsi, les événements extrêmes de pluie sont responsables de la mobilisation des agents pathogènes dans les cours d'eau jusqu'aux zones côtières marines (Ferguson et al. 2003). Dans le bassin versant de l'Arctique canadien, les écoulements d'eau sont concentrés sur la relativement courte période des crues printanières, dues majoritairement à la fonte d'un grand volume de neige accumulée pendant l'hiver.

Cette forte connexion hydrique au printemps entre les régions subarctiques et arctiques pourrait permettre un apport rapide et intense d'agents pathogènes, suffisamment important pour exposer de façon significative les organismes aquatiques de l'Arctique. Le risque d'exposition devrait ainsi varier spatialement et temporellement, dépendant du processus de fonte printanière. Chez les mammifères marins, des variations dans la séroprévalence en fonction de la localisation ou du temps de résidence dans les régions côtières contaminées ont également été identifiées (Miller et al. 2002; Hanni et al. 2003; Measures et al. 2004; Gaydos et al. 2007). Une autre voie d'introduction et de propagation de *T. gondii* dans l'Arctique pourrait être ainsi via le transport d'oocystes dans l'eau de la fonte printanière, laquelle devrait être contaminée au sud par des félinés. Les mécanismes impliqués dans l'apport des oocystes par les rivières ne sont pas bien compris actuellement, et l'importance de cette voie dans l'exposition et l'infection des organismes aquatiques et des mammifères marins en particulier mérite d'être davantage étudiée.

Cadre conceptuel de transmission de *Toxoplasma gondii* dans l'Arctique Canadien

D'après les éléments discutés précédemment, nous proposons dans la Figure 7 (page suivante) un cadre conceptuel de transmission de *T. gondii* dans les régions (sub)arctiques d'Amérique du Nord. La liste des différentes espèces dans la Figure 7 n'est pas exhaustive, mais présente les espèces connues pour être infectées par *T. gondii* ou jouant un rôle potentiellement clé dans les cycles de transmission de ce parasite dans l'Arctique Canadien.

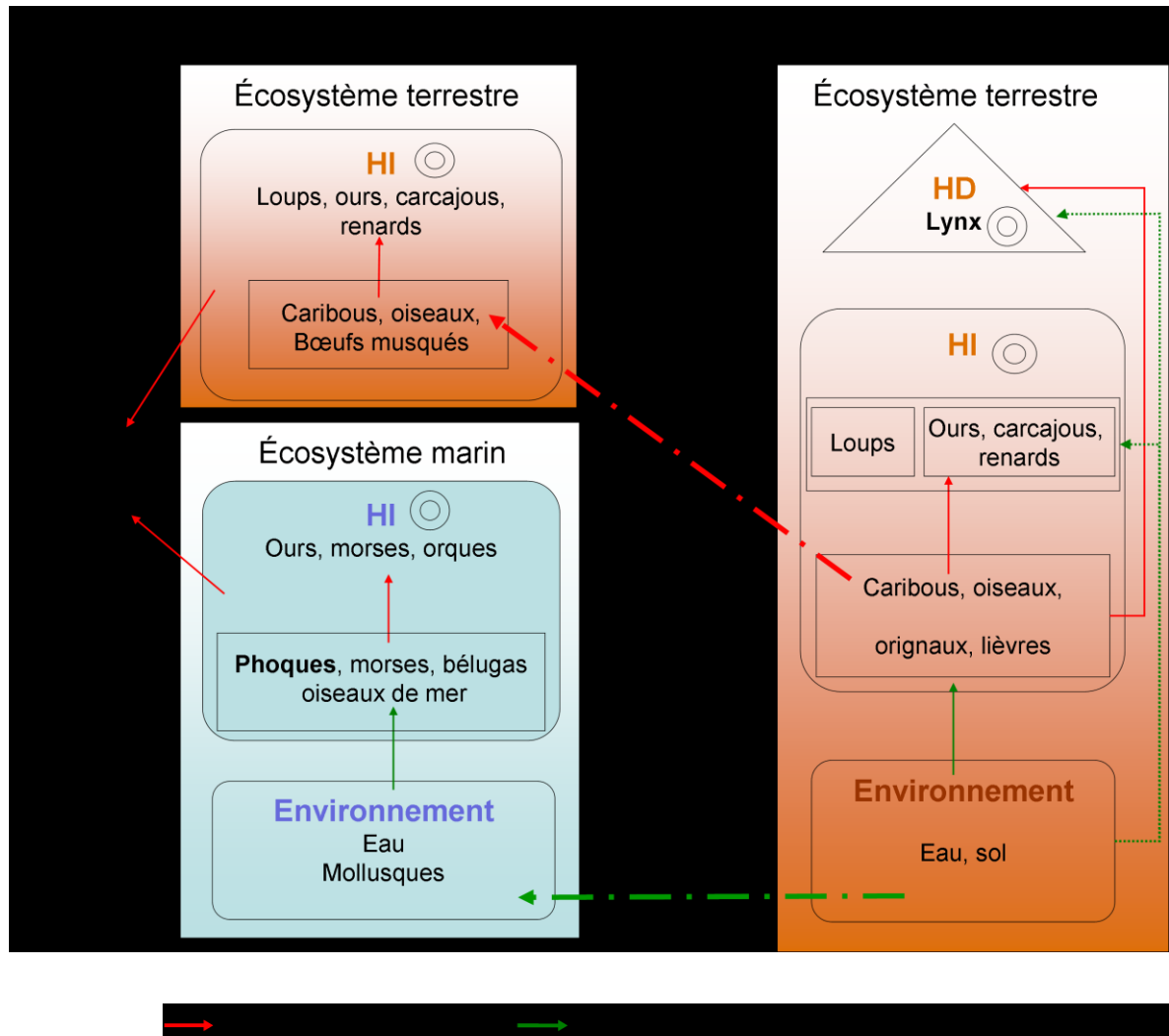


Figure 7. Cycles de transmission de *Toxoplasma gondii* dans les régions (sub)arctiques d'Amérique du Nord (HD = Hôte Définitif, HI = Hôte Intermédiaire).

Les migrations animales et le transport hydrique printanier des oocystes devraient être les deux modes de propagation possibles de *T. gondii* dans l'Arctique Canadien où les HD sont absents. Le lynx du Canada, vivant dans la forêt boréale en Amérique du Nord, excrète des oocystes qui sont ensuite ingérés par des espèces herbivores et omnivores résidentes (orignaux, lièvres) ou migratrices (caribous, oiseaux). Ces espèces deviennent alors des sources d'infection pour les prédateurs carnivores (lynx, lous) et omnivores (carcajous, renards et ours). Ces derniers peuvent également s'infecter par l'ingestion d'oocystes présents dans les baies et autres végétaux contaminés. Comme pour le chat

domestique, le niveau d'infection chez les lynx devrait être conditionné par le taux d'infection de ses proies, et plus particulièrement du lièvre d'Amérique (*Lepus americanus*) qui constitue 75% de son régime alimentaire (Mowat et al. 2000; Afonso et al. 2007). Le transport dans les eaux de fonte printanière d'oocystes de *T. gondii* excrétés par les lynx dans l'environnement subarctique jusqu'aux zones côtières et marines de l'Arctique Canadien permettrait l'exposition des mammifères marins à *T. gondii*. Une fois introduit dans l'écosystème marin, *T. gondii* pourrait être transmis via les interactions trophiques et la transmission congénitale (Smith 2009). La perpétuation par reproduction asexuée permettrait ainsi un certain maintien du parasite dans des communautés écologiques où les HD sont absents ou en faible densité (Grigg et Suzuki 2003).

Cette recension des écrits a permis d'identifier plusieurs éléments d'intérêt à investiguer pour élucider les sources d'infection des Inuits et les cycles de transmission de *T. gondii* dans l'Arctique Canadien. En particulier, l'épidémiologie de la toxoplasmose chez les phoques de l'Arctique Canadien semble capitale à étudier, du fait que ces derniers pourraient représenter une source d'infection pour les Inuits mais qu'ils pourraient également être des indicateurs pertinents de la contamination hydrique du milieu marin par les oocystes de *T. gondii*. L'importance de cette voie de propagation des oocystes dans le cycle de transmission de *T. gondii* au sein des écosystèmes arctiques dépourvus de félinés est au cœur de nos travaux de doctorat.

Exposé et analyse des résultats

Les chapitres suivants présentent les quatre articles rédigés dans le cadre de ce projet de doctorat.

Spatio-temporal variations and age effect on *Toxoplasma gondii* seroprevalence in seals from the Canadian Arctic ¹

A. Simon ¹, M. Chambellant ^{2,3}, B. J. Ward ⁴, M. Simard ⁵, J. F. Proulx ⁶, B. Levesque ^{7,8}, M. Bigras-Poulin ¹, A. N. Rousseau ⁹, N. H. Ogden ^{1,10}

1 Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Pathologie et microbiologie
Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

2 Fisheries and Oceans Canada, Fisheries and Oceans, Winnipeg, Manitoba, Canada

3 University of Manitoba, Department of Biological Sciences, Winnipeg, Manitoba, Canada

4 Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal General Hospital, Montreal,
Quebec, Canada

5 Makivik Corporation, Nunavik Research Center, Kuujjuaq, Quebec, Canada

6 Nunavik regional board of health and social services, Direction de la santé publique, Kuujjuaq,
Quebec, Canada

7 Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire de Québec, Axe Santé des Populations et
Environnement, Québec, Québec, Canada

8 Institut national de santé publique du Québec, Direction de la santé environnementale et de la
toxicologie, Québec, Québec, Canada

9 Institut national de recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, Québec, Québec,
Canada

10 Zoonoses Division, Centre for Food-borne, Environmental and Zoonotic Infectious Diseases,
Public Health Agency of Canada, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

¹ Article publié dans *Parasitology* (2011) 138(11):1362-8.

Summary

Objective. Toxoplasmosis is a significant public health threat for Inuit in the Canadian Arctic. This study aimed to investigate arctic seals as a possible food-borne source of infection. **Methods.** Blood samples collected from 828 seals in seven Canadian Arctic communities from 1999-2006 were tested for *Toxoplasma gondii* antibodies using a direct agglutination test. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect *T. gondii* DNA in tissues of a sub-sample of seals. Associations between seal age, sex, species, diet, community and year of capture, and serological test results were investigated by logistic regression. **Results.** Overall seroprevalence was 10.4 % (86/828). All tissues tested were negative by PCR. In ringed seals, seroprevalence was significantly higher in juveniles than in adults (odd ratio = 2.44). Overall, seroprevalence varied amongst communities ($P = 0.0119$) and by capture year ($P = 0.0001$). **Conclusion.** Our study supports the hypothesis that consumption of raw seal meat is a significant source of infection for Inuit. This work raises many questions about the mechanism of transfer of this terrestrial parasite to the marine environment, the preponderance of infection in younger animals and the natural course of infection in seals. Further studies to address these questions are essential to fully understand the health risks for Inuit communities.

Key words: *Toxoplasma gondii*, seals, Canadian Arctic, wild felids, waterborne transmission

Introduction

The coccidian parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is one of the most common parasites, with a worldwide distribution in all warm-blooded animal species tested to date (Tenter *et al.* 2000). It infects nearly one in three humans in the world and can cause serious illness in immunocompromised people and unborn children if their mothers become infected while pregnant (Tenter *et al.* 2000). Wild and domestic felids are the only known definitive hosts of *T. gondii*, and play a crucial role contaminating the environment with

oocysts excreted in their faeces (Dubey 2010). After ingesting oocysts, intermediate hosts (mammals and birds) develop tissue cysts that may persist for life. In turn, animals with tissue cysts become possible sources of infection for predators, including cats thus completing the parasite life cycle (Dubey 2010).

In the Canadian Arctic, there is evidence of high rates of exposure of Inuit to *T. gondii* (Gyorkos 1980; Messier *et al.* 2009; Tanner *et al.* 1987). In particular, in Nunavik (northern Quebec above 55°N latitude), the overall seroprevalence in the Inuit population is 60% (Messier *et al.* 2009). This is surprising since felids are rare or absent in much of the Arctic and sub-Arctic. The relatively low rates of exposure (5-10%) in northern Cree (50-53°N) who share roughly the same ecosystem and water supply as the Inuit, point to differences in hunting practices and dietary habits between these two ethnic groups (Campagna *et al.* 2011; Levesque *et al.* 2007). The regular consumption of uncooked meat of marine mammals, particularly seals, by the Inuit has been proposed as a possible source of *T. gondii* infection in Inuit communities in previous epidemiological studies (Forbes *et al.* 2009; Messier *et al.* 2009).

How marine mammals become infected with *T. gondii*, in the absence of direct contact with oocysts from the faeces of infected felids in the Arctic, is unknown. To date, there is no known definitive host for *T. gondii* in the marine environment (Measures *et al.* 2004). However, recent evidence from California suggests that the parasite can sometimes cross from terrestrial (domestic cats) to marine ecosystems (sea otters or *Enhydra lutris nereis*) via *T. gondii* oocysts that reach the coastal marine environment in surface runoff (Conrad *et al.* 2005; Miller *et al.* 2008b). Some pinnipeds from the Arctic have been found to be seropositive for *T. gondii* including walruses (*Odobenus rosmarus*), ringed seals (*Pusa hispida*), harbor seals (*Phoca vitulina*) and bearded seals (*Erignathus barbatus*) (Dubey *et al.* 2003; Jensen *et al.* 2010; Leclair & Doidge 1998), providing further support for the hypothesis of transmission of *T. gondii* between terrestrial and marine ecosystems. In the Canadian Arctic, very little is known about the prevalence of *T. gondii* infection in pinnipeds.

In this study, we used serological and molecular methods to assess the potential role of seals as a source of *T. gondii* infection in the Canadian Arctic. This work raises several

questions as to likely transmission pathways of *T. gondii* in this region and the extent to which seal meat may pose a health risk for Canadian Inuit.

Materials and methods

Samples and data used in the study

A total of 828 blood samples were available for study; mostly from ringed seals (*Pusa hispida*) (n = 788) with smaller numbers of bearded seals (*Erignathus barbatus*) (n = 20) and harbour seals (*Phoca vitulina*) (n = 9). A small number of samples from unknown species were included in some analyses (n = 11). The seals were killed by Inuit during subsistence harvests (September to July) between 1999 and 2006 in seven (7) communities: Sanikiluaq, Arviat, Chesterfield Inlet and Hall Beach in Nunavut (Hudson Bay); and Sachs Harbour, Tuktoyaktuk and Ulukhaktok in the Northwest Territories (Figure 8). Whole blood, muscle, kidney, liver, lung and lymph node were some of the tissues sampled as part of Fisheries and Oceans Canada sampling program. All samples were stored at -80 °C following collection. Associated data included the sex, age, geographical location of capture and year of sampling of the harvested animals. Ringed and harbour seal ages were determined by counting the annual growth layer groups in the dentine (Northwest Territories seals) or cementum (Hudson Bay seals) of tooth sections (Stewart *et al.* 1996). The diet of ringed seals from Arviat, in western Hudson Bay, was explored through the analysis of carbon (C) and nitrogen (N) stable isotopes (SI) in liver and muscle tissues, representing food ingested days and weeks before harvest, respectively, following the methods described by Vincent-Chambellant (2010).

Serological analysis

Blood samples were analysed for anti-*T. gondii* antibodies using a direct agglutination test (Toxo screen DA[®]: Biomérieux S.A., Marcy-l'Etoile, France). In each well, diluted blood samples were mixed with formalin-treated toxoplasma tachyzoites that agglutinate in the presence of specific immunoglobulin G antibodies, and 2-mercaptoethanol to suppress non-specific agglutination. Blood samples were tested at 1:40 and 1:4000 dilutions. Samples that obviously agglutinated at a 1:40 dilution were considered seropositive and were further tested at dilutions of 1:60, 1:180, 1:540, and 1:1620. A single reader (A. S.) interpreted all the tests to eliminate inter-observer variability. As a consequence of freezing, whole blood samples contained haemolysed blood. To determine whether or not haemolysed samples contained inhibitors that interfere with the agglutination reaction, we added positive control serum (dilutions 1:40 to 1: 4000) to five negative but haemolysed blood samples and re-tested. We found no change in the test results suggesting that haemolysis did not influence the agglutination reaction.

Molecular analysis

To assess the extent to which serological results implicate seal meat as a source of infection for Inuit and to evaluate serological test sensibility (i.e. the possibility for false sero-negative test results), we analysed a sub-sample of seal tissues sampled in Arviat. Using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), DNA was extracted from muscle, kidney, lung and liver of 14 ringed seals (5 seropositive and 9 seronegative) and from the muscle alone of 135 seals (23 seropositive ringed seals and 2 seropositive harbour seals, 107 seronegative ringed seals and 3 seronegative harbour seals) from which suitable tissue samples were available. A real time polymerase chain reaction (PCR) assay was used to detect a 529-bp repeat element occurring up to 200 to 300 times in the *T. gondii* genome (Kasper *et al.* 2009).

Statistical analysis

We investigated seal sex, community of harvest, age, year of sampling and seal species, as explanatory variables for seropositivity. In a separate analysis, we assessed C and N SI ratios variables on seropositivity of ringed seals from Arviat. Seals were classified as: pups (< 1 year), juveniles (1-5 years) and adults (> 5 years) based on dental ages (Holst *et al.* 1999). Each explanatory variable was screened for potential unconditional association with *T. gondii* serostatus using a generalized linear model with a logit link function in SAS version 9.1 (PROC GENMOD, SAS Institute Inc., Cary, NC). Those variables significantly associated with serostatus at the $P < 0.20$ level were included in a multivariable regression model. Linearity of the relationship between the SI ratios and the log odds of the seropositivity was assessed by categorizing the continuous SI ratios and visualizing plots of the odds ratio against mean values of the different categories. The possibility for multicollinearity was investigated by standard diagnostic methods. The possible presence of confounding bias was evaluated by adding all eliminated predictors (whether or not included in the multivariable model), one at a time, and back into the final model to avoid the exclusion of an important predictor potentially masked by another variable. We were unable to test for possible interactions in certain groups because of small sample sizes. The relative goodness of fit of model was assessed by Pearson and deviance Chi-square tests. The level of significance was $P < 0.05$ throughout the multivariable analysis. To reduce the risk of a Type I error when making multiple comparisons, alpha was reduced using Holm's sequential Bonferroni method.

Results

A total of 86/828 seals (10.4%, 95% confidence interval CI = 8.3-12.5) were seropositive for *T. gondii*. Positive titres were generally low (1:40 to 1:180). No tissue sample was positive by PCR.

Overall, 80/788 ringed seals (10.2%, 95% CI = 8.0-12.3), 2/20 bearded seals (10.0%, 95% CI = 1.2-31.7) and 2/9 harbour seals (22.2%, 95% CI = 2.8-60.0) were seropositive for *T. gondii*. The difference in seroprevalence according to species was not

significantly different ($P = 0.50$). Due to small sample size, no further analysis was performed on the bearded and harbour seal data.

There was no statistical difference in the proportion of seropositive male and female ringed seals (Table V). Seroprevalence was greatest for juvenile ringed seals (35/218: 16.1%), followed by pups (11/128: 8.6%) and adults (29/396: 7.3%) (Table V, Figure 9). There was significant variation in seroprevalence amongst ringed seals sampled in the different communities. The highest seropositivity rates were observed in Hall Beach and Arviat (3/13 and 45/289, respectively) and was lowest in Chesterfield Inlet (1/41) (Table V, Figure 8). Due to very low sample sizes (1 and 3, respectively), the data from years 1999 and 2000 were omitted. The model converged and the proportion of seropositive seals varied significantly between years of sampling. The proportion of seropositive samples was higher in seals harvested in 2001 (7/46) and 2003 (32/181) compared to other years (Table V).

In ringed seals from Arviat, the carbon SI ratio was significantly lower in seropositive seals compared to seronegative seals ($P = 0.030$). This last variable was not tested in a multivariate model because of the correlation with year and age variables. The nitrogen SI ratio was not associated with seroprevalence ($P = 0.60$).

Age class, community and year of sampling (excluding data from ringed seals harvested in 1999 and 2000 and those harvested from Hall Beach where no age data were available) were the variables that remained significant in the most parsimonious multivariable logistic regression model for *T. gondii* seropositivity (Table VI). No evidence for collinearity was detected among these predictors. The seroprevalence was significantly higher in juveniles than in adults and in ringed seals sampled in Arviat compared to Sanikiluaq. Samples collected in 2001 and 2003 were more likely to be seropositive than those collected in 2005.

Discussion

To our knowledge this is the first large-scale study of *T. gondii* prevalence in pinnipeds in the Canadian Arctic and is based on the largest collection of seal blood and tissues gathered to date from this region. Our serological data suggested that at least 10% of arctic seals were exposed to *T. gondii*. An interesting and unexpected pattern of age-seroprevalence was found in ringed seals: seroprevalence did not increase continuously with age, which is consistent with ringed seals becoming infected primarily at a young age. The seals from Arviat in western Hudson Bay had the highest rate of *T. gondii* infection amongst ringed seals sampled in the communities under investigation, and exposure to the parasite may have been particularly high in the years 2001 and 2003. In this study, *T. gondii* DNA was not detected in seal tissues despite large numbers of muscle samples analysed emphasizing the difficulty of finding *T. gondii* cysts in tissues by PCR (Hill *et al.* 2006). Unfortunately, neither heart nor brain tissues, often considered target sites for *T. gondii* encystation (Dubey 2010), were available for PCR testing.

The direct agglutination test that we employed in our study has been widely used to detect *T. gondii* antibodies in a variety of marine mammals (Cabezón *et al.* 2004, 2011; Dubey *et al.* 2003, 2005; Jensen *et al.* 2010; Measures *et al.* 2004; Oksanen *et al.* 1998). This test is considered to be both sensitive and specific in mammals (Dubey 2010), and capable of detecting infection in seals (Gajadhar *et al.* 2004). In a study on sea otters, all those with demonstrable *Toxoplasma* infections had detectable MAT antibodies (Thomas *et al.* 2007). While the state of haemolysis of the samples included in this study could theoretically have affected the direct agglutination test sensitivity, we investigated this possibility and found no evidence for potential effects of haemolysis on seroprevalence results. Since all blood samples were in similar condition, we expect our inter-group comparisons to be valid. None of the positive serological reactions had a titre higher than 1:180, which is consistent with other studies using the direct agglutination test in marine mammals (Cabezón *et al.* 2004, 2011; Dubey *et al.* 2003, 2005; Jensen *et al.* 2010; Lambourn *et al.* 2001; Measures *et al.* 2004). In the present study, the samples were haemolysed and using a cut-off dilution lower than 1:40 would have resulted in the test being unreadable for some samples. However, titres even lower than the 1:40 cut-off used

in our study may need to be considered since *T. gondii* cysts was detected in the tissues of a naturally infected whale which had an agglutination test titre of only 1:25 (Mikaelian *et al.* 2000). It is possible that decline in sero-positivity in adult seals could be due to antibody levels declining below a level detectable at a 1:40 dilution.

The seroprevalence rate found in our study is consistent with previous studies on *T. gondii* in seals harvested in other arctic locations (ringed seals, harbour seals and bearded seals in Alaska (Dubey *et al.* 2003); ringed seals and bearded seals in the archipelago of Svalbard, Norway (Jensen *et al.* 2010)). The discovery of a non-archetypical strain designated Type X *T. gondii* in both wild terrestrial carnivores and in a mussel in California supports the theory of a link between terrestrial and marine coastal environment via freshwater runoff (Miller *et al.* 2008b). Indeed, fecal contamination of coastal marine environments by terrestrial mammals is a well-recognized problem for several pathogenic protozoa (e.g., *Giardia* and *Cryptosporidium*: (Appelbee *et al.* 2005; Miller *et al.* 2010). We speculate that *T. gondii* infection of seals in the Canadian Arctic could similarly be due to contamination of the marine environment by *T. gondii* oocysts excreted by felids in the arctic watershed (Figure 8), and transported via freshwater runoff to the marine environment. *T. gondii* oocysts can sporulate in seawater and remain infectious for mice for 24 months (Lindsay & Dubey 2009). The Canadian lynx (*Lynx Canadensis*) is the only widespread and abundant wild felid present in the Canadian arctic watershed (Banfield 1974) and may therefore play an important role in contaminating the arctic marine environment. Indeed, reported seroprevalence rates are high (44%) in lynx from Quebec (Labelle *et al.* 2001). Like other wild felids, a single infected lynx may excrete many millions of *T. gondii* oocysts into the terrestrial environment during the course of its life (Jones & Dubey 2010).

The pattern of seroprevalence to *T. gondii* among age classes observed in the present study was unexpected. In most infected mammals including humans, both infection and seropositivity can be readily detected for life (Dubey 2010). If exposure to a pathogen causing a persistent infection is constant, it would be expected that seroprevalence should increase with age at a more or less constant rate. In this study, seropositivity was highest in juvenile ringed seals, while adults had lower seroprevalence rates. This pattern is consistent

with infection of ringed seals during their first years of life. A cessation of exposure as ringed seals age may explain natural waning of antibody titres over time in older animals despite continued infection that become difficult to detect with serologic tests. There is no evidence to date that infection of seals causes significant morbidity or mortality that could explain the serological pattern observed (Gajadhar *et al.* 2004). Although spontaneous clearing of infection in the adult ringed seals with a loss of tissue cysts (Opsteegh *et al.* 2011) could plausibly explain the loss of antibodies, other authors believe in lifelong *T. gondii* infection in seals like most other intermediate hosts (Dubey 2010). It is also possible that some ringed seals are infected transplacentally as has been suggested for arctic foxes (*Vulpes lagopus*) (Prestrud *et al.* 2007), and as seen in others marine mammals such as dolphins and sea otters (Jardine & Dubey 2002; Miller *et al.* 2008a; Resendes *et al.* 2002). However, reports of transplacental *T. gondii* transmission in marine mammals are infrequent and this route of infection may be rare (Miller *et al.* 2008a). Furthermore, congenital toxoplasmosis generally occurs only during acute infection of the mothers (Dubey 2010) and, considering the relatively low seroprevalence in adult ringed seals, this route of transmission would likely be both inefficient and infrequent. Age-related hunting behaviour, segregation in habitat, geographic occurrence and, therefore, diet may cause young ringed seals to be more exposed to *T. gondii* than older seals (Born *et al.* 2004; Vincent-Chambellant 2010). C and N stable isotope ratios support a difference in diet between adult and younger ringed seals, with a higher benthic/inshore component in the former (Vincent-Chambellant 2010).

T. gondii infection in seals might occur via ingestion of oocysts concentrated in their prey (Robertson 2007). Molluscs, that filter water from freshwater runoff, are a possible source of infection for marine mammals (Arkush *et al.* 2003; Lindsay *et al.* 2004). However, analysis of stomach contents from ringed seals in Arviat suggests that molluscs are consumed in very small quantities compared to the other prey types (Vincent-Chambellant 2010). Moreover, the low carbon stable isotope ratio found in young seropositive ringed seals compared to seronegative animals suggests that the former group is not preferentially using the benthic environment to feed compared to the latter. During the open-water season, the diet of ringed seals of all age classes sampled in Arviat consists principally of fish (Vincent-Chambellant 2010), raising the possibility that fish may be an

important source of bioconcentration of oocysts originating from a terrestrial environment. Like molluscs, fish gills could plausibly filter *T. gondii* oocysts out of seawater making them an efficient *T. gondii* vector for piscivorous marine mammals (Massie *et al.* 2010).

Toxoplasmosis is a major public health issue in the Canadian Arctic (Messier *et al.* 2009). Our study suggests that seals are exposed to *T. gondii* and may serve as a significant source of infection for Inuit people who frequently consume seal meat uncooked. Broad geographic and inter-annual patterns of seropositivity were observed that could reflect geographic and inter-annual variations in contamination of the marine environment associated with the transport of oocysts from the terrestrial environment. Further studies are needed to better understand these spatio-temporal variations, as well as the differential infection of seals of different ages. In particular, we are currently conducting a risk assessment study to understand whether hydrological transport of oocysts is a sufficient mechanism to explain *T. gondii* infection in seals and Inuit in the Canadian Arctic.

Acknowledgements

We would like to thank the Inuit hunters and coordinators from all sampled communities and Fisheries Joint Management Committee for providing seal samples. Our sincere thanks go to Ole Nielsen, Lois Harwood and Steven Ferguson (Fisheries and Oceans Canada) for allowing use of blood samples and tissues of seals. We thank all our collaborators and especially Rebecca Guy (Public Health Agency of Canada) and Josée Harel (Faculté de médecine vétérinaire, Québec) for contributing their laboratory resources for conducting our experiments, and Donald Tremblay for laboratory assistance. We thank Guy Beauchamp for statistical advice, and Daniel Scholl and Patrick A. Leighton for useful comments on earlier versions of the manuscript.

Financial support

This study was supported by the Network of Centres of Excellence of Canada ArcticNet and by the Ouranos Consortium's Health Program, coordinated by the Institut National de Santé Publique du Québec.

References

- Appelbee, A. J., Thompson, R. C. and Olson, M. E.** (2005). *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. *Trends in Parasitology*, **21**(8), 370-376.
- Arkush, K. D., Miller, M. A., Leutenegger, C. M., Gardner, I. A., Packham, A. E., Heckerroth, A. R., Tenter, A. M., Barr, B. C. and Conrad, P. A.** (2003). Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology*, **33**(10), 1087-1097.
- Banfield, A. W. F.** (1974). *The mammals of Canada*, University of Toronto Press Toronto.
- Born, E. W., Teilmann, J., Acquarone, M. and Riget, F. F.** (2004). Habitat use of ringed seals (*Phoca hispida*) in the North Water Area (North Baffin Bay). *Arctic*, **57**(2), 129-142.
- Cabezón, O., Hall, A. J., Vincent, C., Pabon, M., Garcia-Bocanegra, I., Dubey, J. P. and Almeria, S.** (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in North-eastern Atlantic harbor seal (*Phoca vitulina vitulina*) and grey seal (*Halichoerus grypus*). *Veterinary Parasitology*, **90**, 225-260.
- Cabezón, O., Resendes, A. R., Domingo, M., Raga, J. A., Agusti, C., Alegre, F., Mons, J. L., Dubey, J. P. and Almeria, S.** (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild dolphins from the Spanish Mediterranean coast. *Journal of Parasitology*, **90**(3), 643-644.
- Campagna, S., Levesque, B., Anassour-Laouan-Sidi, E., Cote, S., Serhir, B., Ward, B. J., Libman, M. D., Drebot, M. A., Makowski, K., Andonova, M., Ndao, M. and Dewailly, E.** (2011). Seroprevalence of 10 zoonotic infections in 2 Canadian Cree communities. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **70**(2), 191-199.
- Conrad, P. A., Miller, M. A., Kreuder, C., James, E. R., Mazet, J., Dabritz, H., Jessup, D. A., Gulland, F. and Grigg, M. E.** (2005). Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal of Parasitology*, **35**(11-12), 1155-1168.

Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd edn. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Dubey, J. P., Fair, P. A., Bossartt, G. D., Hill, D., Fayer, R., Sreekumar, C., Kwok, O. C. and Thulliez, P. (2005). A comparison of several serologic tests to detect antibodies to *Toxoplasma gondii* in naturally exposed bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Parasitology*, **91**(5), 1074-1081.

Dubey, J. P., Zarnke, R., Thomas, N. J., Wong, S. K., Van Bonn, W., Briggs, M., Davis, J. W., Ewing, R., Mense, M., Kwok, O. C., Romand, S. and Thulliez, P. (2003). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, **116**(4), 275-296.

Forbes, L. B., Measures, L. and Gajadhar, A. (2009). Infectivity of *Toxoplasma gondii* in northern traditional (country) foods prepared with meat from experimentally infected seals. *Journal of Food Protection*, **72**(8), 1756-1760.

Gajadhar, A. A., Measures, L., Forbes, L. B., Kapel, C. and Dubey, J. P. (2004). Experimental *Toxoplasma gondii* infection in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Journal of Parasitology*, **90**(2), 255-259.

Gyorkos, T. W. (1980). Serological investigation for five selected parasitic infections in Inuvik and Arctic Bay / Strathcona Sound, Northwest Territories. *Canada Diseases Weekly Report*, **6**, 134-136.

Hill, D. E., Chirukandoth, S., Dubey, J. P., Lunney, J. K. and Gamble, H. R. (2006). Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Veterinary Parasitology*, **141**(1-2), 9-17.

Holst, M., Stirling, I. and Calvert, W. (1999). Age structure and reproductive rates of ringed seals (*Phoca hispida*) on the northwestern coast of Hudson Bay in 1991 and 1992. *Marine Mammal Science*, **15**(4), 1357-1364.

Jardine, J. E. and Dubey, J. P. (2002). Congenital toxoplasmosis in a Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*). *Journal of Parasitology*, **88**(1), 197-199.

Jensen, S. K., Aars, J., Lydersen, C., Kovacs, K. M. and Asbakk, K. (2010). The prevalence of *Toxoplasma gondii* in polar bears and their marine mammal prey: evidence for a marine transmission pathway? *Polar Biology*, **33**, 599-606.

Jones, J. L. and Dubey, J. P. (2010). Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Experimental Parasitology*, **124**(1), 10-25.

Kasper, D. C., Sadeghi, K., Prusa, A. R., Reischer, G. H., Kratochwill, K., Forster-Waldl, E., Gerstl, N., Hayde, M., Pollak, A. and Herkner, K. R. (2009). Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **63**(1), 10-15.

- Labelle, P., Dubey, J. P., Mikaelian, I., Blanchette, N., Lafond, R., St-Onge, S. and Martineau, D.** (2001). Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) from Quebec, Canada. *Journal of Parasitology*, **87**(5), 1194-1196.
- Lambourn, D. M., Jeffries, S. J. and Dubey, J. P.** (2001). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in harbor seals (*Phoca vitulina*) in southern Puget Sound, Washington. *Journal of Parasitology*, **87**(5), 1196-1197.
- Leclair, D. and Doidge, W.** (1998). *Seropositive Cases of Toxoplasmosis in Nunavik wildlife*. Nunavik Research Centre, Makivik Corporation, Kuujjuaq.
- Levesque, B., Messier, V., Bonnier-Viger, Y., Couillard, M., Cote, S., Ward, B. J., Libman, M. D., Gingras, S., Dick, D. and Dewailly, E.** (2007). Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **59**(3), 283-286.
- Lindsay, D. S., Collins, M. V., Mitchell, S. M., Wetch, C. N., Rosypal, A. C., Flick, G. J., Zajac, A. M., Lindquist, A. and Dubey, J. P.** (2004). Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Parasitology*, **90**(5), 1054-1057.
- Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.** (2009). Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *Journal of Parasitology*, **95**(4), 1019-1020.
- Massie, G. N., Ware, M. W., Villegas, E. N. and Black, M. W.** (2010). Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. *Veterinary Parasitology*, **169**(3-4), 296-303.
- Measures, L. N., Dubey, J. P., Labelle, P. and Martineau, D.** (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian pinnipeds. *Journal of Wildlife Diseases*, **40**(2), 294-300.
- Messier, V., Levesque, B., Proulx, J. F., Rochette, L., Libman, M. D., Ward, B. J., Serhir, B., Couillard, M., Ogden, N. H., Dewailly, E., Hubert, B., Dery, S., Barthe, C., Murphy, D. and Dixon, B.** (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among Nunavik Inuit (Canada). *Zoonoses and public health*, **56**(4), 188-197.
- Mikaelian, I., Boisclair, J., Dubey, J. P., Kennedy, S. and Martineau, D.** (2000). Toxoplasmosis in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence estuary: two case reports and a serological survey. *Journal of Comparative Pathology*, **122**(1), 73-76.
- Miller, M., Conrad, P., James, E. R., Packham, A., Toy-Choutka, S., Murray, M. J., Jessup, D. and Grigg, M.** (2008a). Transplacental toxoplasmosis in a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Veterinary Parasitology*, **153**(1-2), 12-18.
- Miller, M. A., Byrne, B. A., Jang, S. S., Dodd, E. M., Dorfmeier, E., Harris, M. D., Ames, J., Paradies, D., Worcester, K., Jessup, D. A. and Miller, W. A.** (2010). Enteric

bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Veterinary Research*, **41**(1), 13.

Miller, M. A., Miller, W. A., Conrad, P. A., James, E. R., Melli, A. C., Leutenegger, C. M., Dabritz, H. A., Packham, A. E., Paradies, D., Harris, M., Ames, J., Jessup, D. A., Worcester, K. and Grigg, M. E. (2008b). Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology*, **38**(11), 1319-1328.

Oksanen, A., Tryland, M., Johnsen, K. and Dubey, J. P. (1998). Serosurvey of *Toxoplasma gondii* in North Atlantic marine mammals by the use of agglutination test employing whole tachyzoites and dithiothreitol. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **21**(2), 107-114.

Opsteegh, M., Swart, A., Fonville, M., Dekkers, L. and van der Giessen, J. (2011). Age-related *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch wild boar inconsistent with lifelong persistence of antibodies. *PLoS One*, **6**(1), e16240. doi: 10.1371/journal.pone.0016240.

Prestrud, K. W., Asbakk, K., Fuglei, E., Mork, T., Stien, A., Ropstad, E., Tryland, M., Gabrielsen, G. W., Lydersen, C., Kovacs, K. M., Loonen, M. J., Sagerup, K. and Oksanen, A. (2007). Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. *Veterinary Parasitology*, **150**(1-2), 6-12.

Resendes, A. R., Almeria, S., Dubey, J. P., Obon, E., Juan-Salles, C., Degollada, E., Alegre, F., Cabezon, O., Pont, S. and Domingo, M. (2002). Disseminated toxoplasmosis in a Mediterranean pregnant Risso's dolphin (*Grampus griseus*) with transplacental fetal infection. *Journal of Parasitology*, **88**(5), 1029-1032.

Robertson, L. J. (2007). The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. *International Journal of Food Microbiology*, **120**(3), 201-216.

Stewart, R. E. A., Stewart, B. E., Stirling, I. and Street, E. (1996). Counts of growth layer groups in cementum and dentine in ringed seals (*Phoca hispida*). *Marine Mammal Science*, **12**(3), 383-401.

Tanner, C. E., Staudt, M., Adamowski, R., Lussier, M., Bertrand, S. and Prichard, R. K. (1987). Seroepidemiological study for five different zoonotic parasites in northern Quebec. *Canadian Journal of Public Health*, **78**(4), 262-266.

Tenter, A. M., Heckerroth, A. R. and Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, **30**(12-13), 1217-1258.

Thomas, N. J., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Cole, R. A. and Meteyer, C. U. (2007). Protozoal meningoencephalitis in sea otters (*Enhydra lutris*): a histopathological and immunohistochemical study of naturally occurring cases. *Journal of Comparative Pathology*, **137**(2-3), 102-121. doi: DOI 10.1016/j.jcpa.2007.05.001.

Vincent-Chambellant, M. (2010). Ecology of ringed seals (*Phoca hispida*). In *Department of Biological Sciences*, Vol. Doctor of Philosophy pp. 279. University of Manitoba, Winnipeg, Canada.

Figures

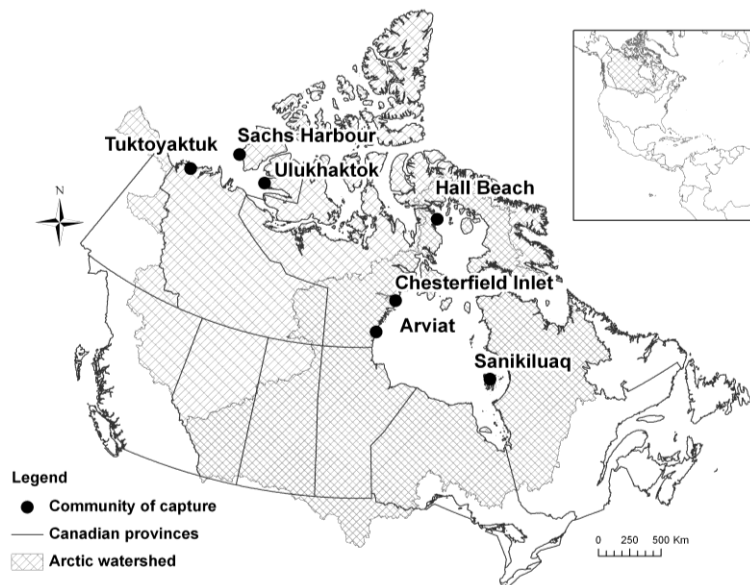


Figure 8. Location of the seven (7) Canadian Arctic Inuit communities where arctic seals were sampled from 1999 to 2006.

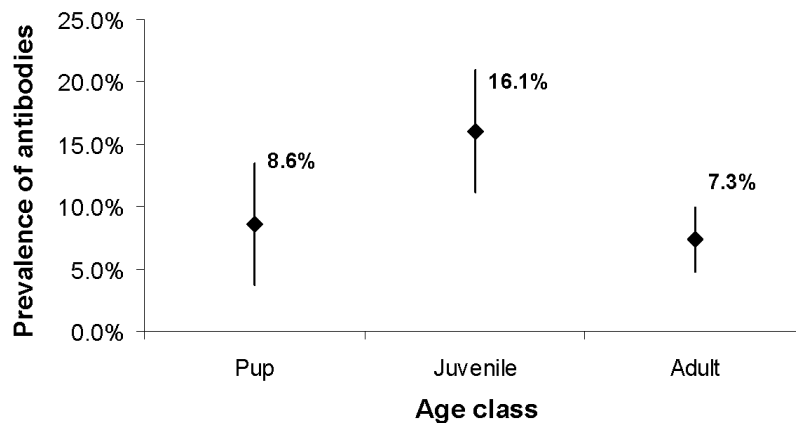


Figure 9. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* (%) among ringed seals from the Canadian Arctic by age class: pup (<1 year old), juvenile (1-5 years old) and adult (>5 years old). Error bars indicate the standard deviation.

Tables

Table V. Prevalence of specific antibodies to *Toxoplasma gondii* among ringed seals from Nunavut and the Northwest Territories, Canada, according to sex, age class, community and year of sampling, and level of significance for unconditional association between *T. gondii* seropositivity and each explanatory variable. Significant effect ($P < 0.05$) are shown in bold.

<i>Variables</i>	<i>N^a</i>	<i>Prevalence (%)</i>	<i>95% CI^a</i>	<i>P-value^b</i>
Total	788	10.2	8.1-12.2	
Sex				0.9945
Male	442	10.0	7.2-12.7	
Female	331	10.0	6.7-13.2	
Age class				0.0034
Pup	128	8.6	3.7-13.4	
Juvenile	218	16.1	11.2-20.9	
Adult	396	7.3	4.8-9.9	
Community				0.0029
Arviat	289	15.6	11.4-19.7	
Chesterfield Inlet	41	2.4	0.1-12.9 ^c	
Hall Beach	13	23.1	5.0-53.8 ^c	
Sachs Harbour	28	7.1	0.9-23.5 ^c	
Sanikiluaq	229	7.9	4.4-11.3	
Tuktoyaktuk	17	5.9	0.1-28.7 ^c	
Ulukhaktok	171	5.8	2.3-9.4	
Year of sampling				0.0009^d
1999	1	0		
2000	3	0	0-70.8 ^c	
2001	46	15.2	6.3-28.9 ^c	
2002	31	0	0-11.2 ^c	
2003	181	17.7	12.1-23.2	
2004	179	8.4	4.3-12.4	
2005	296	7.8	4.7-10.8	
2006	51	5.9	1.2-16.2 ^c	

^a N = sample size; CI = confidence interval

^b Likelihood ratio test Type III effect in GENMOD Procedure

^c Exact 95% CI (Fisher's)

^d Samples collected in 1999 and 2000 not included

Table VI. Statistically significant explanatory variables in the multivariable logistic regression model of the presence of specific antibodies against *Toxoplasma gondii* in 738 ringed seals from six communities in the Canadian Arctic.

<i>Factor^a</i>	<i>Odds ratio (OR)</i>	<i>95% CI for OR</i>	<i>P-value^b</i>
Age class			0.0093
Pup	1.27	0.56-2.88	0.5731
Juvenile	2.44	1.34-4.44	0.0035
Adult	1.00		
Community			0.0119
Arviat	2.45	1.27-4.74	0.0077
Chesterfield Inlet	0.17	0.01-2.11	0.1696
Sachs Harbour	1.43	0.19-10.86	0.7263
Sanikiluaq	1.00		
Tuktoyaktuk	1.08	0.06-20.13	0.9568
Ulukhaktok	0.61	0.17-2.13	0.4360
Year			0.0001
2001	11.20	2.53-49.62	0.0015
2002 ^c	N/A	N/A	N/A
2003	3.37	1.80-6.33	0.0002
2004	1.65	0.76-3.57	0.2052
2005	1.00		

^a Adults sampled in Sanikiluaq in 2005 were used as the reference

^b Wald chi-square test

^c OR for 2002 non existent (prevalence = 0%)

Fate and transport of *Toxoplasma gondii* oocysts via snowmelt runoff: development of a conceptual framework from melting snowpack to the Canadian Arctic coasts ²

Audrey Simon¹, Michel Bigras Poulin¹, Alain N. Rousseau², Nicholas H. Ogden^{1,3}

1 Groupe de recherche en épidémiologie des zoonoses et santé publique, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, CP 5000, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

2 Institut national de recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, G1K 9A9, Québec, Canada

3 Zoonoses Division, Centre for Foodborne, Environmental and Zoonotic Infectious Diseases, Public Health Agency of Canada, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

² Article en préparation.

Abstract

Toxoplasma gondii is a zoonotic protozoan that causes serious illness in humans and other animals worldwide, including the Canadian Arctic, where high level of infection amongst Inuit has been recorded, possibly due to consumption of raw infected seal meat. Wild and domestic felids, the only hosts able to shed *T. gondii* oocysts, are practically non-existent in the Canadian Arctic. So here we explore the hypothesis that *T. gondii* oocysts contaminate the coastal marine environment via surface runoff from across the boreal watershed, particularly during the snowmelt period. We propose a conceptual framework of the different processes governing the fate and transport of *T. gondii* oocysts from the melting snowpack to the Canadian arctic coast via the freshwater runoff. This framework underlines the feasibility of the transmission pathway of oocysts from contaminated snowpack and soil to the marine environment and the complexity and the multiplicity of mechanisms involved. In addition, the framework identifies knowledge gaps for orienting future studies on *T. gondii*. Furthermore, this work could be used as a tool to investigate the possible estuarine contamination by the faeces-borne pathogens transported via the spring freshet.

Additional keywords: Waterborne transmission, large-scale pollution, faeces-borne pathogen.

Introduction

To prevent coastal contamination by pathogens via freshwater runoff, we need an understanding of the transport and fate of microbes at the watershed scale. Numerous experimental studies have investigated the survival of pathogens under various environmental conditions in the laboratory, whereas relatively little is known about their survival and their transport in the real environment (Ferguson et al. 2003). Ferguson (2003) reviewed the processes involved in the transport of pathogens in surface water and proposed a conceptual framework to study and to fill the gaps in our knowledge. Water

flow is one of the most important parameters affecting transport of microbial contaminants, and the greatest exposures occur particularly after large hydrological events such as intense rainfall (Ferguson et al. 2003). The relationship between the release of microorganisms and snowmelt is less recognised, but it too can remobilize microorganisms stored in the soil from the previous summer and carry them into streamflow (Whitman et al. 2008; Zhu et al. 2011). In addition, snowpack could accumulate and concentrate pathogens shed during snow coverage period, and could subsequently deliver significant pathogen loads to the streams when the short melt period occurs. To our knowledge, this mechanism has never been investigated for microorganisms. On the other hand, the release of organic contaminants from the snowpack is recognised to represent significant risks to aquatic and terrestrial organisms in the seasonally snow-covered watershed (Meyer and Wania 2008).

In the Canadian Arctic, we have found evidence for infection by the protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) in marine mammals (Simon et al. 2011), which are also exposed to this parasite in other parts of the world (Dubey 2010). Those marine mammals may serve as a significant source of *T. gondii* infection for Inuit people that consume raw infected seal meat, making toxoplasmosis a significant public health threat for Inuit in the Canadian Arctic (Simon et al. 2011). This worldwide zoonotic protozoan can sometimes cause serious illness in humans, particularly in immunocompromised people and unborn children including neurologic disorders and abortion. Considering that domestic cats and wild felids are the only hosts able to shed *T. gondii* oocysts, infection of marine mammals is intriguing and the most likely source of their infection is contamination of the marine environment from a terrestrial source. Recent evidence from California suggests that the parasite can cross from terrestrial to marine ecosystems via freshwater runoff, and this pathway of transmission could explain the high incidence of toxoplasmosis in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) (Miller et al. 2002; Conrad et al. 2005). Furthermore, the detection of *T. gondii* in one mussel collected along the California coast just after a significant rainfall event suggests the significance of precipitation in the exposure of coastal organisms to *T. gondii* (Miller et al. 2008). Spring conditions in the Canadian Arctic watershed are marked by a very large volume of freshwater runoff due to snowmelt and rainfall. The quick release of oocysts into rivers at this time, after they have accumulated

for months into the soil, and potentially within the snowpack, could represent a significant contamination process of the arctic coastline.

The mechanisms of transport and the fate of *T. gondii* oocysts in the environment are largely unknown. The objective of this review is to develop a conceptual framework for investigating the different processes behind the fate and transport of *T. gondii* oocysts and other faeces-borne pathogens from the melting snowpack to the Canadian arctic coast via the freshwater runoff to the point of infection of sea mammals. More specifically, we were interested in the potential factors that could influence the occurrence of high concentrations of pathogens in the Canadian arctic estuarine environment, which would be expected to increase the probability of infection of aquatic organisms.

The framework

Figure 10 illustrates the different processes that could lead to estuarine contamination by *T. gondii* oocysts in the Canadian Arctic watershed. These processes, occurring on several spatio-temporal scales, are discussed in the following sections from the perspective of *T. gondii* oocysts but are likely applicable in many cases to faecally-excreted oocysts of other pathogenic protozoa.

Accumulation and storage of oocysts in the soil and within the snowpack

Contamination by oocysts

After primary infection, a single domestic cat or wild felid may shed some millions of *T. gondii* oocysts in faeces for about one week of its life (Dubey 2010). *T. gondii* oocysts are subspherical to spherical in shape and 10 µm x 12 µm in diameter and have a highly resistant and impermeable shell (Dubey 2010). In boreal forest covering a great part of the Canadian Arctic watershed (Figure 10), the Canadian lynx (*Lynx canadensis*) is the only

felid host that could contribute to environmental contamination with *T. gondii* oocysts. The lynx, which would likely acquire infection from their main prey, the snowshoe hare (*Lepus americanus*), may subsequently shed large amounts of unsporulated oocysts in their faeces, which need to sporulate to become infectious (Dubey 2010). The level of environmental contamination by oocysts may vary according to density and incidence of infection in lynx populations. Some spatial variations are expected depending on lynx distribution at the population level, and habitat use and behaviour of defecation at the individual level.

Survival of oocysts

Oocysts may accumulate within the snowpack, which could act as storage medium (Meyer and Wania 2008) given the high environmental resistance of *T. gondii* (Dubey 2010). In the snowpack, very low sub-zero temperatures, sunlight (particularly ultraviolet light [UV]) and dryness are environmental stressors that have been identified as key factors for inactivation of protozoan pathogens in general (Fergusson et al. 2003) and can be lethal for *T. gondii* oocysts in particular (Yilmaz and Hopkins 1972; Frenkel and Dubey 1973). Several studies have investigated the survival of *T. gondii* oocysts under varied temperatures compared to other environmental stressors like dryness and sunlight. However, very little is known of the ability of unsporulated oocysts to survive and sporulate in diverse natural conditions. Experimentally, some oocysts were able to sporulate and to remain infective for mice after storage for three months at 4°C (Lindsay et al. 2002) and unsporulated oocysts were killed by 1 to 7 days of constant freezing (-6° C) (Frenkel and Dubey 1973). This last study suggests that freezing conditions within the snowpack may limit accumulation of sporulated, infective oocysts over winter. However, sporulated oocysts may accumulate in the soil throughout summer and autumn, survive over winter covered in the well insulated snowpack and be remobilized in the spring by the snowmelt runoff. More data are required to assess how sensitive unsporulated oocysts are to cold temperatures under natural conditions, and, recognising that most experimental studies use strains of *T. gondii* adapted to temperate weather conditions, whether or not cold-adapted strains occur with greater survivability in northern latitudes.

All studies indicate that once sporulated, *T. gondii* oocysts have remarkable resistance to extremely cold temperatures. Experimentally, sporulated *T. gondii* oocysts are able to remain infectious after 28 days at -21°C (Frenkel and Dubey 1973) and 106 days at -5°C et -10°C (Dubey 1998), which suggest that oocyst infectivity is not eliminated by freezing. Moreover, under natural conditions, oocysts were able to keep their infectivity for 18 months through two cold winters in Kansas (minimum temperatures below -20°C) (Frenkel et al. 1975). The snow cover is exposed to melt/freeze cycles due to large temperature fluctuations around the freezing point, in particular during the snowmelt period (Meyer and Wania 2008). Experimentally, Frenkel and Dubey (1973) showed that some oocysts exposed alternately to freezing and thawing remained infectious, suggesting that the melt/freeze cycles occurring within the snowpack may not inactivate *T. gondii* oocysts. Globally, further study on the survival of oocysts under the specific environmental conditions within snowpack, in particular the effects of dryness and sunlight, are needed.

Transport and fate of oocysts

From the snowpack to the streams

Transport processes that control pathogen movement in watersheds are determined by adsorption/desorption, hydrological movement and mechanical and biological movement (Ferguson et al. 2003). Thus during snowmelt, the attachment of *T. gondii* oocysts to particles within snowpack and soil, the meltwater flow and the soil characteristics may govern the transport and survival of oocysts from snowpack to river network, as for organic contaminants (Meyer and Wania 2008).

Over the pre-melt period, warming of the snowpack generates meltwater which is stocked within the snowpack, thus delaying streamflow initiation (Woo 1993). A network of flow routes (flow fingers), driven mainly by gravity, develops and percolates downward within the snowpack (Woo 1993). In the melting snowpack, oocysts could be adsorbed to faecal matter or other particles. Shapiro et al. (2009) found that *T. gondii* oocysts were

negatively charged and hydrophilic in freshwater, which may limit the aggregation to other particles and could enhance their transport in the meltwater. Therefore, the flow fingers developed in a melting snowpack could be expected to become enriched with oocysts, leaching them toward the ground.

The soil infiltration rate determines whether the meltwater flows laterally as surface flow, as subsurface flows or percolates deeper into the soil (Meyer and Wania 2008). In the case of frozen ground (in early spring) or water-saturated ground (later in the melting period), the oocysts could be directly transported into catchment streams via surface flows (Woo 1993; Zhu et al. 2011). Conversely, if the ground is unfrozen and unsaturated, it should be able to absorb the meltwater and then it could provide a potential natural filtering action and adsorption site for the removal of oocysts, decreasing their probability to reach the stream. In this case, the snowmelt would behave likely as light rainfall. Whether or not *T. gondii* oocysts are adsorbed to particles or removed by straining through the soil is unknown. Furthermore, the extent of adsorption to soils of the oocysts of related protozoans *Cryptosporidium* and *Giardia* is still a subject of controversy in the literature (Jamieson et al. 2004). Mass flow and direction may determine the soil sorption and desorption of oocysts (Davies et al. 2004). Therefore, during the high flow period of snowmelt, oocysts could move through the water-saturated soil without restriction to nearby surface water (McGechan 2002).

The characteristics of faecal deposition sites may influence the delivery of oocysts into streamflows. The spatial pattern of faecal deposition, associated with the defecation behaviour of lynx, would determine the potential for oocysts to be transported to streams. Particularly, the proximity of contaminated faeces to a river network would determine the travel distance of oocysts to reach surface waters and the likelihood that they get there. Topography of contaminated land may also have significant effects on the transport of oocysts, with increasing elevation and slope being associated with an increase in their capacity for overland transport. Slope of soils and distance over which microorganisms are delivered to the stream have been identified as key transport parameters for faecal coliforms and *Cryptosporidium* (Fraser et al. 1998; Tate et al. 2000; Davies et al. 2004; Zhu et al. 2011).

From river network to the coastal and estuarine areas

The transport of oocysts in the aquatic environment is a result of advection, dispersion, and inactivation, and those processes may be strongly driven by the physical properties of oocysts, and more specifically by their surface properties (Dumetre et al. 2012). When released into the river network, the *T. gondii* oocysts may be quickly transported by the high spring flow, because of their buoyancy in fresh water due to their hydrophilic nature and negative surface charge (Shapiro et al. 2009). Furthermore, in the transport experiments conducted by Shapiro et al., recovery rate of oocysts was higher when vegetation was less dense and then failed to efficiently remove oocysts through straining and adhesion processes (Shapiro et al. 2010). Sparse vegetation in northern latitudes early in spring may allow oocysts to move in the water column with limited load loss.

At the estuary-seawater interface, the vertical distributions of oocysts in the water column may be influenced by the interaction of high freshwater flow at the river mouth, tidal mixing with saline water and wind forces which determine the salinity gradient in the estuary (Mann and Lazier 2006). As salinity increases the oocyst surface charge becomes neutral, which may lead to efficient aggregation of oocysts with other particles (Shapiro et al. 2009), and then to their sedimentation in the arctic coastal environment. During periods of high streamflow, turbulent mixing in the estuarine areas could inhibit sedimentation and allowing freshwater plumes that are observed extending from river mouths to spread the oocysts along the coasts (Mann and Lazier 2006). The presence of ice cover in the arctic coastal environment during the spring freshet may enhance the spreading of oocysts. Indeed, the ice cover, preventing direct wind and wave mixing with the salt waters limits the increasing of salinity in the plumes (Mann and Lazier 2006), and then it may delay the sedimentation of oocysts.

Experimentally, *T. gondii* oocysts can sporulate in seawater and remain infectious for mice for at least two years (Lindsay et al. 2003; Lindsay and Dubey 2009). The survival of oocysts in sediments is unknown, but could be increased as the adsorption of pathogens

to particles in the sediment may reduce deleterious effects such as the UV radiations (Ferguson et al. 2003). A greater survival of *T. gondii* oocysts in this medium could allow them to accumulate over long periods and potentially to be re-suspended in the estuaries as changes in river discharge rate occur as has been hypothesised for other protozoal oocysts (Ferguson et al. 2003).

Exposure of marine organisms to oocysts

High concentration of oocysts in estuaries

Rates of exposure and infection of estuarine fauna would be expected to be higher when concentrations of protozoal oocysts in the runoff are high, and the concentration would likely be influenced by all the factors discussed in the previous sections. The concentrations may be influenced by the *T. gondii* oocyst load within the watershed, the kinetics of their release from a melting snowpack and soil to estuarine areas and meteorological conditions. The oocyst load and the dynamic of their release to streams may depend on the processes driving the accumulation of infective oocysts within snowpack and into the soil, their transport from those media to the streams as described above. In particular, the oocysts could be flushed in the first meltwater during the early snowmelt period because of their hydrophilic nature. The meteorological conditions directly influence the volume of runoff via the amount of precipitation (accumulated snow and spring rain) but also indirectly via the temperature, which govern the intensity and duration of snowmelt. Fast melting at the watershed scale, allowing a better homogeneity in the release of oocysts with a more efficient leaching, may favour high concentration into the streamflow (Meyer and Wania 2008). As well, rain-on-snow events may enhance the release of oocysts from faecal matter and may enhance the transport of oocysts within the snowpack, by accelerating melt intensity and by leaching through snowpack (Meyer and Wania 2008).

Ecology of marine species

In the spring, the strong freshwater run-off in some estuaries draining the Canadian Arctic watershed stimulates upwelling of nutrient-rich water, leading to a high biological productivity, which attracts a high diversity and abundance of organisms in those areas (Mann and Lazier 2006). If the distribution and the concentration of oocysts in the water column in the estuarine and coastal environments vary according to the aforementioned physical and biological processes, the organisms living in those areas may be differentially exposed to oocysts depending on their habitat selection within the water column. Marine mammals could become directly infected via drinking water or more likely via the consumption of their prey, in which concentration of *T. gondii* oocysts could occur. Filter feeders exposed to coastal freshwater runoff, are strongly suspected to be the source of *T. gondii* infection for Californian southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) (Miller et al. 2002). Recently, a case-control study identified eating raw oysters, clams, or mussels as a new risk factor for recent *T. gondii* infection in the United States (Jones et al. 2009), suggesting that consumption of shellfish is a substantial source of infection. In the Canadian Arctic, several species of pinnipeds, cetaceans or birds can feed on the benthic fauna including bivalves, which have been shown to remove *T. gondii* oocysts from contaminated water through filter-feeding activity (Lindsay et al. 2001; Arkush et al. 2003). Furthermore, oocysts can survive and remain infectious to mice up to three months in oysters (*Crassostrea virginica*) (Lindsay et al. 2004). In the field, *T. gondii* has to date only been detected in a wild California mussel (*Mytilus californianus*) (Miller et al. 2008), but the related protozoans *Giardia* and *Cryptosporidium* have been found in marine waters and shellfish worldwide as reviewed by Fayer et al. (2004). Like bivalves, fish could plausibly filter *T. gondii* oocysts out of column water making them an efficient vector for piscivorous marine mammals (Massie et al. 2010). Moreover, some fish species living in both freshwater, where they are particularly exposed to oocysts, and saltwater environments, could then act as phoretic hosts between the rivers and estuarine or sea areas.

Conclusion

Here we have documented multiple processes occurring on large spatio-temporal scales, to build a conceptual framework for the underlying infection of marine mammals in the Canadian Arctic by *T. gondii*. This framework underlines the complexity of processes involved in the fate and transport of *T. gondii* oocysts (and potentially of other pathogens) in the snowmelt runoff. Multiple physical and biological processes interact on the micro, macro or watershed scales, mainly dependent on the hydrological spring event and the ecology of the parasite and susceptible hosts. More specifically, this framework highlights the snowmelt runoff contaminated by oocysts accumulated within snowpack and in the soil as being potentially significant for the exposure of aquatic organisms living along the arctic coastlines in the spring time. Key to this framework is the long-term survival of oocysts at cold temperature, their capacity for transport in watersheds via overland and stream flows and the short and intense event of the high snowmelt flow in the Canadian Arctic likely make up this way of transmission. Furthermore, the seasonal cycle of ecosystems, populations and individual organisms may be important in the magnitude and the timing of exposure to *T. gondii* oocysts.

Globally, the fate and the transport of *T. gondii* oocysts on a watershed scale are completely unknown, mainly because there is a lack of information on their transport properties, survival, and prevalence in the environment (Dumetre et al. 2012). In addition to the limitations of our knowledge on the fate and the transport of pathogens within watersheds (Ferguson et al. 2003), this paper identifies critical points, which are needed to be investigated in order to further understand the transmission pathways of oocysts from snowmelt runoff. As a first step, to assess the magnitude of terrestrial contamination, the oocyst loads may be quantified by estimating the oocysts shedding prevalence and intensity by the lynx (Ferguson et al. 2009). The potential isolation of *T. gondii* oocysts in the lynx faeces could allow assessing their capacity to sporulate, survive and remain infective in a cold environment and to what extent the oocyst loads decrease over the winter. Moreover, the genetic characterisation of those strains would be valuable to track oocysts from the shedding in lynx living in the boreal ecosystems to aquatic organisms living in the

Canadian Arctic coasts. We need also further data on how aquatic organisms are exposed to *T. gondii* oocysts and the spatio-temporal variations associated.

Finally, this work raises the question of estuarine contamination over large spatio-temporal scales by faeces-borne pathogens transported via the spring freshet. For persistent pathogens with large host range and/or being shed in large amount, the contamination of streams via the snowmelt runoff could be important. The diffuse or non-point source contamination by wildlife (or “background” levels) could be a relatively significant contributor to faecal contamination in the pristine watersheds (not impacted by human activities). Within an agricultural watershed, its role in winter contamination may be particularly important since the livestock is mainly confined during the snow coverage season. Largely understudied and often neglected, the faecal contamination by wildlife is difficult to define and quantify, and is one of the main challenge for further research on the diffuse contamination in the watershed (Ferguson et al. 2009).

Acknowledgments

We are grateful for funding from the Public Health Agency of Canada, the Institut national de santé publique du Québec and ArcticNet Network of Centres of Excellence who provided financial support to conduct this research.

References

- Arkush, KD, Miller, MA, Leutenegger, CM, Gardner, IA, Packham, AE, Heckerroth, AR, Tenter, AM, Barr, BC and Conrad, PA (2003). Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1087-1097.
- Conrad, PA, Miller, MA, Kreuder, C, James, ER, Mazet, J, Dabritz, H, Jessup, DA, Gulland, F and Grigg, ME (2005). Transmission of *Toxoplasma*: clues from the

study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), 1155-1168.

- Davies, CM, Ferguson, CM, Kaucner, C, Krogh, M, Altavilla, N, Deere, DA and Ashbolt, NJ (2004). Dispersion and transport of *Cryptosporidium* oocysts from fecal pats under simulated rainfall events. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1151-1159.
- Dubey, JP (1998). *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *Journal of Parasitology*, 84(4), 862-865.
- Dubey, JP (Ed.) (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*, CRC Press, Boca Raton.
- Dumetre, A, Aubert, D, Puech, PH, Hohweyer, J, Azas, N and Villena, I (2012). Interaction Forces Drive the Environmental Transmission of Pathogenic Protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 905-912.
- Fayer, R, Dubey, JP and Lindsay, DS (2004). Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitology*, 20(11), 531-536.
- Ferguson, C, Husman, AMD, Altavilla, N, Deere, D and Ashbolt, N (2003). Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 33(3), 299-361.
- Ferguson, CM, Charles, K and Deere, DA (2009). Quantification of Microbial Sources in Drinking-Water Catchments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(1), 1-40.
- Fraser, RH, Barten, PK and Pinney, DAK (1998). Predicting stream pathogen loading from livestock using a geographical information system-based delivery model. *Journal of Environmental Quality*, 27(4), 935-945.
- Frenkel, JK and Dubey, JP (1973). Effects of freezing on the viability of *toxoplasma* oocysts. *Journal of Parasitology*, 59(3), 587-588.
- Frenkel, JK, Ruiz, A and Chinchilla, M (1975). Soil survival of *toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24(3), 439-443.
- Jamieson, R, Gordon, R, Joy, D and Lee, H (2004). Assessing microbial pollution of rural surface waters - A review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management*, 70(1), 1-17.
- Jones, JL, Dargelas, V, Roberts, J, Press, C, Remington, JS and Montoya, JG (2009). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 878-884.
- Lindsay, DS, Phelps, KK, Smith, SA, Flick, G, Sumner, SS and Dubey, JP (2001). Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters

- (*Crassostrea virginica*). The Journal of Eukaryotic Microbiology, Suppl, 197S-198S.
- Lindsay, DS, Blagburn, BL and Dubey, JP (2002). Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. Veterinary Parasitology, 103(4), 309-313.
- Lindsay, DS, Collins, MV, Mitchell, SM, Cole, RA, Flick, GJ, Wetch, CN, Lindquist, A and Dubey, JP (2003). Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. Journal of Eukaryotic Microbiology, 50 Suppl, 687-688.
- Lindsay, DS, Collins, MV, Mitchell, SM, Wetch, CN, Rosypal, AC, Flick, GJ, Zajac, AM, Lindquist, A and Dubey, JP (2004). Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). Journal of Parasitology, 90(5), 1054-1057.
- Lindsay, DS and Dubey, JP (2009). Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. Journal of Parasitology, 95(4), 1019-1020.
- Mann, KH and Lazier, JRN (2006). Dynamics of marine ecosystems biological-physical interactions in the oceans. Blackwell Pub., Malden, MA. <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=3398>.
- Massie, GN, Ware, MW, Villegas, EN and Black, MW (2010). Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. Veterinary Parasitology, 169(3-4), 296-303.
- McGechan, MB (2002). Transport of particulate and colloid-sorbed contaminants through soil, part 2: Trapping processes and soil pore geometry. Biosystems Engineering, 83(4), 387-395.
- Meyer, T and Wania, F (2008). Organic contaminant amplification during snowmelt. Water Research, 42(8-9), 1847-1865.
- Miller, MA, Gardner, IA, Kreuder, C, Paradies, DM, Worcester, KR, Jessup, DA, Dodd, E, Harris, MD, Ames, JA, Packham, AE and Conrad, PA (2002). Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). International Journal for Parasitology, 32(8), 997-1006.
- Miller, MA, Miller, WA, Conrad, PA, James, ER, Melli, AC, Leutenegger, CM, Dabritz, HA, Packham, AE, Paradies, D, Harris, M, Ames, J, Jessup, DA, Worcester, K and Grigg, ME (2008). Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. International Journal for Parasitology, 38(11), 1319-1328.
- Mowat, G, Poole, KG and O'Donoghue, M (2000). Ecology of lynx in northern Canada and Alaska. In Ecology and Conservation of Lynx in the United States (eds. Ruggiero, LF, Aubry, KB, Buskirk, SW, Koehler, GM, Krebs, CJ, McKelvey, KS, and Squires, JR), pp. 265-306. University of Colorado Press, Boulder, Colorado.

- Shapiro, K, Largier, J, Mazet, JA, Bernt, W, Ell, JR, Melli, AC and Conrad, PA (2009). Surface properties of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1185-1191.
- Shapiro, K, Conrad, PA, Mazet, JA, Wallender, WW, Miller, WA and Largier, JL (2010). Effect of estuarine wetland degradation on the transport of *Toxoplasma gondii* surrogates from land to sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6821-6828.
- Simon, A, Chambellant, M, Ward, BJ, Simard, M, Proulx, JF, Levesque, B, Bigras-Poulin, M, Rousseau, AN and Ogden, NH (2011). Spatio-temporal variations and age effect on *Toxoplasma gondii* seroprevalence in seals from the Canadian Arctic. *Parasitology*, 1-7. doi: 10.1017/S0031182011001260.
- Tate, KW, Atwill, ER, George, MR, McDougald, MK and Larsen, RE (2000). *Cryptosporidium parvum* transport from cattle fecal deposits on California rangelands. *Journal of Range Management*, 53(3), 295-299.
- Whitman, RL, Przybyla-Kelly, K, Shively, DA, Nevers, MB and Byappanahalli, MN (2008). Sunlight, season, snowmelt, storm, and source affect *E. coli* populations in an artificially ponded stream. *Science of the Total Environment*, 390(2-3), 448-455.
- Woo, M-K (1993). Northern Hydrology. In *Canada's cold environments* (eds. French, HM, and Slaymaker, O), pp. 117-142. McGill-Queen's University Press, Montréal; Buffalo.
- Yilmaz, SM and Hopkins, SH (1972). Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Journal of Parasitology*, 58(5), 938-939.
- Zhu, ZX, Broersma, K and Mazumder, A (2011). Model Assessment of Cattle and Climate Impacts on Stream Fecal Coliform Pollution in the Salmon River Watershed, British Columbia, Canada. *Water Air and Soil Pollution*, 215(1-4), 155-176.

Figures

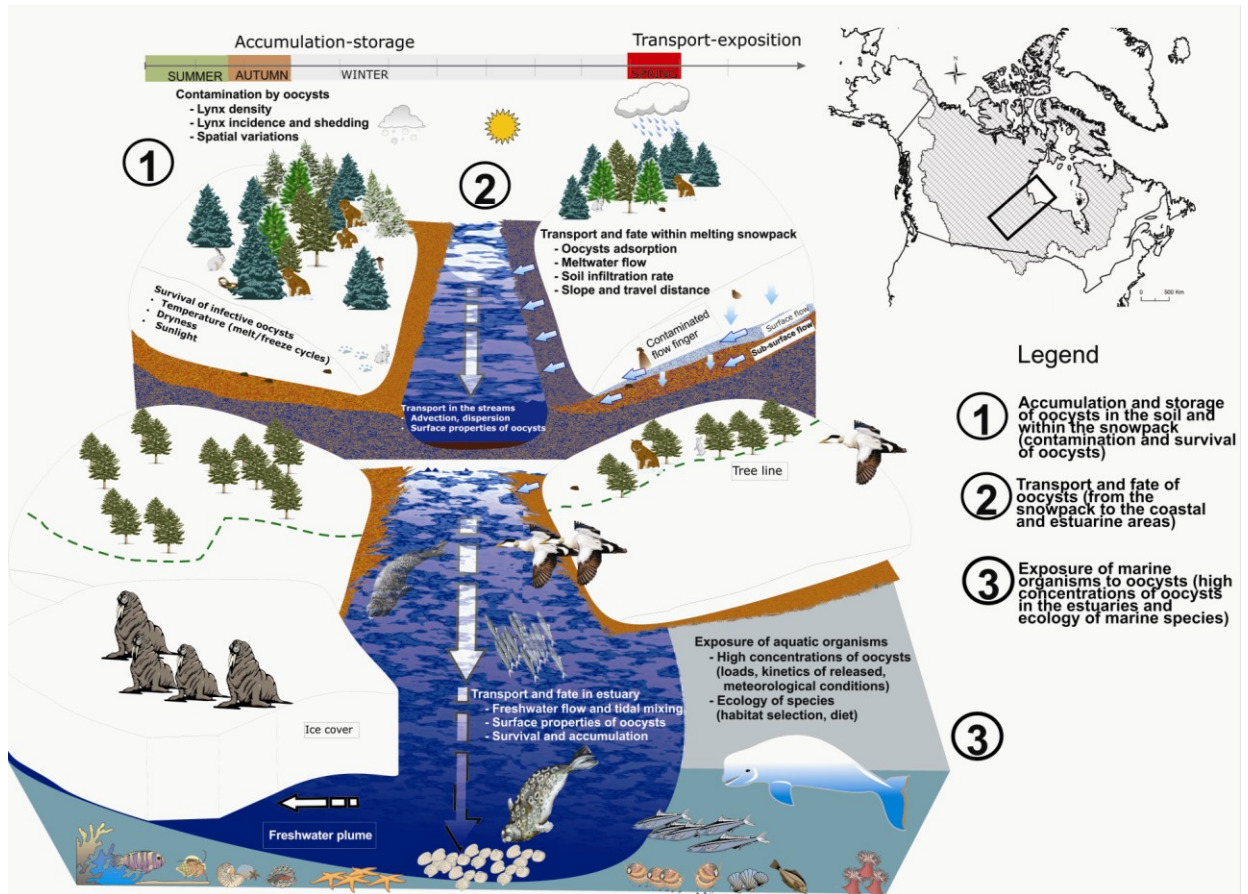


Figure 10. Diagram of the fate and transport of *Toxoplasma gondii* oocysts from the melting snowpack to the Canadian arctic coast via the freshwater runoff within the Canadian Arctic watershed.

Evidence for spatio-temporal dynamics of *Toxoplasma gondii* infection in Canadian lynx (*Lynx canadensis*) in western Québec, Canada³

Audrey Simon¹, Michel Bigras Poulin¹, Alain N. Rousseau², Jitender P. Dubey³,
Nicholas H. Ogden^{1, 4}

1 Groupe de recherche en épidémiologie des zoonoses et santé publique, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, CP 5000, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

2 Institut national de recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, G1K 9A9, Québec, Canada

3 United States Department of Agriculture, Animal and Natural Resources Institute, Animal Parasitic Diseases Laboratory, Building 1001, Beltsville, MD 20705-2350, USA

4 Zoonoses Division, Centre for Foodborne, Environmental and Zoonotic Infectious Diseases, Public Health Agency of Canada, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

³ Article accepté dans *Journal of Wildlife Diseases* (juillet 2012).

Abstract

Toxoplasma gondii, one of the more common zoonotic parasites in the world, can cause serious illness in humans and other animals worldwide. Felids are the only known host that can shed *T. gondii* oocysts, which are essential to the perpetuation of the parasite. In much of boreal Canada, the Canadian lynx (*Lynx canadensis*) is the only wild felid host that could contribute to environmental contamination with *T. gondii* oocysts. In this study, we estimated the prevalence of *T. gondii* antibodies in Canadian lynx from western Québec and compared our results with earlier findings in the same region a decade ago. We investigated factors associated with seroconversion including age, sex, geographic location and possible co-location with domestic cats (*Felis catus*) and we assessed the proportion of lynx shedding *T. gondii* oocysts. Blood and fecal samples were collected from 84 lynx harvested by trappers in the eastern part of the study area during winter 2009-2010. Sera were tested for antibodies to *T. gondii* by the modified agglutination test (MAT, cut-off titer 1:50) and fecal samples for parasite eggs by fecal flotation. Antibodies to *T. gondii* were detected in sera of 14% of 84 lynx. Numerous helminth ova and coccidian oocysts were found in feces, whereas *T. gondii*-like oocysts were not detected. The seroprevalence increased with age class (Odd ratio = 4.33, 95% Confidence Interval = 1.57-11.99, $P < 0.01$). Seroprevalence (14%) in the present study was significantly lower than in 84 lynx (36%) trapped in the western part of the study area during winter 1997-1998 (Odd ratio = 0.18, 95% Confidence Interval = 0.08-0.44, $P < 0.001$). Our results suggest there may be occurrence of significant spatio-temporal dynamics of *T. gondii* infection in lynx in Canada, and we review possible abiotic and biotic ecological factors supporting these findings.

Key words: Canadian lynx, predator-prey cycle, snowshoe hare, spatio-temporal dynamic of infection, *Toxoplasma gondii*.

Introduction

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite with a worldwide distribution. It can cause serious illness in humans and other animals, including wildlife (Dubey, 2010). Felids are the only known definitive hosts for *T. gondii*, i.e. the hosts in which sexual reproduction of the parasite occurs, and from which oocysts are shed (Dubey, 2010). As such they are essential to the epidemiology of this parasite. The life-cycle of *T. gondii* is completed when felids ingest oocysts from the contaminated environment or tissue cysts in the infected prey.

Wild felids including lynx can shed *T. gondii* oocysts (Jewell et al., 1972; Miller et al., 1972; Jones and Dubey, 2010). Contamination of a water reservoir by oocysts shed by cougars (*Felis concolor vancouverensis*) and domestic cats (*Felis catus*) was epidemiologically linked to the largest waterborne outbreak of toxoplasmosis in humans on Vancouver Island, British Columbia, Canada (Bowie et al., 1997; Aramini et al., 1998). In much of boreal Canada, the Canadian lynx (*Lynx Canadensis*) is the only wild felid and thus the only possible definitive host of *T. gondii* in sylvatic cycles. The ecology of *T. gondii* in wildlife, including the role of wild felids, has been little explored and further study of lynx as a definitive host for this parasite in northern ecosystems is needed (Mucker et al., 2006; Ryser-Degiorgis et al., 2006; Carme et al., 2009; Garcia-Bocanegra et al., 2010). *T. gondii* infection in the lynx has been recently reviewed (Dubey, 2010; Jones and Dubey, 2010) and the one previous seroprevalence study showed a relatively high *T. gondii* seroprevalence in the Canadian lynx from Quebec, Canada (Labelle et al., 2001). Among felids, ingestion of infected tissue is the most efficient means of transmission of *T. gondii* and is likely the main source of infection of lynx (Afonso et al., 2007; Garcia-Bocanegra et al., 2010). In much of the boreal forest, therefore, the main transmission cycle is likely to involve lynx acquiring *T. gondii* infection from their prey, which being almost entirely herbivores would likely acquire infection by ingestion of oocysts shed by lynx. In some areas around farms and human habitations, that provide food and shelters for domestic cats (Ferreira et al., 2011; Horn et al., 2011), transmission cycles involving cats may overlap those involving lynx as sources of infective oocysts for intermediate hosts, because lynx can tolerate human presence within their home range (Mowat et al., 2000). Other known additional transmission pathways include: (i) cannibalistic or carrion consumption by some

predators resulting in predator-to-predator transmission although this is likely an infrequent source of infection for lynx given cannibalism is uncommon and they typically prefer feeding on freshly killed prey over scavenging (Mowat et al., 2000), and (ii) vertical transmission by pregnant females to their offspring although there is no evidence whether or not this occurs in Canadian lynx.

In the current study, our aims were: (i) to obtain estimates of the prevalence of *T. gondii* antibodies in Canadian lynx from western Québec and compare our results with earlier findings in the same region by Labelle et al. (2001), (ii) to investigate factors associated with seroconversion, including age, sex, geographic location and possible co-location with domestic cats that may elucidate main methods of transmission, and (iii) to try to assess the proportion of lynx shedding *T. gondii* oocysts at any one time.

Materials and Methods

Study area and sampling

We conducted a cross-sectional study of *T. gondii* infection among trapped lynx in the Abitibi-Témiscamingue region (65,000 km²; 48° 34' N, 78° 7' W), in north western Quebec, Canada (Figure 11). Human population density is relatively low across Abitibi-Témiscamingue (2.5 habitants per km²) with urban areas and agricultural land concentrated in the western part of the region. Average precipitation is about 900 mm, which is typical of the temperate continental climate of Quebec (precipitation ranging between 1000 and 1500 mm along the St. Lawrence Valley, and 750 and 1000 mm in the boreal region (Statistics Canada, 2011)). The temperatures are often cold varying between -20 °C and +20 °C from January to June. The territory is divided into three types of trapping areas (Figure 11): (i) traplines which are province-registered trapping areas, (ii) wildlife preserves which are large protected areas intended to ensure the conservation of wildlife, and (iii) the 'free zone' which is land owned privately or by the Province on which there are no restrictions to trapping.

This study was based on analysis of 84 Canadian lynx collected by trappers during winter 2009-2010 (November 1st – December 13th) mainly from traplines, located in the North east of Abitibi-Témiscamingue region within the Hudson Bay watershed (Figure 11). All lynx trapped were recovered from the same fur trader. Almost all (95%) were alive when the traps were examined, and the lynx were skinned within twenty four hours of killing and then immediately frozen whole at -20°C. We received the skinned carcasses in the end of trapping season and we collected blood and fecal samples from thawed carcasses. Approximately, 2 g of feces was collected from the rectum of each lynx and stored at 4°C until analysis. Blood samples were taken from the cardiac ventricles and serum obtained after centrifugation of the blood at 3,000 rpm (1260 g) for 5 min was stored at -20°C prior to serological analysis few weeks later. Lynx were classified into young (0.5 y) and adult (≥ 1.5 y) age classes according to carcass size and weight, and the opening of apical foramen of canine root as described by Quinn and Parker (1987). The sex of the animals and the trapping area were recorded.

Serological and coprological analyses

Blood samples were tested for the presence of antibodies to *T. gondii* at the United States Department of Agriculture, Animal Parasitic Diseases Laboratory (USDA-APDL), Beltsville, Maryland. Antibodies to *T. gondii* were detected by the modified direct agglutination test (MAT) as previously described by Dubey and Desmonts (1987). The MAT has been widely used to detect *T. gondii* antibodies in a variety of wild felids and is considered to be both sensitive and specific in mammals (Dubey, 2010). Positive sera were further tested at 100, 200, 400, and 800 dilutions. Positive and negative controls were included in each test. Fecal samples were examined at the Faculty of Veterinary Medicine, St-Hyacinthe, Québec, Canada, for parasites ova and protozoal oocysts by double centrifugation in a saturated zinc sulfate solution (Dryden et al., 2005). Feces were emulsified with 12 ml of tap water, then filtered through a tea strainer and centrifuged at 1,500 rpm (352 g) for 10 minutes. After discarding the supernatant, 10 ml of zinc sulfate solution were added until obtaining a meniscus and the sample was again centrifuged at 1,500 rpm for 10 minutes. A cover slip was placed on the surface and after 10 minutes,

transferred to a microscope slide and examined by light microscopy at 100X magnification for evidence of parasite stages. *T. gondii*-like oocysts were distinguishable from other coccidia based on their round shape and their diameter of 10-12 μm .

Combined analysis of our data and data from Labelle et al. (2001)

We analyzed our results with earlier findings in the same region by Labelle et al. (2001) which were based on 84 Canadian lynx recovered by trappers during the winter of 1997-1998. Seroprevalence of *T. gondii* with 95% confident intervals were estimated for both years and stratified by sex and age class. Additionally, spatial comparisons in seroprevalences were made among traplines, wildlife preserves, and the ‘free zone’ that is nearer to urbanized areas compared to traplines or wildlife preserves (MRNF, 2006). Therefore, if cats were infectious sources for lynx (via infection of intermediate hosts by cat-derived oocysts), the lynx trapped in ‘free zone’ should be more exposed than the lynx trapped in the other trapping areas.

As predictors for seropositivity for each lynx tested, we investigated sex, age class, year of harvesting, type of trapping area, and their first order interaction. A generalized linear model with a logit link function was used to determine whether there was significant dependence of serologic test result on the stated variables. By examining all possible combinations of predictors the most parsimonious model was selected based on a level of significance $P < 0.05$ for each modeled variable (Dohoo et al., 2003). The relative goodness-of-fit of the models was assessed by Pearson and deviance Chi-square tests (Dohoo et al., 2003). Statistical analyses were performed using SAS 9.1 (SAS Institute Inc., USA).

Additionally, to further investigate the possibility that the presence of domestic cats was a determinant of seropositivity in the lynx, we explored density of farms and urban areas in the lynx home range as indicators of domesticated cat density. This possibility is relatively unlikely for the data obtained in the present study because the capture sites are a long distance from human habitation (more than 15 km on average) but it could have been a factor causing geographic variation in *T. gondii* seropositivity in the data of Labelle et al.

(2001). Geographical coordinates for the 1997 dataset were available for 78 lynx and the six missing data points were omitted from the analysis. The location of farms in the study area was obtained from the database of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Quebec (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec: MAPAQ). A variable was built based on the count of number of farms and villages or towns within a buffer representing the lynx home range, and centered on each harvested lynx. Since the lynx home range shows dramatic variations across their North American range, varying between 8 and 738 km² (Mowat et al., 2000), several buffers of varying sizes were selected to conduct regression analyses (radii of 1.6, 5, 10 and 15.3 km, corresponding to a surface area of 8, 78, 314 and 735 km², respectively). Logistic regression models were fitted to the data for each density variable in order to explore the relationship between the serological result for each lynx and the density of farms and cities within the lynx home range. Linearity of the relationship between the continuous variables of density and the log odds of the seropositivity was assessed by categorizing those variables and visualizing plots of the log odds of the outcome against the midpoints of the categories (Dohoo et al., 2003). Mapping and spatial analyses were carried out using ArcMap 9.3 (ESRI Inc., USA).

Results

Descriptive analysis

Ages and sex ratio differed between the two sampling periods (Table VII). The sampling dataset from 1997 had larger numbers of young lynx and females compared with 2009. Seropositive and seronegative lynx were relatively well distributed across the study areas (Figure 11). The samples used in the current study were more geographically concentrated than the samples used in the study of Labelle et al. (2001), and the locations of both samplings did not overlap (Figure 11).

In 2009, a total of 12 out of 84 lynx (14%; 95% Confidence Interval = 7-22) were seropositive for *T. gondii* with serological titres of 1:100 in 8, 1:200 in 3 and 1:800 in 1. In comparison, 30 out of 84 lynx (36%; 95% CI = 25-46) were seropositive in 1997 at 1:50 dilution. We found numerous helminth ova and coccidian oocysts (of a size of the same order as *T. gondii* oocysts) in most of the fecal samples collected in 2009, whereas *T. gondii*-like oocysts were not detected. Table VII shows the antibody prevalence among lynx according to sex, age class and trapping area for each year of sampling. Figure 11 shows the geographic distribution and the serostatus of each sampled lynx for the two datasets.

Regression analysis

According to the most parsimonious multivariable logistic regression model for *T. gondii* seropositivity, age class ($P < 0.01$) and year of harvesting ($P < 0.001$) were the variables kept in the model. The seropositivity in lynx was significantly lower in 2009 compared to 1997 (Odd ratio = 0.18, 95% Confidence Interval = 0.08-0.44, $P < 0.001$), and significantly higher in the adults compared to young (Odd ratio = 4.33, 95% Confidence Interval = 1.57-11.99, $P < 0.01$). Sex and type of trapping area were not significant variables in the model adjusted for potential confounding by age and sampling year ($P > 0.1$). No statistically significant interaction was observed between the variables age class and year of harvesting ($P > 0.1$). When the logistic regression model was re-created using data for lynx trapped in 1997, the density of farms and cities within the lynx home range were not statistically significant, regardless of the size of lynx home range used for the both variables.

Discussion and conclusion

The seroprevalence in lynx sampled in 2009 (14%) was lower than that found in the study of Labelle et al. (2001) (36%) but were comparable to values found for lynx

elsewhere in the world (ranging from 15% to 83% (Zarnke et al., 2001; Riley et al., 2004; Jones and Dubey, 2010)).

Seroprevalence was significantly and over four fold (accounting for geographic/temporal variations) greater in adult than young lynx. As detectable antibody responses to *T. gondii* can persist for several years in many species, seroprevalence likely represents an estimate of the cumulative likelihood of exposure for each age class (Zarnke et al., 2001; Ryser-Degiorgis et al., 2006; Garcia-Bocanegra et al., 2010). Therefore, this supports the hypothesis that the main source of *T. gondii* infection in lynx is their prey, although a low-level of vertical transmission cannot be ruled out. Variation in availability of different prey species may result in variations in incidence of infection in other felid species (Kikuchi et al., 2004; Afonso et al., 2006; Ryser-Degiorgis et al., 2006), and some limited prey switching has been observed for lynx when the snowshoe hare populations are minimal (O'Donoghue et al., 1998). However, for most years, the source of infection for the Canadian lynx is most likely snowshoe hares (*Lepus americanus*) since they feed almost exclusively on this species of prey throughout their range (Mowat et al., 2000), particularly in the eastern part of Canada where the lynx in this study were sampled (Roth et al., 2007). Evidence of infection in other species of hare has been reported in several countries (Gustafsson and Uggla, 1994; Gustafsson et al., 1997a; Gustafsson et al., 1997b; Frolich et al., 2003; Dubey, 2010; Jokelainen et al., 2011). So although we do not have direct evidence for *T. gondii* infection in snowshoe hares in Canada it would be expected that this species would be capable of acting as an intermediate host. As herbivores, snowshoe hares may become infected by ingestion of oocysts from contaminated herbage. Further studies on infection in snowshoe hares would help to define their role as source of *T. gondii* infection for lynx.

In the present study, seroprevalence in lynx sampled in 2009 (14%) was significantly lower than that found during 1997 trapping (36%) accounting for increasing seroprevalence with age. Both our study and that of Labelle et al. (2001) tested sera using the same methods, reagents and the same dilution of sera so difference in seroprevalence between the studies may be the result of spatio-temporal dynamics of *T. gondii* infection in lynx in the Canada's boreal forest. The locations where lynx were trapped in 2009 and 1997

were not the same: those trapped in 2009 were mostly from the east of the region while those trapped in 1997 were mostly from the west of the region (Figure 11), possibly because of spatial variation in trapping effort across years but also because of the trap site preferences of the different trappers who provided carcasses used in the two studies. Therefore, we cannot exclude a spatial effect to explain the difference in *T. gondii* prevalence among lynx over the two samplings. However, the boreal forest habitat in the northern part of the Abitibi-Témiscamingue, where over 90% of lynx were trapped in both studies (Figure 11), is very homogenous across the region with the exception of variations in human densities and the presence of agricultural land, which were higher in the western part compared to the eastern part of the region (MRNF, 2006). We hypothesized that this would result in higher densities of domestic cats making a greater contribution to environmental contamination with *T. gondii* oocysts in the western part of our study area (Lehrer et al., 2010; Fredebaugh et al., 2011) and greater exposure of lynx in this region via increased prevalence of infected snowshoe hare preys. However, the densities of farms and human communities within the home range of lynx trapped in the western part of Abitibi-Témiscamingue did not significantly affect the probability of a lynx being seropositive. Farms and urban areas, where the potential infectious contact between both felids can occur, likely represent a proxy for domestic cat density as cats have relatively small home ranges centered on farms or urban areas ($< 5 \text{ km}^2$) (Barratt, 1997; Ferreira et al., 2011; Horn et al., 2011). It is possible that these proxy variables did not fully capture the overlap in transmission cycles maintained by lynx and domestic cats as long distance movements ($>100 \text{ km}$) of Canadian lynx do occur (Mowat et al., 2000; Schwartz et al., 2002). To study the geographic variations in *T. gondii* transmission at a local scale, and particularly interactions with felid density, habitat and oocyst abundance and survival, snowshoe hares that disperse shorter distances may be better sentinels (Mowat et al., 2000; Fredebaugh et al., 2011).

Temporally cyclic variations in infection prevalence could be another explanation for the higher proportion of seropositive lynx in 1997 than in 2009. Canadian lynx and snowshoe hares share a close relationship in their population dynamics with abundance of the lynx population varying in response to abundance of snowshoe hares (Mowat et al., 2000). This cycle has been considered as a classical predator-prey cycle (Elton and

Nicholson, 1942; Krebs et al., 2001), and it is likely that parasite transmission varies depending on relative densities of intermediate and definitive hosts and variations in the birth, death and production of susceptible, infective and immune (if any) hosts during the cycle (Lelu et al., 2010). During periods of increasing density of lynx and hares, we would expect transmission dynamic of *T. gondii* to become more efficient (Begon et al., 2006). Following cyclical hare crash, the dramatic decline in lynx numbers because of lower adult and kitten survival (Mowat et al., 2000) and a lower incidence of *T. gondii* infection of hares may cause a decrease in transmission and of seroprevalence. According to indices of lynx abundance in the Abitibi-Témiscamingue region, the lynx population was at a point of high density during the 1997 sampling period, whereas it was decreasing during the 2009 sampling period (Fortin and Tardif, 2003; Paul and Trudeau, 2010) which explains the markedly different ratio of young compared to adult lynx harvested in 1997 (1:1.5) compared to 2009 (1:11) (Table VII). Therefore, the proportion of seropositive lynx found higher in 1997 than in 2009 support the hypothesis of lynx and hare density cycles as possible causes of variation in *T. gondii* exposure. However, abiotic factors may also explain the temporal dynamic of *T. gondii* transmission through temperature, humidity and rainfall affecting oocyst survival (Frenkel et al., 1975; Dubey, 1998), and transmission to prey (Afonso et al., 2009).

That 14% of lynx were found seropositive in the eastern part of Abitibi-Témiscamingue within the Hudson Bay watershed, where domestic cat density is likely very low, supports the idea that lynx may alone be capable of playing the key role of definitive hosts in *T. gondii* transmission cycles in wildlife. The existence of a sylvatic transmission cycle of *T. gondii* has been suggested for other wild felids species (Mucker et al., 2006; Ryser-Degiorgis et al., 2006; Carme et al., 2009; Garcia-Bocanegra et al., 2010). The Hudson Bay watershed comprises an extremely large area of boreal Canada. Therefore, oocysts potentially produced by lynx could contribute to contamination of the coastal marine environment, especially in Canada (Dubey et al., 2009; Simon et al., 2011), as do those produced by domestic cats are thought to do in California (Conrad et al., 2005; Miller et al., 2008).

In the present study *T. gondii* oocysts were not detected in the feces of the lynx. However the difficulty in detecting *T. gondii* oocysts in felids is well recognized, and the fecal flotation method is less sensitive than mouse bioassay (Dubey, 2010) or PCR (Lalonde and Gajadhar, 2011) although these techniques were not available to us for this study. It is very possible that low numbers of small *T. gondii* oocysts could have been missed in our study and it is likely that lynx are capable of excreting oocysts as are other felids (Ryser-Degiorgis et al., 2006; Garcia-Bocanegra et al., 2010; Jones and Dubey, 2010). As some atypical genotypes of *T. gondii* do not infect mice, fecal based PCR methods may be the method of choice for future work. Genetic characterization of circulating *T. gondii* strains in hares and lynx would also assist assessment of the relative importance of wild and domestic felids in transmission of *T. gondii* in Canada.

The lynx-snowshoe hare system may constitute a uniquely simplified natural system to study and improve our knowledge of the ecology of transmission cycles of *T. gondii* and their biotic and abiotic drivers in the wild. Immediately, the discovery of seropositive lynx suggests that biologists and veterinarians could acquire infection during sampling of lynx (by the skinning process (McDonald et al., 1990) or the collecting of feces) and should perhaps wear gloves to avoid potential contact with *T. gondii* cysts or oocysts. Additionally, in the study area, the thighs of harvested lynx are consumed by the trappers and it would be prudent to advise trappers to cook them thoroughly before eating.

In conclusion, this study revealed that populations of Canadian lynx could be the key definitive host for *T. gondii* in the boreal forest environment maintaining transmission by infecting their prey by environmental contamination with oocysts. As such, lynx may be the main source of environmental contamination with *T. gondii* oocysts in this region. However, further studies aimed at detecting oocysts in lynx feces and determining the nature of the sylvatic cycle are required to confirm this. Our study suggests that there may be spatio-temporal dynamics in the transmission cycles, which could be associated with linked cyclicity in predator and prey abundance. Further studies with additional years of data looking at *T. gondii* prevalence in relation to the predator prey cycle are required.

Acknowledgments

We would like to thank the fur trader Claude Grenier for providing trapped lynx and Véronique Paul, Caroline Trudeau, Nicole Blanchette and Hélène Jolicoeur (MRNF) for scientific expertise and help with GIS data. Our sincere thanks go to Philippe Labelle for making available data on lynx trapped in 1997. We gratefully acknowledge the personnel from CQSAS (Faculty of veterinary medicine, Quebec) for their technical help in the necropsy of lynx, and Alain Villeneuve and his staff (Faculty of veterinary medicine, Quebec) for conducting parasitological analyses. Finally, we thank André Ravel, Tiffanie Nelson, the Assistant Editor and the reviewers for their excellent and helpful comments on earlier versions of the manuscript.

Literature cited

- AFONSO, E., P. THULLIEZ, AND E. GILOT-FROMONT. 2006. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *International Journal for Parasitology* 36: 1373-1382.
- AFONSO, E., P. THULLIEZ, AND E. GILOT-FROMONT. 2009. Local meteorological conditions, dynamics of seroconversion to *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*) and oocyst burden in a rural environment. *Epidemiology and Infection*: 1-9.
- AFONSO, E., P. THULLIEZ, D. PONTIER, AND E. GILOT-FROMONT. 2007. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. *Parasitology* 134: 1963-1971.
- ARAMINI, J. J., C. STEPHEN, AND J. P. DUBEY. 1998. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *The Journal of Parasitology* 84: 438-440.
- BARRATT, D. G. 1997. Home range size, habitat utilisation and movement patterns of suburban and farm cats *Felis catus*. *Ecography* 20: 271-280.
- BEGON, M., C. R. TOWNSEND, AND J. L. HARPER, (eds.) 2006. *Ecology : from individuals to ecosystems*. 4th edition. Blackwell Publishing, Malden, MA, 738 pp.
- BOWIE, W. R., A. S. KING, D. H. WERKER, J. L. ISAAC-RENTON, A. BELL, S. B. ENG, AND S. A. MARION. 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet* 350: 173-177.
- CARME, B., M. DEMAR, D. AJZENBERG, AND M. L. DARDE. 2009. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases* 15: 656-658.
- CONRAD, P. A., M. A. MILLER, C. KREUDER, E. R. JAMES, J. MAZET, H. DABRITZ, D. A. JESSUP, F. GULLAND, AND M. E. GRIGG. 2005. Transmission of *Toxoplasma*: clues

- from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology* 35: 1155-1168.
- DOHOO, I. R., S. W. MARTIN, AND H. STRYHN, (eds.) 2003. *Veterinary epidemiologic research*. Atlantic Veterinary College Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, 706 pp.
- DRYDEN, M. W., P. A. PAYNE, R. RIDLEY, AND V. SMITH. 2005. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Veterinary Therapeutics : Research in Applied Veterinary Medicine*. 15-28 pp.
- DUBEY, J. P. 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *The Journal of Parasitology* 84: 862-865.
- DUBEY, J. P., (ed.) 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, 313 pp.
- DUBEY, J. P., AND G. DESMONTS. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal* 19: 337-339.
- DUBEY, J. P., J. MERGL, E. GEHRING, N. SUNDAR, G. V. VELMURUGAN, O. C. KWOK, M. E. GRIGG, C. SU, AND D. MARTINEAU. 2009. Toxoplasmosis in captive dolphins (*Tursiops truncatus*) and walrus (*Odobenus rosmarus*). *The Journal of Parasitology* 95: 82-85.
- ELTON, C., AND M. NICHOLSON. 1942. The ten-year cycle in numbers of lynx in Canada. *Journal of Animal Ecology* 11: 215-244.
- FERREIRA, J. P., I. LEITAO, M. SANTOS-REIS, AND E. REVILLA. 2011. Human-Related Factors Regulate the Spatial Ecology of Domestic Cats in Sensitive Areas for Conservation. *Plos One* 6.
- FORTIN, C., AND J. TARDIF. 2003. Situation du lynx du Canada (*Lynx canadensis*) au Québec. *Société de la faune et des parcs du Québec*, Québec. 41 pp.
- FREDEBAUGH, S. L., N. E. MATEUS-PINILLA, M. MCALLISTER, R. E. WARNER, AND H.-Y. WENG. 2011. Prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* in terrestrial wildlife in a natural area. *Journal of Wildlife Diseases* 47: 381-392.
- FRENKEL, J. K., A. RUIZ, AND M. CHINCHILLA. 1975. Soil survival of *toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24: 439-443.
- FROLICH, K., J. WISSER, H. SCHMUSER, U. FEHLBERG, H. NEUBAUER, R. GRUNOW, K. NIKOLAOU, J. PRIEMER, S. THIEDE, W. J. STREICH, AND S. SPECK. 2003. Epizootiologic and ecologic investigations of European brown hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 751-761.
- GARCIA-BOCANEGRA, I., J. P. DUBEY, F. MARTINEZ, A. VARGAS, O. CABEZON, I. ZORRILLA, A. ARENAS, AND S. ALMERIA. 2010. Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Parasitology* 167: 36-42.
- GUSTAFSSON, K., AND A. UGGLA. 1994. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* infection in the brown hare (*Lepus europaeus* P.) in Sweden. *Journal of Wildlife Diseases* 30: 201-204.
- GUSTAFSSON, K., A. UGGLA, AND B. JARPLID. 1997a. *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). I. Pathology. *Journal of Comparative Pathology* 117: 351-360.

- GUSTAFSSON, K., E. WATTRANG, C. FOSSUM, P. M. HEEGAARD, P. LIND, AND A. UGGLA. 1997b. *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). II. Early immune reactions. *Journal of Comparative Pathology* 117: 361-369.
- HORN, J. A., N. MATEUS-PINILLA, R. E. WARNER, AND E. J. HESKE. 2011. Home Range, Habitat Use, and Activity Patterns of Free-Roaming Domestic Cats. *Journal of Wildlife Management* 75: 1177-1185.
- JEWELL, M. L., J. K. FRENKEL, K. M. JOHNSON, V. REED, AND A. RUIZ. 1972. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21: 512-517.
- JOKELAINEN, P., M. ISOMURSU, A. NAREAHO, AND A. OKSANEN. 2011. Natural *Toxoplasma Gondii* Infections in European Brown Hares and Mountain Hares in Finland: Proportional Mortality Rate, Antibody Prevalence, and Genetic Characterization. *Journal of Wildlife Diseases* 47: 154-163.
- JONES, J. L., AND J. P. DUBEY. 2010. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Experimental Parasitology* 124: 10-25.
- KIKUCHI, Y., B. B. CHOMEL, R. W. KASTEN, J. S. MARTENSON, P. K. SWIFT, AND S. J. O'BRIEN. 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Veterinary Parasitology* 120: 1-9.
- KREBS, C. J., R. BOONSTRA, S. BOUTIN, AND A. R. E. SINCLAIR. 2001. What drives the 10-year cycle of snowshoe hares? *Bioscience* 51: 25-35.
- LABELLE, P., J. P. DUBEY, I. MIKAEIAN, N. BLANCHETTE, R. LAFOND, S. ST-ONGE, AND D. MARTINEAU. 2001. Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) from Quebec, Canada. *The Journal of Parasitology* 87: 1194-1196.
- LALONDE, L. F., AND A. A. GAJADHAR. 2011. Detection and Differentiation of Coccidian Oocysts by Real-Time Pcr and Melting Curve Analysis. *Journal of Parasitology* 97: 725-730.
- LEHRER, E. W., S. L. FREDEBAUGH, R. L. SCHOOLEY, AND N. E. MATEUS-PINILLA. 2010. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in woodchucks across an urban-rural gradient. *Journal of Wildlife Diseases* 46: 977-980.
- LELU, M., M. LANGLAIS, M. L. POULLE, AND E. GILOT-FROMONT. 2010. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* along an urban-rural gradient. *Theoretical Population Biology* 78: 139-147.
- MCDONALD, J. C., T. W. GYORKOS, B. ALBERTON, J. D. MACLEAN, G. RICHER, AND D. JURANEK. 1990. An outbreak of toxoplasmosis in pregnant women in northern Quebec. *The Journal of Infectious Diseases* 161: 769-774.
- MILLER, M. A., W. A. MILLER, P. A. CONRAD, E. R. JAMES, A. C. MELLI, C. M. LEUTENEGGER, H. A. DABRITZ, A. E. PACKHAM, D. PARADIES, M. HARRIS, J. AMES, D. A. JESSUP, K. WORCESTER, AND M. E. GRIGG. 2008. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology* 38: 1319-1328.
- MILLER, N. L., J. K. FRENKEL, AND J. P. DUBEY. 1972. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *The Journal of Parasitology* 58: 928-937.

- MOWAT, G., K. G. POOLE, AND M. O'DONOGHUE. 2000. Ecology of lynx in northern Canada and Alaska. *In Ecology and Conservation of Lynx in the United States*, L. F. Ruggiero, K. B. Aubry, S. W. Buskirk, G. M. Koehler, C. J. Krebs, K. S. Mckelvey, AND J. R. Squires, (eds.). University of Colorado Press, Boulder, Colorado. pp. 265-306.
- MRNF. 2006. Portrait Territorial: Abitibi-Témiscamingue. Direction générale de l'Abitibi-Témiscamingue. www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/territoire/planification/portrait-abitibi.pdf.
- MUCKER, E. M., J. P. DUBEY, M. J. LOVALLO, AND J. G. HUMPHREYS. 2006. Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the Pennsylvania bobcat (*Lynx rufus rufus*). *Journal of Wildlife Diseases* 42: 188-191.
- O'DONOGHUE, M., S. BOUTIN, C. J. KREBS, D. L. MURRAY, AND E. J. HOFER. 1998. Behavioural responses of coyotes and lynx to the snowshoe hare cycle. *Oikos* 82: 169-183.
- PAUL, V., AND C. TRUDEAU. 2010. Bilan d'exploitation du lynx du Canada (*Felis lynx*) en Abitibi-Témiscamingue. Ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Rouyn-Noranda. 31 pp.
- QUINN, N. W. S., AND G. PARKER. 1987. Lynx. *In Wild furbearer management and conservation in North America*, M. Novak, J. A. Baker, M. E. Obbard, AND B. Malloch, (eds.). Ontario Trappers Association under the authority of the Ontario Ministry of Natural Resources, Ontario. pp. 1150.
- RILEY, S. P., J. FOLEY, AND B. CHOMEL. 2004. Exposure to feline and canine pathogens in bobcats and gray foxes in urban and rural zones of a national park in California. *Journal of Wildlife Diseases* 40: 11-22.
- ROTH, J. D., J. D. MARSHALL, D. L. MURRAY, D. M. NICKERSON, AND T. D. STEURY. 2007. Geographical gradients in diet affect population dynamics of Canada lynx. *Ecology* 88: 2736-2743.
- RYSER-DEGIORGIS, M. P., E. B. JAKUBEK, C. H. AF SEGERSTAD, C. BROJER, T. MORNER, D. S. JANSSON, A. LUNDEN, AND A. UGGLA. 2006. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-ranging Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from Sweden. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 182-187.
- STATISTICS CANADA. 2011. Human Activity and the Environment: Detailed Statistics. Catalogue no. 16-201-S.
- SCHWARTZ, M. K., L. S. MILLS, K. S. MCKELVEY, L. F. RUGGIERO, AND F. W. ALLENDORF. 2002. DNA reveals high dispersal synchronizing the population dynamics of Canada lynx. *Nature* 415: 520-522.
- SIMON, A., M. CHAMBELLANT, B. J. WARD, M. SIMARD, J. F. PROULX, B. LEVESQUE, M. BIGRAS-POULIN, A. N. ROUSSEAU, AND N. H. OGDEN. 2011. Spatio-temporal variations and age effect on *Toxoplasma gondii* seroprevalence in seals from the Canadian Arctic. *Parasitology*: 1-7.
- ZARNKE, R. L., J. P. DUBEY, J. M. VER HOEF, M. E. MCNAY, AND O. C. KWOK. 2001. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in lynx from interior Alaska. *Journal of Wildlife Diseases* 37: 36-38.

Tables

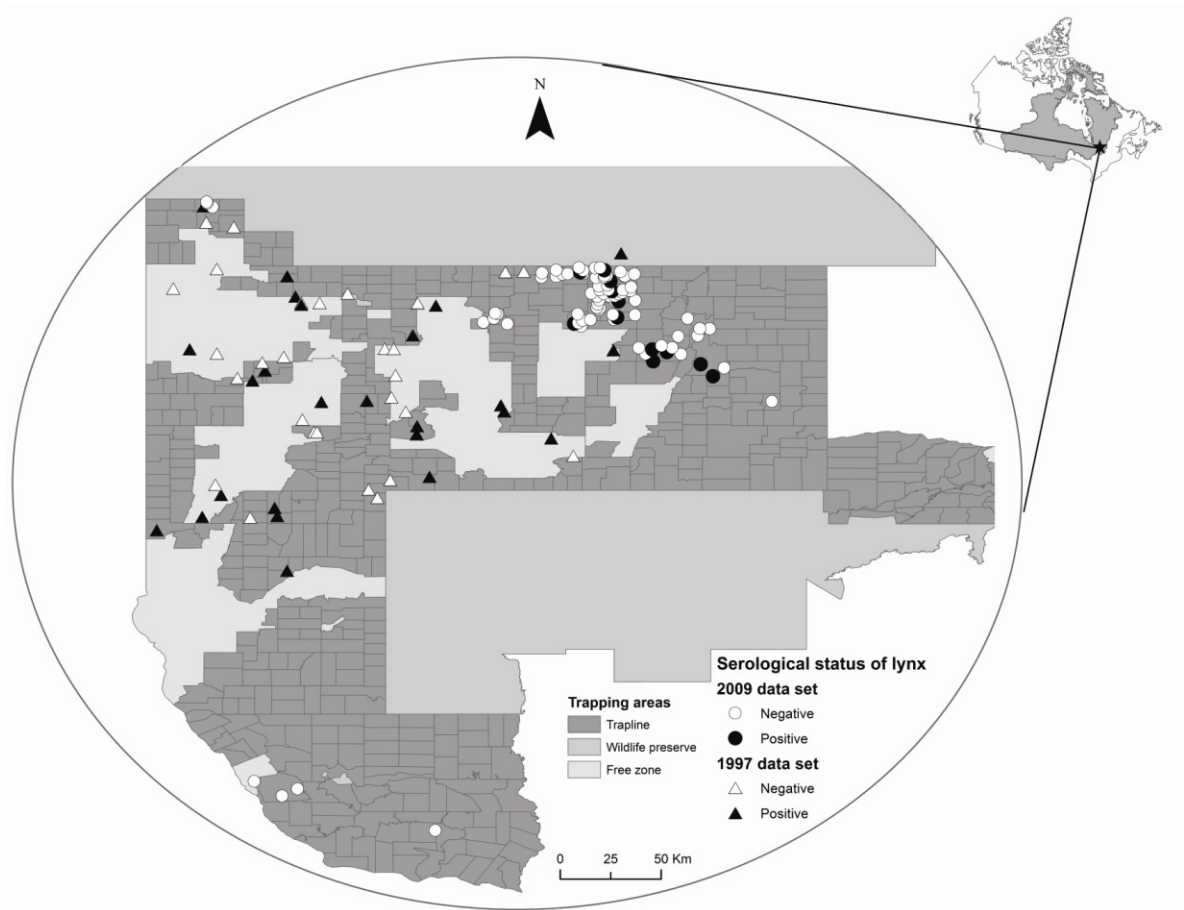
Table VII. Antibody prevalence for *Toxoplasma gondii* with 95% confident intervals (95% CI) (Wald's test) in Canadian lynx trapped during the 1997 and 2009 winters in Abitibi-Témiscamingue, Québec, Canada.

Factors	1997			2009		
	No. of	No. positive	95% CI	No. of	No. positive	95% CI
Sex						
Male	30	6 (20)	6-34	55	10 (18)	8-28
Female	51	23 (45)	31-59	29	2 (7)	1-23 ^a
Unknown	3	1 (33)	1-91 ^a			
Age class						
Young	33	6 (18)	5-31	7	0 (0)	0-41 ^a
Adult	51	24 (47)	33-61	77	12 (16)	7-24
Trapping area						
Traplines	35	14 (40)	24-58 ^a	81	12 (15)	7-23
Free zone	44	13 (30)	16-43	2	0 (0)	0-84 ^a
Wildlife Preserve	1	1 (100)	N/A	1	0 (0)	N/A
Unknown	4	2 (50)	7-93 ^a			
Overall by year	84	30 (36)	25-46	84	12 (14)	7-22

^a Exact 95% CI (Fisher's test)

Figure

Figure 11. Map of the trapping area in Abitibi Témiscamingue, Québec, Canada, located in part within the Hudson Bay watershed (in grey color on the map of Canada) and showing the origin of the Canadian lynx serum samples tested for antibodies against *Toxoplasma gondii*. The locations where lynx were trapped in 1997 are indicated by triangles, and the locations where lynx were captured in 2009 are indicated by circles. In either case, black symbols indicate that the lynx were seropositive for *T. gondii*, and grey symbols indicate that the lynx were seronegative.



Hydrological modelling of *Toxoplasma gondii* oocysts transport to investigate potential infection of marine mammals in the Canadian Arctic from terrestrial sources ⁴

Audrey Simon¹, Alain N. Rousseau², Stéphane Savary², Michel Bigras Poulin¹,
Nicholas H. Ogden^{1, 3}

1 Groupe de recherche en épidémiologie des zoonoses et santé publique, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

2 Institut national de recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, Québec, Québec

3 Zoonoses Division, Centre for Food-borne, Environmental and Zoonotic Infectious Diseases, Public Health Agency of Canada, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

⁴ Article soumis à *Journal of Environmental Management* (juillet 2012)

Abstract

Toxoplasma gondii is a zoonotic protozoan that sometimes causes serious illness in humans and other animals worldwide, including the Canadian Arctic. Wild and domestic felids, the only hosts able to shed *T. gondii* oocysts, are practically non-existent in the Canadian Arctic. So here we explore the hypothesis that *T. gondii* oocysts contaminate the coastal marine environment via surface runoff from across the boreal watershed, particularly during the spring snowmelt period. A watershed model was developed to simulate the hydrological transport of *T. gondii* oocysts during the snowmelt period and test the possible efficiency of land-to-river-to-sea transport as a potential source of marine organisms' exposure to this pathogen. Simulations were run for two pilot watersheds and the results were extrapolated to the Canadian Arctic watershed as a whole. Results indicated that potential maximum *T. gondii* oocysts concentrations in runoff may be reached at the beginning of the snowmelt period with amounts depending on the discharge rates into the rivers and how far upstream oocysts are released. Meteorological conditions during the snowmelt period affected simulated concentrations of oocysts. A key finding is that despite using a conservative approach to estimate overland *T. gondii* oocysts loadings, the ensuing daily stream flow concentrations are potentially large enough to contaminate estuarine/marine filter-feeding organisms such as molluscs on which seals and other marine mammals may feed. These findings support the hypothesis that *T. gondii* oocysts carried from terrestrial transmission cycles in snowmelt runoff could be a significant source of *T. gondii* infection for marine mammals in the Canadian Arctic, and ultimately for arctic human populations that hunt and consume raw meat from marine mammals.

Key words: *Toxoplasma gondii*, river-to-sea transport, snowmelt period, hydrological modeling

Introduction

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is considered to be the most successful known parasite based on the number of infections. This worldwide distributed protozoa is thought to infect all mammal and bird species, and up to one third of the world human population (Tenter et al., 2000). In most cases, *T. gondii* infection is clinically asymptomatic, but it can cause serious illness (toxoplasmosis) in humans, particularly in immunocompromised people and unborn children including neurologic disorders and abortion. Wild and domestic felids, the only definitive hosts (i.e., those in which sexual reproduction of *T. gondii* occurs), play a crucial role, contaminating the environment with millions of *T. gondii* oocysts excreted via their faeces (Dubey, 2010).

Recent evidence from California suggests that the parasite can cross from terrestrial to marine ecosystems via *T. gondii* oocysts that reach the coastal marine environment in surface runoff, allowing the infection of marine mammals such as sea otters (*Enhydra lutris nereis*) (Miller et al., 2008). Indeed, contamination of coastal marine environments by a number of pathogenic protozoa (i.e. *Giardia*, *Cryptosporidium*) excreted in the faeces of terrestrial mammals is a well-recognized problem (Appelbee et al., 2005; Fayer et al., 2004).

Seals from the Canadian arctic have been found to be seropositive for *T. gondii* (Simon et al., 2011), as have marine mammals in a number of studies around the world (Dubey, 2010). We have speculated that *T. gondii* infection of Canadian Arctic seals could be due to contamination of the marine environment by oocysts excreted by felids living upstream (far south of the arctic) and transported via freshwater runoff across the watershed to the estuaries along the arctic coastline of Canada. *T. gondii* oocyst contamination levels in arctic watersheds are unlikely to reach those in watershed of highly urbanized California (which represent a significant source of enteric pathogens for sea otters: Miller et al., 2010) because the densities of lynx are likely much lower in the former than those of domestic and feral cats in the latter. However, in spring, snowmelt runoff water could perhaps act as

a significant source of contamination for arctic coastlines because *T. gondii* oocysts accumulated over winter would be released rapidly within a relatively short melt period, and could allow the exposure of marine organisms to oocysts.

T. gondii oocysts are capable of long-term survival in nature and in laboratory experiments, remain viable in sea water for at least 24 months, and resist freezing (Dubey, 1998; Lindsay and Dubey, 2009). *T. gondii* oocysts could, therefore, be stored and concentrated in snow in boreal Canada during winter. In the Canadian arctic, very large volumes of freshwater runoff from boreal watersheds are discharged into James Bay, Hudson Bay and eventually the Arctic Ocean, during the spring snowmelt period. This may act as large “heavy rainfall events” which are known to act as transport mechanisms for *T. gondii* oocysts that link terrestrial transmission cycles involving wild felids to human populations via water run-off and can result in significant public health risk (Bowie et al., 1997). Moreover, melting snowpack is known to deliver organic contaminants to aquatic ecosystems in the form of short and concentrated pulses (Meyer and Wania, 2008). If oocysts do behave like organic contaminants, the highest loadings of oocysts in overland runoff would be expected to occur during this period of strong hydrological connectivity across the geographic range covered by the arctic watersheds. The release of microorganisms into river systems via snowmelt has received very little attention and the transport process of *T. gondii* by rivers has never been studied, being hampered by the lack of available, accurate assays to detect oocysts in water (Jones and Dubey, 2010).

In this paper, we present a risk assessment study to determine whether or not transport of *T. gondii* oocysts in spring snowmelt could be a realistic source of contamination of the arctic marine ecosystem, significant enough to cause infection in seals living in the Canadian Arctic. For this investigation, we used a deterministic hydrological modelling framework to study the processes that might be involved in the river routing of *T. gondii* oocysts with the ultimate aim of extrapolating the results across the Canadian Arctic watersheds.

Materials and Methods

To model the transport of *T. gondii* oocysts via snowmelt loading and ensuing river routing, we used the integrated modelling system GIBSI (Gestion Intégrée des Bassins versants à l'aide d'un Système Informatisé) which was designed to assist stakeholders in the decision making process of integrated watershed management, particularly in terms of water quality (Quilbe and Rousseau, 2007; Rousseau et al., 2005). The GIBSI system has been previously used to simulate the transport and fate of coliforms following manure application on agricultural land (Rogel, 2007).

The GIBSI system

Structure of system

This user-friendly watershed-based system comprises MySQL®, a database management server (DuBois et al., 2005); GIS tools imported from the open GIS GRASS (2008); and simulation models (hydrology, soil erosion, agricultural-contaminant transport, and water quality) (Rousseau et al., 2000). The hydrological and water quality models are of particular interest to this study (Figure 12).

HYDROTEL, the distributed, physically-based model of GIBSI, was used to simulate the precipitation-snow accumulation and melt-runoff processes (Fortin et al., 2001; Turcotte et al., 2007; Turcotte et al., 2003). HYDROTEL comprises six computational modules that are run in a cascade: weather data interpolation, snow cover dynamics, potential evapotranspiration, soil moisture balance, surface runoff, and stream flow routing (Figure 12). Based on a mixed degree-day, energy-budget approach, the snow accumulation and melt submodel has five state variables: snowpack water equivalent, heat deficit, albedo, snow depth and liquid water retained by snow cover (for further details see

Turcotte et al., 2007). This submodel assumes a single, homogeneous layer on the vertical and does not take into account the interception of snow by vegetation cover (Turcotte et al., 2007). The in-stream water quality component of GIBSI, QUAL2E-GIBSI, based on the model QUAL2E (Brown and Barnwell, 1987), was used to simulate dispersion and advection of contaminants, chemical and biological processes, water temperature and sediment routing in the hydrographic network (Rousseau et al., 2000).

Spatial simulation units and computational time step

Within the modelling framework of GIBSI, the watershed is discretized into two types of computational elements: (i) Relatively Homogeneous Hydrological Units (RHHUs), entities that correspond to elementary watersheds characterized by three soil layers that support land-based simulation processes (i.e., runoff generation, soil erosion and sediment transport; agricultural chemicals cycling and transport); and (ii) river segments, which are one dimensional entities that support watercourse simulation processes (i.e. stream flow and in-stream pollutant transport and fate). From a numerical point of view, each river segment, which is assumed to have homogeneous hydrogeometric properties, can be divided into computational elements for which a mass balance of oocysts may be written as follows (Chapra, 1997):

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} - \frac{1}{V_i} \left(\frac{\partial}{\partial x} \left(E A_c \frac{\partial c_i}{\partial x} \right) \right) + \frac{1}{V_i} \left(\frac{\partial}{\partial x} \left(U A_c c_i \right) \right) + \frac{p}{V_i} + \frac{s}{V_i} \quad (1)$$

where c_i is the oocysts concentration in element i ; V_i , element volume; A_c , element cross-sectional area; E , longitudinal dispersion coefficient; x , distance; t , time; U , average velocity; p , the internal sources/sinks of oocysts; and s , external sources (positive) or sinks (negative) of oocysts.

The left hand side term represents the rate of change of oocyst numbers. The first and second terms of the right hand side represent the transport across the upstream and downstream boundaries of the element i . The first term is the dispersion term, which relates to the spreading of oocysts due to differential movement of the water. The second term is the advection term which represents the movement of oocysts with water as it flows through the element boundaries. The third term represents the gain or loss of the oocysts due to resuspension and mortality or settling within the element. This last term has been dropped, as we considered oocysts as conservative compounds. This assumption may be appropriate because settling would be expected to be minimal during the high stream flow conditions of the snowmelt period and because oocysts are easily carried in waterways (Shapiro et al. 2009). Furthermore, mortality of oocysts would be expected to be negligible during the timescale of the simulation of the spring snowmelt process relative to the high survivability of *T. gondii* oocysts in the environment. Finally, the fourth term represents the oocysts loading discharged into the element. The output variable was the daily simulated concentrations of oocysts (C_o) in spring runoff at the watershed outlet, which was linked to the probability of seal exposure to oocysts. The GIBSI system operated on a daily time step.

Oocysts released

The terrestrial amount of oocysts potentially shed in a watershed over the winter, and accumulated within snowpack (O_s) was estimated as follows:

$$O_s = D \cdot A \cdot P \cdot O \quad (2)$$

where D is the density of felids in watershed; A , the area of felids habitat; P , the prevalence of shedding oocysts in felids population during the snow period (proportion of felids shedding oocysts) and O , the number of *T. gondii* oocysts shed by an infected felid.

The calculated terrestrial amounts of *T. gondii* oocysts were routed through the river network to the watershed outlet by QUAL2E-GIBSI, which uses daily runoff and stream flows simulated by HYDROTEL (Figure 12). As felids faeces contaminated by *T. gondii* oocysts are potentially deposited in numerous areas across a watershed, it may be considered as non point sources of contamination depending on the defecation behaviour. However, since a specific overland transport and fate model for *T. gondii* oocysts within the snowpack and in the soil was not available, the oocysts were considered as point sources of contamination and were directly released in the river network to be transported by QUAL2E-GIBSI.

Model application

Study watersheds

The Montmorency and Necopastic pilot watersheds, located in the province of Quebec, Canada, were used to investigate the possible hydrological transport of *T. gondii* oocysts (Figure 13). These watersheds are representative of boreal subwatersheds within the Canadian Arctic watershed. Calibration and validation of the hydrological model HYDROTEL have been previously performed on these watersheds (Jutras et al., 2009; Rousseau et al., 2008). Calibration and validation of the water quality model QUAL2E-GIBSI were currently not possible because of lack of tools to identify *T. gondii* oocysts in environmental samples. However, this model had been previously showed to be valid for the fate and transport of coliforms in stream flow at the watershed scale (Rogel, 2007).

Physical features and timeframe

The Montmorency watershed (north east of Quebec City, Quebec, Canada) covers 1150 km² and discharges directly into the St Lawrence River (Figure 13). The boreal forest represents the major land cover (92%), with urban areas, wetlands and open water comprising the remaining 8%. Elevation varies from 0 to 1150 m at the head of the watershed (Rousseau et al., 2008). The Necopastic watershed (James Bay, Quebec, Canada) covers 242 km² and discharges directly into the La Grande River (Jutras et al., 2009) (Figure 13). Virtually unaffected by human activities, this watershed is covered by coniferous forest and peatlands, typical landscape of a subarctic watershed; the elevation varies from 100 to 150 m (Jutras et al., 2009).

The daily meteorological input data were precipitation, and minimum and maximum temperatures, and it came from a total of nine relatively well distributed meteorological stations in the vicinity of the Montmorency watershed and from three meteorological stations covering the Necopastic watershed. *T. gondii* routing was simulated during the snowmelt period of each simulated year, that is, between 1999 and 2008 for the Montmorency watershed and between 2005 and 2007 for the Necopastic watershed. The snowmelt period was defined as the time between the maximum and minimum snowpack water equivalent. Over years for which simulations were run, mean annual precipitation was approximately 1200 mm and 800 mm for the Montmorency and Necopastic watersheds respectively, of which around one third fell as snow. The snow season usually started around November and ended in May for both watersheds, and melting occurred over the course of two months in Montmorency watershed whereas it occurred over one month in Necopastic watershed. Mean annual temperatures were 2°C and -1°C in the Montmorency and Necopastic watersheds, respectively.

Source of T. gondii oocysts

In the Necopastic watershed, domestic cats are absent, and may represent a negligible source of contamination over the winter in the sparsely populated Montmorency watershed. Thus, wild felids may be the only significant source of oocysts, and they could be important land-based sources of *T. gondii* for aquatic organisms as suggested by Miller et al. (2008). The only wild felid living in both studied watersheds is the Canadian lynx (*Lynx canadensis*), which occupies the boreal, subboreal and western mountain forests of North America (Banfield, 1974; Mowat et al., 2000). There is evidence for *T. gondii* infection of lynx in Canada (Labelle et al., 2001; Simon et al., In press). Consequently, following infection by *T. gondii*, lynx may be able to shed millions of oocysts into the terrestrial environment, as is the case for several wild felids (Jones and Dubey, 2010).

Watershed scenarios and model calibration

The *T. gondii* oocysts were discharged downstream, at the point draining the whole area of lynx habitat within both watersheds (Figure 13), and the oocysts concentrations were simulated according to different combinations of scenarios (i.e., the experimental design) to estimate the range of magnitudes of oocysts concentrations. The scenarios were designed to determine the impacts of the following variation factors on the concentrations of oocysts: (i) the amounts of oocysts released into stream flow via snowmelt runoff, (ii) the type of point release of oocysts, and (iii) the location of point release of oocysts. Parameter values for both watersheds and the experimental design, described below, are given in the Table VIII and the Table IX, respectively. Outputs from the QUAL2E-GIBSI model were daily simulated concentrations of oocysts C_o . We verified for each simulation that the overall amount of oocysts discharged in the river network was completely recovered at the watershed outlet.

Amounts of oocysts released

The density of lynx is estimated to be around 1 to 50 lynx/100 km² depending on the quality of habitat and the trapping intensity (Mowat et al., 2000). The area of the coniferous and broad leaf forest, corresponding to the lynx habitat (Mowat et al., 2000), was assessed by PHYSITEL, a specialized GIS for distributed hydrological models (Rousseau et al., 2011; Turcotte et al., 2001). To date, there are no data on the numbers of oocysts excreted by lynx, so in this study we considered two extreme values for the prevalence of shedding: 1% and 100% of the lynx population in a watershed shedding oocysts once during the winter season. Data on the excretion of oocysts have been particularly collected for domestic cats (Dubey, 2010). The median number of *T. gondii* oocysts shed after initial experimental infection of a single cat was 50 million (Dabritz et al., 2007). A value of 1 million oocysts shed during a single infection could be more appropriate for naturally acquired *T. gondii* infection (Dabritz et al., 2007). As suggested by the value of 12.5 million *T. gondii* oocysts detected in the rectal content of a trapped wild felid (Aramini et al., 1998), the quantity of oocysts shed may be within the range of values found in domestic cats (1-50 million). In this study, we used this range of values. Based on minimum and maximum parameter values, we calculated minimum and maximum terrestrial amounts of oocysts in snowpack (O_s) according to equation (2) (Table VIII). Thus, theoretical densities of oocysts in the snowpack of both watersheds ranged from one oocyst to 25×10^4 oocysts ha⁻¹. These estimates are lower than the annual loads of 31×10^4 to 4671×10^4 oocysts ha⁻¹ shed by domestic cats estimated by Dabritz et al. (2007) and Afonso et al. (2009).

We defined C_{min} and C_{max} (oocysts L⁻¹) as daily simulated concentrations of oocysts when the amounts of oocysts contaminating the snowpack were the minimum and the maximum numbers introduced in Table VIII, respectively. To assess the impact of variation in prevalence of shedding oocysts among lynx during the winter, we defined C_{maxinc} as the daily simulated concentrations of oocysts at the outlet of Montmorency watershed following the discharge of the maximum terrestrial amounts of oocysts, adjusted

for different values of prevalence of shedding: 1%, 5%, 10%, 50% and 75%. We expected that the simulated concentrations of oocysts would vary proportionally with the prevalence.

Type of point release of oocysts

To define the range of possible concentrations of oocysts reaching the watershed outlet, two extreme types of release in the stream can be simulated within the GIBSI system.

First, based on a homogenous distribution of *T. gondii* oocysts within the snowpack, oocysts were released in a continuous way, proportionally to runoff (based on meltwater). In this case, minimum concentrations of oocysts were expected at the watershed outlet; ignoring the concentration processes of oocysts in the snow. The daily parasitic fraction PF_d (oocysts d^{-1}) released into stream flow via snowmelt runoff was defined as:

$$PF_d = (Q_{lateral_d} / Q_{lateral_T}) \cdot O_s \quad (3)$$

where: $Q_{lateral_d}$ is the runoff volume during day d (m^3), $Q_{lateral_T}$ is the total runoff volume throughout the snowmelt period (m^3) and O_s is the terrestrial amount of oocysts within the snowpack as previously defined.

Second, the overall amount of available overland oocysts discharged at the point source over a particular snowmelt day was assumed to represent the aggregate quantity of *T. gondii* oocysts accumulated in the snowpack. Indeed, Meyer and Wania (2008) showed that during snowmelt, organic contaminants may be released in peak loads into the river resulting in the highest concentrations at the outlet. In the discrete (point-in-time) release simulations, we chose two specific times for oocysts discharges determined by the spring runoff hydrograph: at the onset of the snowmelt, and at the peak of the snowmelt.

Location of point release of oocysts

To assess the impact of the point of release (i.e., distance from the outlet) on the concentrations of oocysts at the outlet, identical amounts of oocysts were discharged at two points more distant from the outlet than the initial point of discharge and draining the middle and upstream portions of the Montmorency watershed (Figure 13). The downstream, middle stream and upstream points of discharge were located at 23 km, 54 km and 102 km from the outlet, respectively. We compared the concentration patterns of oocysts flowing at the outlet following the continuous release of oocysts at the different points of release.

To summarize, the experimental design was defined by the following scenarios (see Table IX): continuous releases of minimum and maximum amounts of oocysts (scenarios 1 and 2), discrete releases of minimum and maximum amounts of oocysts at the onset of the snowmelt (scenarios 3 and 4), and at the peak of the snowmelt (scenarios 5 and 6), continuous release of maximum amounts of oocysts adjusted for different values of prevalence of shedding (scenario 7), and at the downstream, middle stream and upstream points of discharge (scenario 8). Those different scenarios may estimate the range of magnitudes of concentrations of contaminating oocysts at the outlet of both watersheds, taking into account the uncertainties concerning the amounts of oocysts and the spatio-temporal dynamic of oocysts released from snowmelt into the stream.

Atmospheric forcing (Montmorency watershed)

Additionally, we aimed to study the impact of different meteorological conditions on the concentrations of oocysts at the watershed outlet. To do that, we used ten years of precipitation and temperature data to model the hydrological transport of a maximum

terrestrial amount of oocysts following their continuous release from the snowpack which corresponds to the scenario 2, defined previously.

Extrapolation to the Canadian Arctic watershed

With the goal of assessing the extent to which the results found in this study could be extrapolated to the Canadian Arctic watersheds, we compared the Montmorency and Necopastic watersheds with respect to the concentrations of oocysts at the outlet.

Results

The range of magnitudes of oocysts concentrations and variation factors

Results for the different scenarios are presented as probabilities of exceeding a certain concentration of oocysts (P_e). Those probabilities can be estimated as:

$$P_e = 1 - F_c \quad (4)$$

where F_c is the relative cumulative frequency, defined as the frequency with which the values of daily concentrations of oocysts is less than or equal to a certain concentration.

Amounts of oocysts released

For scenarios 1 (Sc1) and 2 (Sc2) (continuous release), the C_{omin} and C_{omax} were of the order of 10^{-7} and 10^{-2} oocyst L^{-1} at the Montmorency and the Necopastic outlets (Figure 14), respectively. For scenarios 3 (Sc3), 4 (Sc4), 5 (Sc5) and 6 (Sc6) (discrete release),

depending on the time of the oocysts discharge, they ranged between 10^{-8} to 10^{-4} oocyst L^{-1} (C_{omin}) and 10^{-6} to 10^{+1} oocysts L^{-1} (C_{omax}) at the Montmorency outlet (Figure 14) and between 10^{-7} and 10^{-4} oocyst L^{-1} (C_{omin}) and 10^{-2} and 10^{+1} oocysts L^{-1} (C_{omax}) at the Necopastic outlet (data not shown). When the prevalence of *T. gondii* infection in lynx population varied (scenario 7), the proportionality relationship between terrestrial amounts of oocysts accumulated in the snowpack and concentrations of oocysts at the Montmorency outlet was confirmed. Therefore, by taking the example of a prevalence of 5%, the $C_{omaxinc}$ were 10% smaller (median = 0.0014) than the $C_{omaxinc}$ calculated for a prevalence of 50% (median = 0.0143), when using the same lynx density and the same number of oocysts shed by each infected lynx in the watershed (Figure 15).

Type and location of oocysts point release

As expected, the daily concentrations at the outlet of both watersheds were relatively smaller for a continuous release (Sc1&2) than for a discrete release of oocysts (Sc3-6) (Figure 14). Figure 16 illustrates the temporal dynamic of the concentrations of oocysts flowing at the Montmorency outlet. The concentrations for Sc2 were quite constant throughout the snowmelt period, whereas those for Sc4 and Sc6 peaked the day after the release (onset vs peak) and decreased quickly on the following days (Figure 16). For Sc4 and Sc6, the flow of oocysts at the watershed outlet for several days probably reflected the dispersion process modeled by the QUAL2E-GIBSI model, which is related to the spreading of oocysts primarily due to non uniform flow velocity through the river network (Chapra, 1997). Moreover, the number of days for which oocysts flowed at the outlet was larger for Sc4 than for Sc6 (Figure 16). This suggested a larger dispersion process at the onset of the snowmelt period than at the peak of the snowmelt period, probably caused by high variability of flow velocity at this time of snowmelt. This last pattern did not occur for the Necopastic watershed, probably because of the short distance between the point of release of oocysts and watershed outlet, which did not illustrate the difference in the magnitude of dispersion effect according to the timing of release of oocysts in the stream

flow (data not shown). Finally, with similar terrestrial amounts of oocysts, the concentrations were larger for a discrete release at the onset of the snowmelt period (Sc3&4) than for a release at the peak of the snowmelt period (Sc5&6) (Figure 14), probably due to the low stream flow at the onset of the snowmelt period.

The further upstream the discharge point is from the outlet, the lower concentrations of oocysts at the outlet are (Figure 17). This behaviour in the concentrations with respect to the distance from the outlet reflected the dispersion process modeled by the QUAL2E-GIBSI model.

Atmospheric forcing (Montmorency watershed)

We classified the hydrological years into two patterns. For those years characterised by high precipitation (snow or rain) and/or a short snowmelt period due to a relatively high mean temperature (Table X) (years 1999, 2000, 2002, 2005, 2006, 2007 and 2008), the concentrations of oocysts are constant over the snowmelt period and relatively smaller than for those years characterised by low precipitation and/or a relatively slow melting period (low mean temperature) (Table X) (years 2001, 2003 and 2004) (Figure 18). In 2007, despite a fast snowmelt, the concentrations were high because of relatively low precipitation. For years 2001, 2003 and 2004, the concentrations of oocysts were more variable and were almost twice as large as those obtained with the first set of years (Figure 18).

Extrapolation to the Canadian Arctic watershed

The normalized (with respect to the watershed area; [mm.d⁻¹]) outlet hydrographs of the Montmorency and Necopastic watersheds were quite similar, despite wetter and warmer conditions in the Montmorency watershed (Figure 19). Therefore, the hydrological

behaviour, and thus the transport pattern of oocysts may be similar for those two watersheds, and surrogate subwatersheds of the Canadian Arctic. The lower-rate flows for Necopastic watershed (Figure 19) explained that, despite a lower proportion of lynx habitat in this watershed compared to Montmorency watershed, the concentrations of oocysts flowing to the outlet were globally higher in the former watershed (Figure 14). Also, the pollutographs showing the loads of oocysts (normalised with respect to the total quantity of oocysts flowing at the watershed outlet) under conditions of continuous release were quite comparable for the Montmorency and the Necopastic watersheds, except that transport time was longer for the former reflecting the longer snowmelt period (Figure 19). Our final aim was to extrapolate those hydrological simulations to Canadian Arctic watersheds since the data required to implement those watersheds in QUAL2E-GIBSI were not available. Some results of previous simulations could be used to estimate the range of concentrations of oocysts at the outlet of Arctic rivers which are probably linked to the risk of exposure of marine organisms. In the case of the continuous release of oocysts, the relatively constant concentrations over the spring runoff (Figure 16) meant that there was a proportional relationship between the quantity of oocysts and the simulated runoff rate at the watershed outlet. This is tightly coupled to the initial hypothesis of the proportional release of oocysts from the snowpack with respect to runoff. Thus, the runoff at the watershed outlet, data for which is available for rivers discharging in the Canadian Arctic watershed, may provide a means to estimate the potential minimum concentration of oocysts at the outlet.

Discussion

To our knowledge, this is the first attempt to model the hydrological transport of oocysts during the snowmelt period, which allows to obtain a first estimate of the range of magnitudes of concentrations of *T. gondii* oocysts at the watershed outlet. This provided a framework to determine a range of potential concentrations for rivers of the Canadian Arctic watershed. According to the simulations, the concentrations of oocysts ranged

between 10^{-8} to 10^{+1} oocysts L^{-1} at the outlets of the Montmorency and the Necopastic watersheds. However, the highest concentrations may be largely overestimated since the overall oocyst load was discharged over one day. In comparison, environmental concentrations in natural waters for both *Cryptosporidium* and *Giardia* are in the order of one cyst or oocyst L^{-1} , ranging from about 0.05 for pristine waters to 100 for polluted systems (Chapra, 1997). Is this sufficient to cause infection in any seals living in the vicinity of the contaminated outlets of arctic watersheds? While the infectious dose of *T. gondii* oocysts for marine mammals is unknown, it is possible that a single ingested oocyst can cause infection (Dubey, 2010). Seals probably ingest sufficient amount of water from their food to satisfy their water requirements (Riedman, 1990), so intermediate aquatic organisms are likely required to infect seals. Indeed bivalves such as oysters, mussels, and clams can harbour and concentrate environmentally derived pathogenic protozoa as a result of filtering large volumes of water (Conrad et al., 2005; Thorp et al., 2010). Mussels and oysters are able to remove and concentrate *T. gondii* oocysts from contaminated water, which remain viable and infective within their tissues (Arkush et al., 2003; Lindsay et al., 2004). Furthermore, a study in California showed that sea otters can probably be infected with *T. gondii* via ingestion of filter-feeding marine invertebrates (Miller et al., 2008). In general, a gram (ash-free dry mass) of native North American freshwater bivalve can clear 1–2 L of water per hour, and this value is larger for marine bivalves (Thorp et al., 2010). Considering a filtration rate of $50 L g^{-1}$ per day and based on a daily concentration of 10^{-7} oocyst L^{-1} at the watershed outlet, a population of 200 000 molluscs would be necessary to encounter one oocyst over one day via their filter-feeding activity. As molluscs can form large, dense congregations (Thorp et al., 2010), contamination of some molluscs during the days of releasing of *T. gondii* oocysts at the watershed outlet would be likely, even for a conservative scenario (non aggregated distribution within snowpack of a low amount of overland oocysts released in the stream flow - scenario 1). Furthermore, *T. gondii* oocysts may lose buoyancy once they encounter brackish water due to loss of their negative surface charge (Shapiro et al., 2009). Consequently the oocysts carried into the Arctic coastal marine environment likely accumulate at the seabed where molluscs thrive. Consequently

the estimate of one infected mollusc in 200,000 arising is likely a very low estimate of the prevalence of *T. gondii* infection. While studies that directly detect *T. gondii* oocysts in environmental samples would be the ‘gold standard’ method of calibrating and validating the water quality model, the tools to do so are currently lacking. Instead, the sentinel aquatic organisms may serve as indicators of contamination, and their study may be key to understanding and controlling protozoal contamination of coastal environments.

The present study identified factors that are likely key to determining peaks of contamination. The largest concentrations occurred when oocysts were discharged into the stream near the outlet and at the onset of the snowmelt period, when the stream flow is relatively low. As the spatial distribution of *T. gondii* in the environment is considered to be highly heterogeneous (Afonso et al., 2008), pulse loads of parasites over the snowmelt period are expected at the outlet. Furthermore, as *T. gondii* oocysts are negatively charged, thus readily detachable from faecal matter, and hydrophilic (Davies et al., 2004; Shapiro et al., 2009), it could be expected that they are flushed out in the first meltwater within snowpack at the onset of the snowmelt period during which concentrations in the river can reach a high level. However, as the contamination with oocysts is probably extremely heterogeneous, the release of oocysts into the river network may be less synchronous than for organic contaminants, leading to weaker flushes. Globally, the above results emphasized the dilution effect of the meteorological conditions, which would directly affect the concentrations of *T. gondii* oocysts through precipitation and/or indirectly through the rate of the snowmelt process. However, other mechanisms driven by meteorological conditions may influence the transport of oocysts and potentially counterbalance the concentrations simulated in the present study. For example, after heavy rainfall, oocysts could be rapidly transported through preferential flow paths within the snowpack and soil to stream flow, accounting for the maximum transport of oocysts under such circumstances (Ferguson et al., 2003; Simon et al. Submitted).

Timing and extent of exposure of aquatic organisms to snowmelt runoff contaminated by oocysts may also depend on processes not accounted for in the present

study. The behaviour of the protozoa is poorly understood, and how oocysts are released from the snowpack to the stream flow is completely unknown. The environmental partitioning properties of oocysts and the physical properties of the snowpack are expected to strongly influence the transport sequence of oocysts from snowpack (Meyer and Wania, 2008). Furthermore, oocysts could be inactivated in several ways before reaching the river network. First, despite that *T. gondii* oocysts are considered as extremely resistant to environmental stress (Dubey, 2010), the melt freeze cycles occurring within snowpack could affect their die-off. Second, some oocysts could be adsorbed and retained into the soil. Indeed, the soil layer being not frozen in the subarctic region, the contaminated meltwater flows laterally mainly as sub-surface flow, or percolates deeper into the soil depending on the slope and infiltration rate (Meyer and Wania, 2008). The capacity of oocysts to be inactivated by adsorption to soil sediments (filtration, predation) is still a topic of debate (Jamieson et al., 2004) but at least the soil leaching likely dilutes oocysts in snowmelt runoff, especially as the distance of oocysts to channel increases. Collins and Rutherford (2004) considered that only percolation generated within 50 m of a stream is capable of delivering *Escherichia coli* to a stream (Collins and Rutherford, 2004). After soil leaching and once discharged into the stream flow, oocysts may float in the water column as flocculation, adsorption, filtering out by vegetation and sedimentation of oocysts are probably negligible in the rapid spring water flow. In the estuarine areas where freshwater and salt waters mix, *T. gondii* oocysts sediment (Shapiro et al., 2009). The increasing of salinity and the turbulence of water may influence the distribution of oocysts within the water column in the coastal areas and so the availability of oocysts for contaminating the aquatic organisms.

Conclusion

This paper underlines the complexity of the hydrological transport of oocysts by snowmelt runoff and the multiplicity of mechanisms involved. A great challenge is

characterization of the non point source of *T. gondii* oocysts, and particularly to account for the heterogeneity of contamination, as well the heterogeneity associated at each step of the fate and transport of oocysts to the watershed outlet. The fate of *T. gondii* oocysts within a snowpack needs to be investigated through field work and controlled laboratory studies, in order to implement the knowledge gained on the processes in the GIBSI integrated modeling system and, finally, to improve the global picture of oocyst contamination at watershed outlets during the snowmelt period. The utilization of surrogate particles like carboxylated microspheres could prove essential tools to overcome the drawbacks linked to transport studies in the field (Shapiro et al., 2009).

This study shows that the land-to-river-to-sea transport process of *T. gondii* oocysts may be sufficient to expose marine organisms and subsequently arctic human populations that hunt and consume raw meat from marine mammals. Globally, this study provides insights into the modelling of microorganism transport during the snowmelt period and highlights the potential impact of wildlife living in Nordic watersheds on the contamination of marine coastline by varied microorganisms.

Acknowledgments

We are grateful for funding from the Public Health Agency of Canada, the Institut national de santé publique du Québec and ArcticNet Centre of Excellence which provided financial support to conduct this research. We thank Sebastien Tremblay for his helpful assistance in the development and the use of QUAL2E-GIBSI software.

References

Afonso, E., Lemoine, M., Poulle, M.L., Ravat, M.C., Romand, S., Thulliez, P., Villena, I., Aubert, D., Rabilloud, M., Riche, B., Gilot-Fromont, E., 2008. Spatial distribution

- of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *Int. J. Parasitol.* 38, 1017-1023.
- Afonso, E., Thulliez, P., Gilot-Fromont, E., 2009. Local meteorological conditions, dynamics of seroconversion to *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*) and oocyst burden in a rural environment. *Epidemiol. Infect.*, 1-9.
- Appelbee, A.J., Thompson, R.C., Olson, M.E., 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. *Trends Parasitol.* 21, 370-376.
- Aramini, J.J., Stephen, C., Dubey, J.P., 1998. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *J. Parasitol.* 84, 438-440.
- Arkush, K.D., Miller, M.A., Leutenegger, C.M., Gardner, I.A., Packham, A.E., Heckerroth, A.R., Tenter, A.M., Barr, B.C., Conrad, P.A., 2003. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 33, 1087-1097.
- Banfield, A.W.F., 1974. *The mammals of Canada*. University of Toronto Press Toronto.
- Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B., Marion, S.A., 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet* 350, 173-177.
- Brown, L.C., Barnwell, T.O., 1987. *The enhanced stream water quality models QUAL2E and QUAL2E-UNCAS : documentation and user model*. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Athens, Ga.
- Chapra, S.C., 1997. *Surface water-quality modeling*. McGraw-Hill, New York.
- Collins, R., Rutherford, K., 2004. Modelling bacterial water quality in streams draining pastoral land. *Water Res.* 38, 700-712.
- Conrad, P.A., Miller, M.A., Kreuder, C., James, E.R., Mazet, J., Dabritz, H., Jessup, D.A., Gulland, F., Grigg, M.E., 2005. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int. J. Parasitol.* 35, 1155-1168.
- Dabritz, H.A., Miller, M.A., Atwill, E.R., Gardner, I.A., Leutenegger, C.M., Melli, A.C., Conrad, P.A., 2007. Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231, 1676-1684.

- Davies, C.M., Ferguson, C.M., Kaucner, C., Krogh, M., Altavilla, N., Deere, D.A., Ashbolt, N.J., 2004. Dispersion and transport of *Cryptosporidium* oocysts from fecal pats under simulated rainfall events. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1151-1159.
- Dubey, J.P., 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J. Parasitol.* 84, 862-865.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- DuBois, P., Hinz, S., Pedersen, C., 2005. *MySQL 5 certification study guide*, 2nd ed. MySQL Press, Indianapolis, Ind.
- Fayer, R., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2004. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol.* 20, 531-536.
- Ferguson, C., Husman, A.M.D., Altavilla, N., Deere, D., Ashbolt, N., 2003. Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 33, 299-361.
- Fortin, J.P., Turcotte, R., Massicotte, S., Moussa, R., Fitzback, J., 2001. A distributed watershed model compatible with remote sensing and GIS data. Part 1: Description of the model. *Journal of Hydrologic Engineering - ASCE* 6, 91-99.
- GRASS, 2008. *Geographic Resources Analysis Support System Software*. Open Source Geospatial Foundation Project.
- Jamieson, R., Gordon, R., Joy, D., Lee, H., 2004. Assessing microbial pollution of rural surface waters - A review of current watershed scale modeling approaches. *Agric. Water Manage.* 70, 1-17.
- Jones, J.L., Dubey, J.P., 2010. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Exp. Parasitol.* 124, 10-25.
- Jutras, S., Rousseau, A.N., Clerc, C., 2009. Implementation of a Peatland-Specific Water Budget Algorithm in HYDROTEL. *Canadian Water Resources Journal* 34, 349-363.
- Labelle, P., Dubey, J.P., Mikaelian, I., Blanchette, N., Lafond, R., St-Onge, S., Martineau, D., 2001. Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) from Quebec, Canada. *J. Parasitol.* 87, 1194-1196.
- Lindsay, D.S., Collins, M.V., Mitchell, S.M., Wetch, C.N., Rosypal, A.C., Flick, G.J., Zajac, A.M., Lindquist, A., Dubey, J.P., 2004. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Parasitol.* 90, 1054-1057.

- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2009. Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J. Parasitol.* 95, 1019-1020.
- Meyer, T., Wania, F., 2008. Organic contaminant amplification during snowmelt. *Water Res.* 42, 1847-1865.
- Miller, M.A., Byrne, B.A., Jang, S.S., Dodd, E.M., Dorfmeier, E., Harris, M.D., Ames, J., Paradies, D., Worcester, K., Jessup, D.A., Miller, W.A., 2010. Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Vet. Res.* 41, 13.
- Miller, M.A., Miller, W.A., Conrad, P.A., James, E.R., Melli, A.C., Leutenegger, C.M., Dabritz, H.A., Packham, A.E., Paradies, D., Harris, M., Ames, J., Jessup, D.A., Worcester, K., Grigg, M.E., 2008. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int. J. Parasitol.* 38, 1319-1328.
- Mowat, G., Poole, K.G., O'Donoghue, M., 2000. Ecology of lynx in northern Canada and Alaska, in: Ruggerio, L.F., Aubry, K.B., Buskirk, S.W., Koehler, G.M., Krebs, C.J., McKelvey, K.S., Squires, J.R. (Eds.), *Ecology and Conservation of Lynx in the United States*. University of Colorado Press, Boulder, Colorado, pp. 265-306.
- Quilbe, R., Rousseau, A.N., 2007. GIBSI : An Integrated Modelling System for Watershed Management--Sample Applications and Current Developments. *Hydrology and Earth System Sciences* 11, 1785-1795.
- Riedman, M., 1990. *The pinnipeds : seals, sea lions, and walruses*. University of California Press, Berkeley.
- Rogel, G., 2007. Développement et intégration au système de modélisation intégré GIBSI d'un modèle de transport et du devenir des coliformes fécaux d'origine agricole à l'échelle du bassin versant. Université du Québec, Québec, p. 164.
- Rousseau, A.N., Fortin, J.-P., Turcotte, R., Royer, A., Savary, S., Quévy, F., Noël, P., Paniconi, C., 2011. PHYSITEL, a specialized GIS for supporting the implementation of distributed hydrological models. *Water News* 31, 18-20.
- Rousseau, A.N., Mailhot, A., Quilbe, R., Villeneuve, J.P., 2005. Information technologies in a wider perspective : intergrating management functions across the urban-rural interface. *Environ. Model. Software* 20, 443-455.
- Rousseau, A.N., Mailhot, A., Turcotte, R., Duchemin, M., Blanchette, C., Roux, M., Etong, N., Dupont, J., Villeneuve, J.P., 2000. GIBSI – An integrated modelling system prototype for river basin management. *Hydrobiologia* 422/423, 465-475.

- Rousseau, A.N., Savary, S., Konan, B., 2008. Implantation du modèle HYDROTEL sur le bassin de la rivière Montmorency afin de simuler les débits observés et de produire des scénarios de crues du printemps pour l'année 2008. Centre Eau Terre et Environnement, Institut national de la recherche scientifique, Québec, p. 62.
- Shapiro, K., Largier, J., Mazet, J.A., Bernt, W., Ell, J.R., Melli, A.C., Conrad, P.A., 2009. Surface properties of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1185-1191.
- Simon, A., Chambellant, M., Ward, B.J., Simard, M., Proulx, J.F., Levesque, B., Bigras-Poulin, M., Rousseau, A.N., Ogden, N.H., 2011. Spatio-temporal variations and age effect on *Toxoplasma gondii* seroprevalence in seals from the Canadian Arctic. *Parasitology*, 1-7.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217-1258.
- Thorp, J.H., Covich, A.P., ScienceDirect (Online service), 2010. Ecology and classification of North American freshwater invertebrates, Aquatic ecology series, 3rd ed. Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Turcotte, R., Fortin, J.P., Rousseau, A.N., Massicotte, S., Villeneuve, J.P., 2001. Determination of the drainage structure of a watershed using a digital elevation model and a digital river and lake network. *Journal of Hydrology* 240, 225-242.
- Turcotte, R., Fortin, L.G., Fortin, V., Fortin, J.P., Villeneuve, J.P., 2007. Operational analysis of the spatial distribution and the temporal evolution of the snowpack water equivalent in southern Québec, Canada. *Nordic Hydrology* 38, 211-234.
- Turcotte, R., Rousseau, A.N., Fortin, J.P., Villeneuve, J.P., 2003. Development of a process-oriented, multiple-objective, hydrological calibration strategy accounting for model structure, in: Duan, Q., Sorooshian, S., Gupta, H., Rousseau, A.N., Turcotte, R. (Eds.), *Advances in Calibration of Watershed Models*, Water Science & Application, pp. 153-163.

Figures

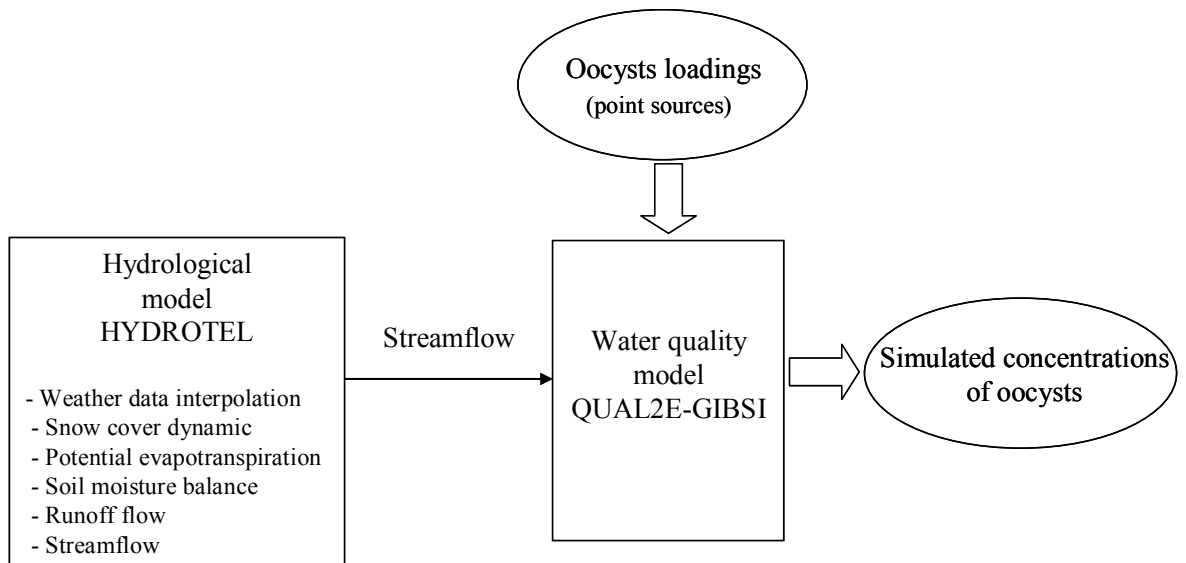


Figure 12: The structure and the input variables of models used in the GIBSI system.

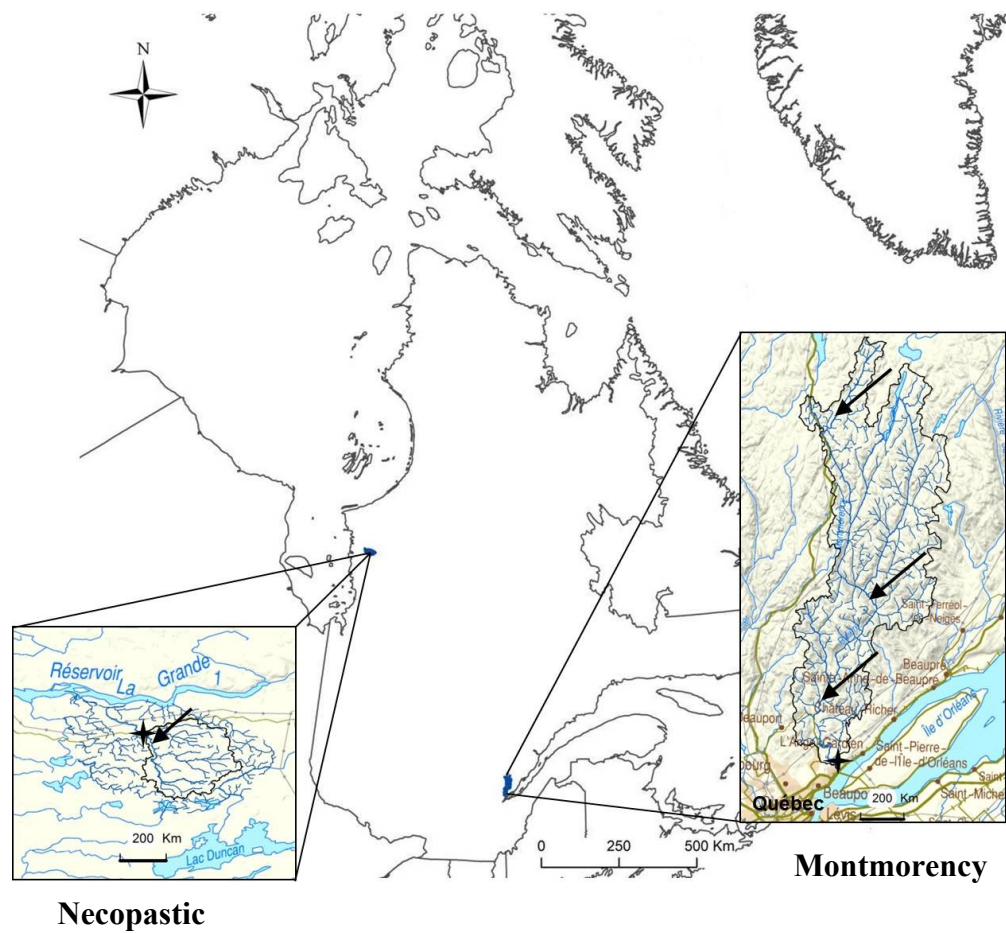


Figure 13: Map of Quebec, Canada, showing the Necopastic and Montmorency pilot watersheds. The arrows indicate the location of oocysts release in the upstream, middle stream and downstream portions draining the lynx habitats; the stars show the watershed outlets.

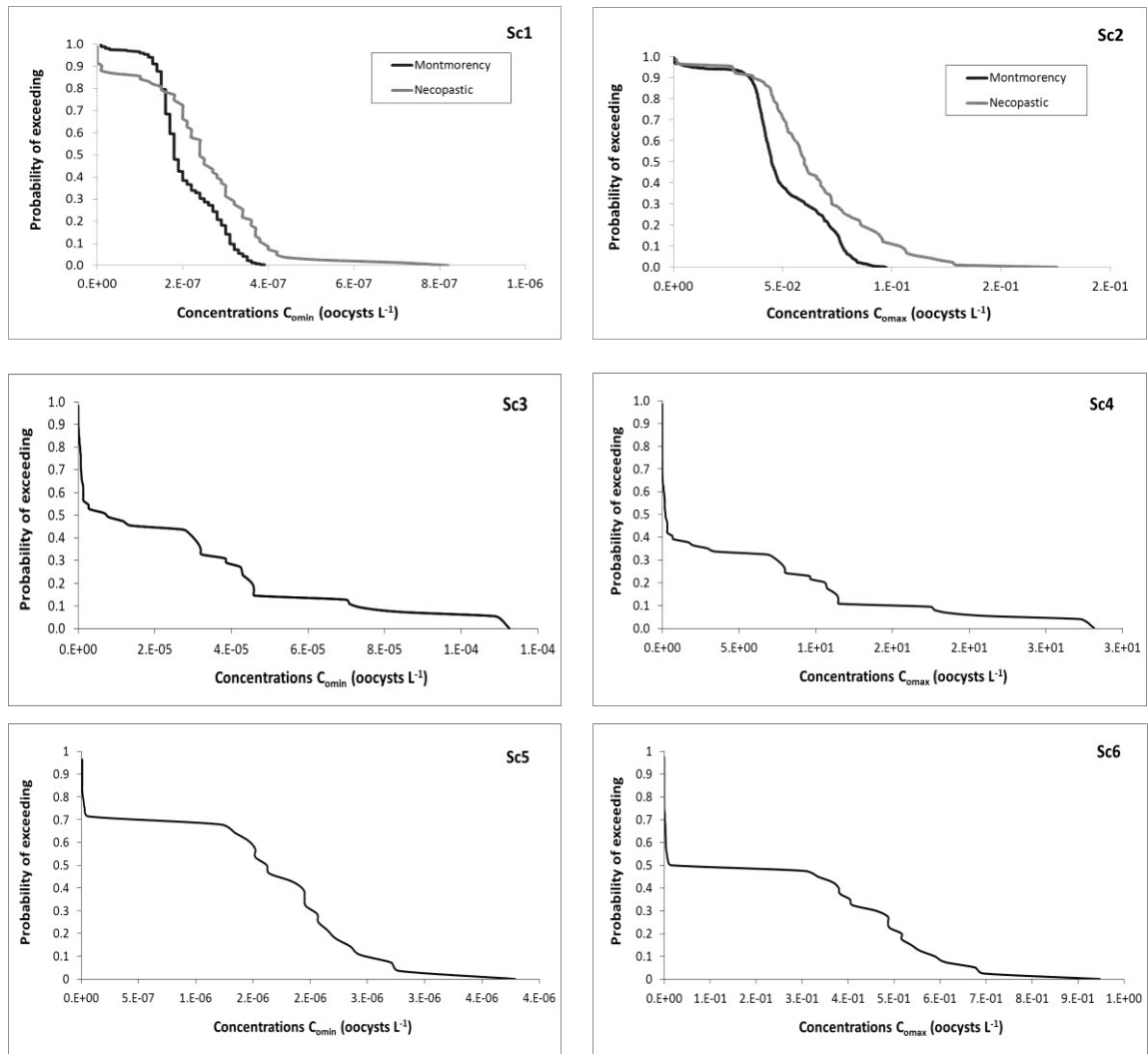


Figure 14: Probabilities (y axis) of exceeding the concentrations of oocysts (x-axis) at the watershed outlet during the snowmelt period under different scenarios (Sc) for timing and type (continuous or discrete) of oocyst release. C_{\min} and C_{\max} are the concentrations at the watershed outlet following the release of minimum and maximum amounts of overland oocysts in the stream flow, respectively. Sc1 and Sc2: continuous release of oocysts in the stream flow of the Montmorency and Necopastic watersheds over ten- and three- year periods, respectively. Sc3 to Sc6: discrete (one point-in-time) release of oocysts in the early (Sc3&4) and in the peak (Sc5&6) portions of the meltwater season into the stream flow of the Montmorency watershed over a ten- year period.

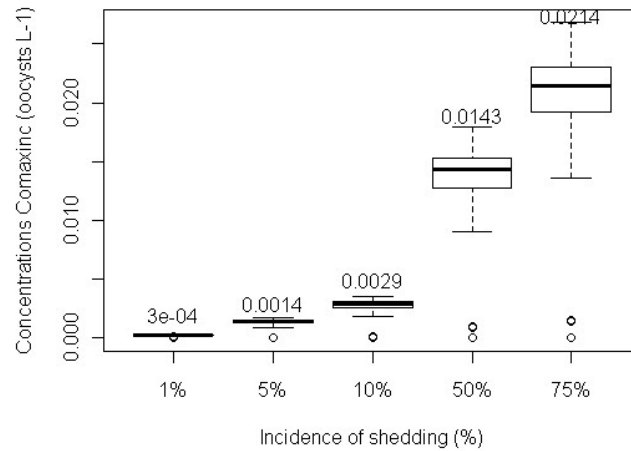


Figure 15: Box plots showing the proportionality relationship between the maximum terrestrial amounts of oocysts (varied according to different values for the prevalence of infection: 1%, 5%, 10%, 50% and 75%) and the concentrations Comaxinc of oocysts at the Montmorency outlet simulated using continuous release and 1998-1999 meteorological data (Sc7).

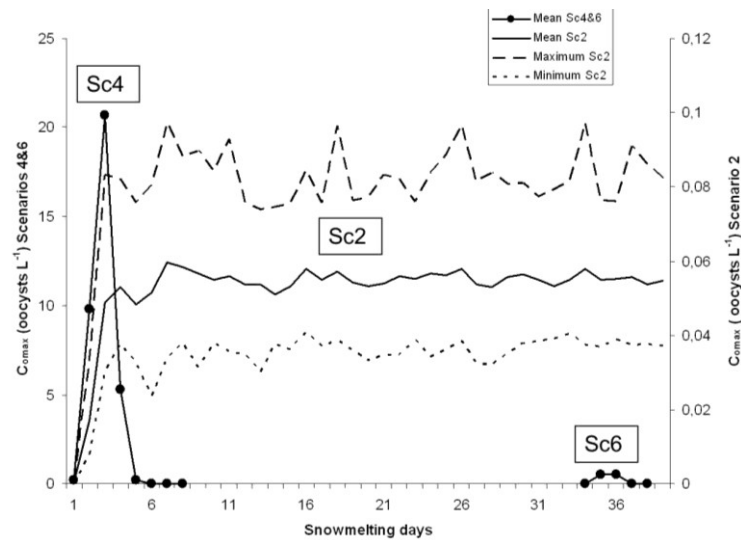


Figure 16: Concentrations Comax of *T. gondii* oocysts at the Montmorency outlet following continuous (Sc2) and discrete release (Sc4&6) of a maximum amount of overland oocysts. The mean, maximum and minimum Comax for Sc2 and the mean Comax for Sc4 and Sc6 (release at the onset and the peak of snowmelt period, respectively) are shown.

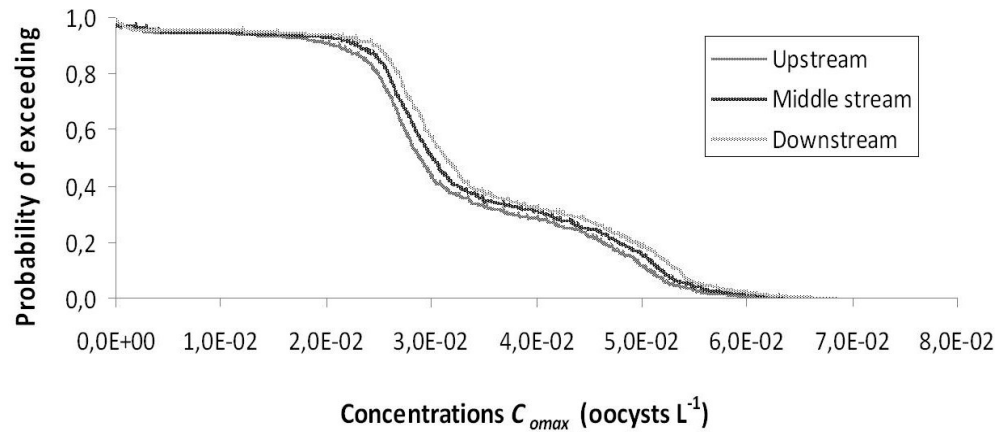


Figure 17: Probabilities (y-axis) of exceeding the concentrations of oocysts (x-axis) at the Montmorency outlet during the snowmelt period following the continuous release of identical amounts of overland oocysts at the downstream, middle stream and upstream points (Sc8). The amount of overland oocysts discharged in the stream flow was based on the maximum amount of oocysts in the portion of watershed drained by the middle stream point.

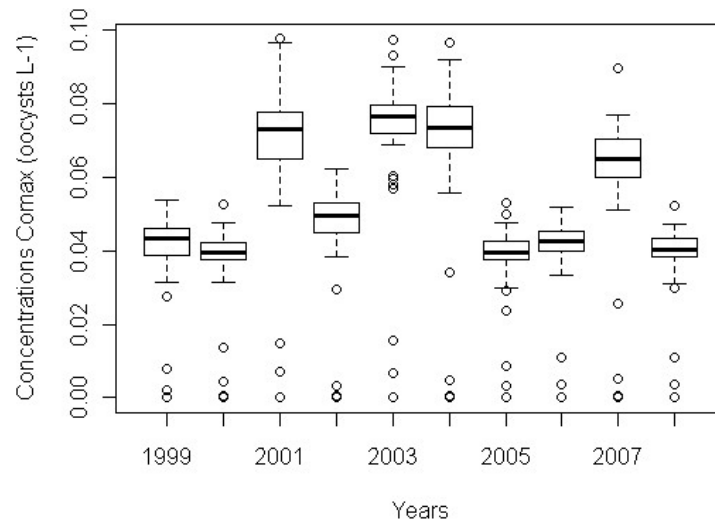


Figure 18: Box plots showing the annual variability of oocyst concentrations (C_{omax}) at the watershed outlet following the continuous release of maximum amounts of overland oocysts in the stream flow (Sc2). The whiskers extend to the most extreme data point which is no more than 1.5 times the interquartile range from the box.

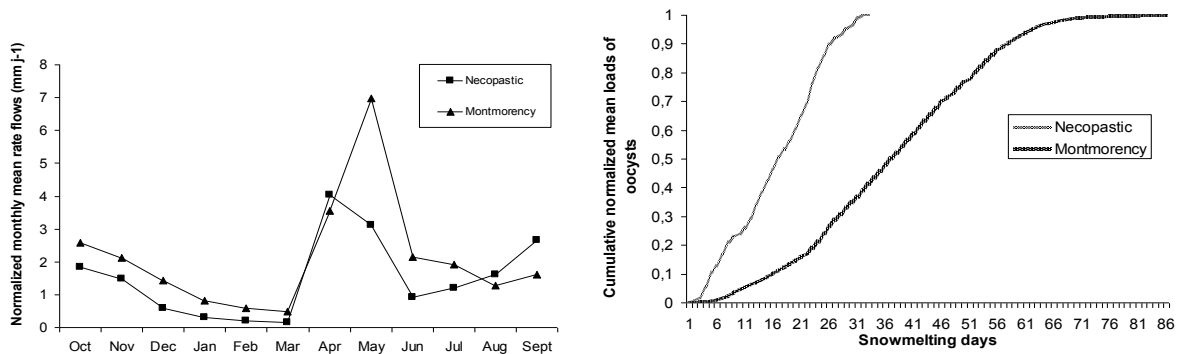


Figure 19: Normalized annual hydrographs (on the left) and cumulative pollutographs (on the right) calculated for a continuous release of a maximum amount of overland oocysts for the Montmorency and the Necopastic watersheds. On the hydrographs, the normalized monthly mean rate flows were defined as the ratio between the monthly mean rate flows and the watershed area; on the pollutographs, the normalized mean loads of oocysts were defined as the ratio between the daily quantity of oocysts and the total quantity of oocysts flowing at the watershed outlet.

Tables

Table VIII: Parameters and values used to calibrate the GIBSI model.

Parameter	Brief description		Values	Units	Reference	
D	Density of lynx in watershed		1	lynx/100km ²	Mowat et al. (2000)	
A	Total area of lynx habitat	Montmorency	50	km ²	Forest areas (HYDROTEL)	
		Necopastic	784			
P	Prevalence of shedding (infection)		84	%		
			1			
			5			
			10			
			50			
			75			
O	Number of oocysts shed by lynx		100	oocysts	Dabritz et al. (2007)	
			1.10 ⁶			
O_s	Terrestrial amount of oocysts	$O_s Min^*$	Montmorency	50.10 ⁶	oocysts	Calculated as: $D \cdot A \cdot P \cdot O$
			Necopastic	784.10 ²		
		$O_s Max^\dagger$	Montmorency	840.10 ¹		
			Necopastic	196.10 ⁸		
		$O_s Maxinc^\pm$	Montmorency	210.10 ⁷		
				196.10 ⁶		
		980.10 ⁶				
		196.10 ⁷				
		980.10 ⁷				
		147.10 ⁸				
$QLateral_d$	Runoff volume during day d		--	m ³	HYDROTEL outputs	
$QLateral_T$	Total runoff volume in the snowmelt period		--	m ³	Calculated as : $\sum (QLateral_d)$	
PF_d	Parasitic fraction released into streamflow during day d		--	oocysts d ⁻¹	Calculated as: $(QLateral_d / QLateral_T) \cdot O_s$	

* Based on a minimum density of lynx (1/100 km²), a minimum prevalence of shedding (1%) and a minimum number of oocysts shed (1.10⁶).

† Based on a maximum density of lynx (50/100 km²), a maximum prevalence of shedding (100%) and a maximum number of oocysts shed (50.10⁶).

± Based on a maximum density of lynx (50/100 km²), varied values of prevalence of shedding (1%, 5%, 10%, 50% and 75%) and a maximum number of oocysts shed (50.10⁶).

Table IX: Summary of the experimental design (i.e., simulated scenarios).

Scenarios (Sc)	Characteristics of scenarios								
	Amount of oocysts released			Type of release			Location of release		
	Maximum ($O_s Max$)	Minimum ($O_s Min$)	Maximum x Prevalence ($O_s Maxinc$)	Continuous	Discrete		Upstream	Middle stream	Downstream
					Onset	Peak			
Sc1									
Sc2									
Sc3									
Sc4									
Sc5									
Sc6									
Sc7*									
Sc8†									

* Scenario simulated only for the 1999 snowmelt period

† Scenario simulated only for the Montmorency watershed

Table X: Parameters of snowmelt period over ten years in the Montmorency watershed. The maximum and minimum values of each parameter are in dark and light grey, respectively. Years with asterisks are those for which the simulated concentrations of oocysts at the watershed outlet were the largest. Those years are characterised by low precipitations and short snowmelt periods (2001), or by low mean temperatures and low runoff rates (2003 and 2004).

Hydrologic year	1998-1999	1999-2000	2000-2001 [†]	2001-2002	2002-2003 [†]	2003-2004 [†]	2004-2005	2005-2006	2006-2007	2007-2008
Annual snowfall (cm)	567	443	466	367	383	310	445	488	493	575
Snowmelt parameters										
Rainfall (mm)	96	259	56	226	123	149	239	124	75	131
Snowfall (cm)	13	37	11	13	37	20	19	11	16	13
Mean temperature	5.3	4.2	5.8	5.1	2.2	3.7	4.6	4.9	6.8	5.7
Runoff (mm)	391	418	227	336	220	226	420	391	254	412
Maximal SWE* (mm)	497	284	347	278	245	240	332	422	341	458
Maximal runoff rate (m ³ s ⁻¹)	327	239	272	250	142	184	348	230	214	350
Snowmelting days	64	82	42	57	68	62	65	68	43	60

* Snowpack Water Equivalent

Discussion générale

Pour expliquer la présence de *T. gondii* chez de nombreuses espèces de mammifères marins à travers le monde, plusieurs études ont fait l'hypothèse d'une contamination marine via les écoulements d'eau douce contaminés par des oocystes (Dubey 2010). D'après le cadre conceptuel présenté dans l'article 2, l'apport hydrique d'oocystes dans les eaux de fonte est une voie vraisemblable de contamination des côtes de l'Arctique Canadien. Seulement quelques études réalisées en Californie ont exploré ce lien éventuel entre les écosystèmes terrestres et marins grâce à des méthodes statistiques, moléculaires et expérimentales (Miller et al. 2002; Conrad et al. 2005; Miller et al. 2008; Shapiro et al. 2009; Shapiro et al. 2010; Shapiro et al. 2012a; Shapiro et al. 2012b). Dans l'article 4, le transport des oocystes de *T. gondii* dans l'eau a été modélisé pour la première fois, permettant d'obtenir un intervalle d'ordres de grandeur des concentrations probables d'oocystes dans le milieu marin. Les résultats de cet article et de l'article 3 indiquent que les lynx pourraient être des sources de contamination du bassin versant de l'Arctique Canadien suffisantes pour permettre l'exposition et potentiellement l'infection des phoques au niveau des estuaires via les eaux de la fonte printanière contaminées par des oocystes de *T. gondii*.

Jusqu'à ce jour, aucune information n'était disponible sur le niveau de prévalence de la toxoplasmose dans les populations de phoques de l'Arctique Canadien. L'étude transversale réalisée dans ces populations et présentée dans l'article 1 constitue l'étude de séroprévalence la plus importante en termes de nombre de sérums testés (près de 800), d'étendue géographique (de Tuktoyaktuk à Sanikiluaq) et d'échelle temporelle (plus de cinq ans de données). Cette étude nous a permis de montrer que les phoques constituent une source d'infection probable pour les Inuits et a suggéré un lien possible entre la contamination des estuaires par *T. gondii* et la toxoplasmose chez les phoques. Dans la première partie de ce chapitre, nous discutons les principaux résultats en faveur de l'exposition des phoques aux oocystes transportés dans les eaux de la fonte. Dans la seconde partie, nous discutons plus globalement de la fonte printanière comme mécanisme potentiel de propagation des agents pathogènes ainsi que de son impact sur la santé des

écosystèmes et la santé publique. Finalement, les principales limites de ce projet sont présentées dans la dernière partie de cette discussion.

Contamination des phoques de l'Arctique Canadien par *Toxoplasma gondii* lors de la fonte printanière

La fonte comme mécanisme de contamination des écosystèmes côtiers

L'article 1 a montré que les phoques de l'Arctique Canadien étaient infectés par *T. gondii* et l'excrétion de ce parasite se faisant uniquement par les félidés, la contamination du milieu marin par les écoulements d'eau douce transportant des oocystes est très probable. Les articles 2 et 4 suggèrent que la période de la fonte printanière offre l'opportunité à *T. gondii* de contaminer les estuaires et les côtes de l'Arctique Canadien. Les études de séroprévalence chez les lynx du Canada au Québec (article 3) et en Alaska (Zarnke et al. 2001) suggèrent que l'infection par *T. gondii* pourrait être largement répandue dans les populations de lynx des écosystèmes boréaux d'Amérique du Nord. Plus encore, la découverte de lynx séropositifs dans une même région du Québec mais à des périodes différentes (2009 et 1997) indique que la toxoplasmose pourrait y être endémique. La démonstration de l'excrétion d'oocystes chez le lynx roux (*Lynx rufus*) (Miller et al. 1972; Marchiondo et al. 1976) suggère que le lynx du Canada, une espèce apparentée, peut excréter des oocystes de *T. gondii* dans ses fèces. La forêt boréale du Subarctique Canadien devrait donc être contaminée par des oocystes. Dans cette région, 40 à 70% de l'écoulement annuel d'eau est concentré sur une période de quelques semaines au printemps avec la fonte de grandes quantités de neige accumulées pendant 6 à 9 mois (Woo 1993). Plusieurs millions d'oocystes, reconnus pour être très résistants dans l'environnement, devraient potentiellement être accumulés dans et sous le couvert neigeux et, au moment de la courte période de la fonte, massivement et rapidement contaminer les rivières qui les transportent jusque dans les estuaires à plusieurs milliers de kilomètres en aval. L'augmentation de la

salinité dans les estuaires favorise *a priori* la sédimentation des oocystes (Shapiro et al. 2012b) qui devraient ainsi être concentrés dans ces zones attractives pour de nombreux organismes et favorables à l'installation d'importantes populations de bivalves. La présence de glace de mer pourrait faciliter la dispersion des oocystes le long des côtes en limitant le mélange des eaux douces et salées (et donc la sédimentation des oocystes) (Mann et Lazier 2006), menant ainsi à la contamination des écosystèmes côtiers qui constituent l'habitat des phoques annelés. Cette voie de contamination hydrique est donc vraisemblable et pourrait être largement répandue dans le bassin versant de l'Arctique Canadien.

Ordres de grandeur des concentrations

Les travaux de modélisation hydrologique présentés dans l'article 4 ont permis d'obtenir un intervalle d'ordres de grandeur des concentrations probables d'oocystes dans l'eau de fonte qui suggère que la contamination hydrique des estuaires permet possiblement la contamination des phoques même avec un scénario conservateur (apport minimum d'oocystes dans les rivières). Ces concentrations ont été calculées dans deux bassins versants représentatifs des écosystèmes subarctiques et tempérés du bassin versant de l'Arctique Canadien et pour lesquels le modèle HYDROTEL avait été préalablement calé et validé (Fortin et al. 2001a, b; Turcotte et al. 2003; Turcotte et al. 2007; Rousseau et al. 2008; Jutras et al. 2009). Nos résultats ont permis de montrer que la dynamique de transport des oocystes devrait être probablement comparable entre les deux types de bassins versants, ce qui suggère que l'intervalle d'ordres de grandeur des concentrations est valable pour une grande partie des sous bassins versants potentiellement contaminés de l'Arctique Canadien. L'article 4 indique que, même avec de relativement faibles quantités d'oocystes rejetées dans les rivières, les concentrations d'oocystes pourraient être suffisantes pour permettre la contamination journalière de plusieurs bivalves qui forment d'importantes colonies au niveau des estuaires capables de filtrer plusieurs millions de litres par jour (Thorp et al. 2010). Par contre, ces concentrations en oocystes devraient être trop peu importantes pour que les phoques puissent se contaminer directement via l'eau de boisson. En effet, d'après

nos simulations hydrologiques, les phoques devraient ingérer plusieurs litres d'eau pour se contaminer, alors que leurs besoins hydriques sont normalement couverts par l'eau présente dans leurs proies (Riedman 1990). Ainsi, les résultats de l'article 4 suggèrent que les phoques s'infecteraient plutôt par la consommation de proies contaminées comme les bivalves. D'après Chambellant (2010b), les bivalves sont peu consommés par les populations de phoques de l'ouest de la Baie d'Hudson chez lesquelles les niveaux de séroprévalence étaient les plus élevés dans notre étude. Cependant, la possibilité de sous-estimation des invertébrés en général dans la diète des phoques est très probable (Chambellant 2010b).

Facteurs favorisant des concentrations élevées dans les estuaires

Plusieurs facteurs favorisant des concentrations particulièrement élevées d'oocystes dans les estuaires au moment de la fonte ont été identifiés dans les articles 2, 3 et 4.

Les conditions météorologiques influencent directement les concentrations d'oocystes dans l'eau par l'intermédiaire du phénomène de dilution. Un relativement faible volume de précipitations (neige accumulée et pluie) et une durée de fonte lente (corrélée aux températures printanières) pourraient favoriser des concentrations élevées. Des variations annuelles dans la contamination hydrique sont ainsi probables. Les précipitations pourraient être également importantes pour expliquer les variations spatiales de la contamination des estuaires. En effet, les fortes accumulations de neige dans le bassin versant de la Montmorency expliquent probablement les concentrations d'oocystes moins élevées dans ce bassin que dans celui de la Nécopastic malgré une densité de lynx plus importante dans le bassin versant de la Montmorency. Globalement, les relativement faibles accumulations de neige dans les bassins versants subarctiques pourraient ainsi favoriser des concentrations plus élevées aux estuaires de ces bassins qu'aux estuaires de bassins situés dans des zones tempérées. Les conditions météorologiques devraient également influencer indirectement les concentrations en améliorant le transport des oocystes jusque dans les

rivières. Des événements de pluie ou une fonte rapide, en influençant la dynamique temporelle de la fonte, pourraient ainsi homogénéiser et concentrer l'apport des oocystes dans les rivières.

Les différentes simulations hydrologiques réalisées dans l'article 4 suggèrent également que les concentrations modélisées sont très sensibles à la quantité d'oocystes potentiellement rejetée dans les rivières. Le niveau de contamination de la neige devrait être influencé par la densité de lynx présent dans le bassin versant et l'incidence d'infection chez les lynx. Ces facteurs devraient varier spatialement d'un bassin versant à l'autre mais également temporellement, et en particulier en fonction des cycles de populations lynx-lièvres (Mowat et al. 2000) comme le suggèrent les résultats de l'article 3. En effet, une proportion de lynx élevée était séropositifs en 1997, année où la population de lynx était en densité importante (Fortin et Tardif 2003), comparativement à l'année 2009 pendant laquelle les lynx étaient dans la phase descendante de leur cycle populationnel (Paul et Trudeau 2010). Ces résultats sérologiques supportent donc l'hypothèse d'une transmission optimale de *T. gondii* dans les populations de lynx en augmentation.

Certains facteurs, en augmentant la probabilité que les oocystes atteignent les rivières, devraient permettre de maximiser les concentrations d'oocystes dans l'eau. Ces facteurs identifiés dans l'article 2 sont: le taux d'infiltration du sol peu élevé au moment de la fonte, les caractéristiques physiques du terrain contaminé (pente) et la distribution spatiale des fèces contaminées de lynx à l'échelle locale (proximité à la rivière). A l'échelle du bassin versant, plus la contamination est proche de l'exutoire des rivières, plus les concentrations des oocystes à ce niveau devraient être élevées, comme le suggèrent les simulations hydrologiques (article 4). La distribution spatiale des fèces contaminées de lynx à l'échelle locale et à l'échelle du bassin versant est influencée par l'habitat disponible pour les lynx, leur stratégie de sélection et d'utilisation de cet habitat ainsi que par leur comportement défécatoire. En hiver, les lynx pourraient utiliser plus fréquemment les zones riveraines qu'en été, du fait d'une meilleure accessibilité offerte par les rivières gelées (Mowat et Slough 2003), ce qui pourrait favoriser la contamination de la neige par les

oocystes dans les zones riveraines (et donc augmenter la probabilité que les oocystes atteignent le lit de la rivière).

Cyclicité de l'exposition

L'intégration des différents mécanismes de contamination, de transport et d'exposition dans nos travaux a permis de montrer comment les cycles hydrologique, biologique et parasitaire pourraient possiblement interagir entre eux sur différentes échelles spatio-temporelles afin de favoriser la contamination des écosystèmes estuariens de l'Arctique Canadien. Le cycle hydrologique, en permettant possiblement un apport d'oocystes de *T. gondii* relativement important dans les rivières au printemps, pourrait favoriser une contamination annuelle des estuaires. La période printanière correspond également à une période de production de jeunes organismes naïfs vis-à-vis de l'infection à *T. gondii* et qui sont attirés dans les estuaires particulièrement riches en nourriture à ce moment de l'année (Mann et Lazier 2006). Le couplage des cycles hydrologique et biologique pourrait ainsi optimiser la transmission de *T. gondii* dans les estuaires. Le cycle biologique des lynx et le cycle parasitaire pourraient également interagir avec le cycle hydrologique pour maximiser la contamination de l'eau de la fonte par les oocystes. Les chatons naissant en mai-juin (Mowat et al. 2000), la consommation des premiers repas carnés au printemps devrait permettre leur primo-infection et donc l'excrétion d'oocystes. Au début de l'automne, les chatons sont capables de voyager avec leur mère qui, à cette période, a pleinement réinvesti le territoire qu'elle occupait avant la mise bas (Mowat et al. 2000). La chasse dans ce territoire, où la situation épidémiologique diffère potentiellement de celle du territoire de mise-bas, pourrait également favoriser la primo-infection des jeunes lynx en augmentant la probabilité de contact avec des kystes tissulaires. En particulier, la fin de l'hiver pourrait être favorable à l'excrétion d'oocystes car vers février début mars les chatons restent moins avec leur mère et certains dispersent fin avril début mai vers de nouveaux territoires (Mowat et al. 2000). De plus, les conditions de températures à la fin de l'hiver pourraient favoriser la sporulation et la viabilité des oocystes excrétés à cette

période de l'année. Au niveau de la variabilité interannuelle, le cycle lynx-lièvre devrait également influencer le risque d'infection comme le suggèrent les résultats de l'article 3. En effet, la transmission parasitaire devrait dépendre des densités relatives de lynx (HD) et de lièvres (HI) et des variations dans la natalité, la mortalité et dans le nombre d'individus sensibles, infectés et immuns.

Exposition menant à la contamination des phoques

Variations spatio-temporelles

Les résultats de l'étude de séroprévalence (article 1) indiquent qu'environ 10% des phoques de l'Arctique Canadien sont infectés par *T. gondii*. Le phoque annelé, très majoritairement échantillonné dans notre étude, est une espèce résidente de l'Arctique. Son statut infectieux devrait donc refléter la force d'infection exercée par *T. gondii* dans l'Océan Arctique. La découverte de phoques séropositifs dans toutes les populations échantillonnées indique que la contamination hydrique par les oocystes est possiblement généralisée à l'ensemble du vaste territoire de l'Arctique Canadien. Plus précisément, les variations spatio-temporelles dans la séroprévalence suggèrent que l'exposition aux oocystes varie d'un endroit à l'autre et est plus ou moins importante en fonction des années. La probabilité d'être séropositif était relativement élevée chez les phoques chassés autour d'Arviat par rapport à Sanikiluaq et pendant les années 2001 et 2003 par rapport à l'année 2005. Ces observations sont en faveur d'un événement d'exposition des phoques qui n'est pas continu dans le temps et dont l'efficacité pourrait varier dans l'espace et le temps.

Les variations spatio-temporelles de la séroprévalence peuvent potentiellement être associées à des fluctuations dans la contamination par *T. gondii* des bassins versants drainant l'Arctique Canadien. Les variations spatio-temporelles probables du phénomène de contamination à l'échelle du bassin versant (voir précédemment) sont en faveur de telles

associations. Par exemple, les données de séroprévalence suggèrent que les populations de phoques du Haut Arctique sont moins exposées que celles de la Baie d'Hudson, ce qui pourrait signifier une contamination moindre des estuaires dans le Haut Arctique comparée à celle dans la Baie d'Hudson. La ligne des arbres qui délimite l'habitat potentiel des lynx (sources d'oocystes) est très éloignée des côtes du Haut Arctique, alors que la forêt boréale jouxte les côtes de la Baie d'Hudson (Figure 5). Nous avons identifié ce facteur dans l'article 4 comme potentiellement important dans l'apparition de concentrations élevées au niveau des estuaires.

Les variations spatiales de la séroprévalence pourraient être également associées à des caractéristiques particulières qui prédisposent certaines populations de phoques à être plus exposées à *T. gondii* que d'autres. Par exemple, le régime alimentaire de la population d'Arviat diffère de celui de la population de Sanikiluaq (Chambellant 2010a) et les niveaux de séroprévalence que nous avons trouvés diffèrent également significativement entre ces deux populations. Ainsi, le niveau de contamination des estuaires ne serait pas le seul déterminant dans la contamination des phoques, et la disponibilité ou la stratégie de sélection des proies pourraient être également importantes à considérer, non seulement au niveau populationnel mais aussi au niveau individuel comme nous allons le voir dans la prochaine partie.

Variations en fonction de l'âge

Nous avons trouvé dans les populations de phoques annelés une relation inattendue de la séroprévalence avec l'âge avec un relativement haut niveau de séroprévalence chez les jeunes phoques puis une stabilisation (voire une diminution) chez les adultes. Ces résultats sont assez inhabituel au regard de ceux de la grande majorité des études qui indiquent une augmentation graduelle de la séroprévalence avec l'âge, relation typique d'une exposition des individus tout au long de leur vie et chez lesquels les anticorps persistent sur une longue période. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la

stabilisation de la séroprévalence chez les adultes. La perte des adultes séropositifs par mortalité ou guérison ou bien la diminution voire l'absence d'exposition à *T. gondii* à l'âge adulte. Opsteegh et al. (2011b) ont trouvé un même type de variation chez les sangliers au Pays-Bas : la séroprévalence augmentait jusqu'à l'âge de 10 mois puis se stabilisait dans les classes d'âge supérieur. Ces chercheurs ont fait l'hypothèse que ces animaux étaient capables de se débarrasser des kystes tissulaires (menant à la disparition des anticorps) redevenant à nouveau sensibles à l'infection par *T. gondii*. Cependant, l'augmentation de la séroprévalence chez les phoques annelés jusqu'à l'âge de 5 ans n'est pas en faveur d'une telle hypothèse, car on ne voit pas pourquoi les juvéniles (1-5 ans) ne seraient pas capables de guérir de l'infection tout comme les adultes. La même conclusion peut être tirée si on parle de mortalité au lieu de guérison. Nos résultats sont donc plutôt en faveur d'une incidence d'infection moins importante (voire nulle) chez les adultes dont le statut immunitaire deviendrait difficilement détectable après plusieurs années de non exposition au parasite. L'exposition à *T. gondii* se ferait ainsi préférentiellement à un âge précoce dans les populations de phoques annelés de l'Arctique Canadien. Plus encore, la séroprévalence n'augmente pas graduellement avec l'âge chez les jeunes phoques de la Baie d'Hudson mais présente plutôt un profil très irrégulier (données non publiées), ce qui suggère également une variation temporelle de l'incidence d'infection. Ces données pourraient ainsi appuyer l'hypothèse d'un évènement ponctuel de transmission de *T. gondii* aux jeunes phoques comme la contamination hydrique printanière dont l'efficacité en termes d'exposition des jeunes phoques varierait d'une année à l'autre et potentiellement d'une région à l'autre.

Mécanismes d'exposition et de contamination préférentielles des jeunes phoques

Chez les phoques annelés, on observe trois saisons écologiques dans l'utilisation de l'habitat, basées sur les conditions de glace et de lumière ainsi que sur les caractères impliqués dans la reproduction et la survie de ces phoques (Born et al. 2004). En hiver, les adultes utilisent la glace côtière pour former des territoires de reproduction dont les

individus non matures sexuellement (juvéniles) sont exclus. Au printemps, les jeunes naissent et les adultes les élèvent au niveau de la glace côtière; c'est également la période d'accouplement suivie de la mue. Les déplacements de ces phoques (adultes et jeunes de l'année) sont alors relativement réduits et se concentrent autour des trous de respiration et des cavités nivales (cavités creusées dans la neige, protégeant les jeunes du froid et des prédateurs) (Born et al. 2004). La rupture de la glace de mer commence au printemps, et elle est particulièrement rapide au niveau des estuaires du fait de l'important apport d'eau douce (Mann et Lazier 2006). Les zones estuariennes sont donc assez tôt dans la saison accessibles aux juvéniles, dont les déplacements ne sont pas limités comme ceux des adultes à cette période de l'année. La ségrégation entre jeunes et adultes dans l'utilisation de l'habitat qui conditionne l'accès aux ressources alimentaires pourrait donc favoriser l'exposition des juvéniles à *T. gondii* potentiellement présent au niveau des estuaires.

Afin d'explorer le rôle de l'écologie alimentaire dans l'exposition potentielle des phoques à *T. gondii*, nous avons utilisé des données d'isotopes stables, un type de données qui *a priori* n'a jamais été utilisé dans d'autres études. Des valeurs significativement moins élevées du ratio d'isotopes stables de carbone chez les jeunes phoques séropositifs comparativement aux jeunes phoques séronégatifs soulèvent l'hypothèse de l'alimentation pélagique comme facteur de risque d'infection à *T. gondii*. Le lien entre l'habitat utilisé pour l'alimentation et les proies potentiellement contaminées par les oocystes comme les bivalves (organismes benthiques côtiers) n'est pas clair. Nos résultats soulèvent l'hypothèse que des sources ou des mécanismes particuliers pourraient permettre l'exposition des jeunes phoques aux oocystes de *T. gondii*.

En conclusion, le phénomène de contamination par *T. gondii* des estuaires lors de la fonte implique de multiples facteurs et mécanismes qui devraient interagir entre eux pour aboutir possiblement à des concentrations d'oocystes relativement élevées dans les estuaires. Des variations spatio-temporelles dans l'importance de la contamination sont probables et pourraient être responsables de la variabilité dans la séroprévalence chez les

phoques de l'Arctique Canadien. Ainsi, cette étude sérologique supporte l'hypothèse d'un flux d'oocystes des écosystèmes terrestres vers les écosystèmes marins de l'Arctique Canadien comme mécanisme saisonnier de contamination des phoques plutôt de type évènementiel.

Mécanisme de la fonte printanière : propagation des agents pathogènes, santé des écosystèmes et santé publique

Les estuaires sont considérés dans le monde comme des zones particulièrement menacées (Kennish 2002). Le phénomène de contamination des estuaires par des agents pathogènes zoonotiques d'origine terrestre représente un risque pour la santé des organismes marins mais également des êtres humains qui habitent les zones côtières (Kennish 2002; Miller et al. 2006; Stewart et al. 2008). Notre projet s'est intéressé à l'exploration d'un mécanisme original de propagation de *T. gondii* via la fonte de la neige qui mène vraisemblablement à la contamination marine des estuaires. Ce mécanisme de contamination a seulement été étudié pour les contaminants organiques et inorganiques (Meyer et Wania 2008). Dans les études de transport des contaminants biologiques, la fonte de la neige est considérée seulement comme un évènement pluvieux qui mobilise les microorganismes accumulés dans les sols (Whitman et al. 2008; Zhu et al. 2011). Pourtant, nos recherches ont soulevé l'hypothèse que la neige pourrait agir comme medium de stockage, de concentration et d'apport de contaminants biologiques. En particulier, des agents pathogènes excrétés en grande quantité dans la neige par la faune et résistants aux températures froides hivernales pourraient avoir l'opportunité lors de la fonte de se propager massivement et rapidement dans le réseau hydrique d'un bassin versant jusqu'à son estuaire. Les résultats de notre projet pourraient alors constituer une première étape dans l'évaluation du risque d'exposition de la faune marine aux agents pathogènes transportés dans les eaux de fonte et présentant potentiellement un risque pour la santé des écosystèmes et la santé humaine.

Le cas de *Toxoplasma gondii*

Plusieurs études suggèrent que le commerce maritime et les migrations aviaires permettent la propagation de *T. gondii* sur de vastes distances (Lehmann et al. 2006; Prestrud et al. 2008). Nos recherches montrent que le transport dans l'eau de fonte devrait être également efficace pour assurer la propagation de ce parasite dans l'Arctique Canadien et que cette voie participerait ainsi à la globalisation de *T. gondii*. L'impact de la contamination par *T. gondii* sur la santé des écosystèmes marins n'est pas connu, mais plusieurs études suggèrent qu'il pourrait être important (Dubey 2010). Des cas de toxoplasmose clinique chez plusieurs espèces de mammifères marins ont été documentés (Dubey 2010) et il s'agit d'une cause majeure de mortalité chez la loutre de mer californienne, qui est une espèce clef dans l'écosystème côtier de cette région (Conrad et al. 2005). Récemment, la consommation de bivalves a été identifiée comme un facteur de risque d'infection à *T. gondii* (Jones et al. 2009), soulignant l'impact possiblement important de la contamination des zones marines sur la santé publique et également le rôle potentiel des bivalves dans la transmission de *T. gondii* à travers les réseaux trophiques marins.

La fonte printanière comme voie d'exposition et de contamination des phoques dans l'Arctique Canadien est un mécanisme plausible comme nous l'avons discuté précédemment. La découverte d'anticorps anti-*T. gondii* dans ces populations de phoque implique un risque lié à la consommation de viande provenant de ces animaux traditionnellement chassés par les Inuits. Les phoques séropositifs dans notre étude devraient avoir développé des kystes tissulaires étant donné qu'en conditions expérimentales, des phoques séropositifs au test MAT étaient capables de transmettre l'infection à des chats (Gajadhar et al. 2004). Ce type de viande est consommé principalement cru, ce qui devrait exposer potentiellement les Inuits à des bradyzoïtes viables présents dans les kystes tissulaires. La viande de phoque, et surtout de phoques annelés qui sont les plus abondants mammifères marins de l'Arctique Canadien, est la composante principale de l'alimentation traditionnelle dans presque toutes les communautés inuites. En plus d'une consommation généralisée et relativement fréquente,

la tradition de partage de la viande chassée entre les membres d'une communauté devrait permettre l'exposition et potentiellement l'infection de nombreux individus à partir d'un phoque infecté. Les variations spatio-temporelles de la séroprévalence chez les phoques annelés montrées dans l'article 1 suggèrent que le risque infectieux associé à la consommation de viande provenant de ces phoques varie entre les différentes communautés inuites et en fonction des années. Ce risque pourrait être plus élevé pour les communautés du sud étant donné leur relative proximité aux estuaires potentiellement contaminés par des oocystes. Le gradient nord sud dans les résultats sérologiques de l'enquête santé Qanuipitaa réalisée au Nunavik (Messier et al. 2009) va dans le sens de cette hypothèse.

Impact des changements climatiques

Les régions polaires sont les premières régions touchées par les changements climatiques actuels, ce qui en fait des territoires de grand intérêt pour observer et comprendre l'impact de ces changements sur les écosystèmes (Kutz et al. 2009). Les populations inuites de l'Arctique Canadien sont très fragilisées par ces changements environnementaux majeurs (IPCC 2007). Parmi les risques auxquels les Inuits sont exposés, l'émergence ou la réémergence d'agents pathogènes est préoccupant. Les mécanismes identifiés dans ce projet suggèrent que les changements climatiques pourraient avoir un impact majeur sur la dispersion probable des oocystes de *T. gondii* dans les écosystèmes nordiques marins et donc sur l'exposition potentielle des phoques, sources probables d'infection des Inuits.

L'augmentation globale des températures, en augmentant la fréquence et l'intensité des événements pluvieux (IPCC 2007), améliore la mobilisation des agents pathogènes d'origine hydrique et leur propagation dans les eaux de surface et les eaux souterraines. Dans l'Arctique et le Subarctique Canadien, on assiste à la fonte rapide du pergélisol et à l'intensification du cycle hydrologique qui devient également plus variable (ACIA 2004; Dery et al. 2009). Ces changements ont probablement un impact sur le risque d'exposition

aux oocystes dans les estuaires, comme suggéré par l'impact potentiellement important de la dynamique hydrologique sur l'apport et les concentrations d'oocystes en période de fonte. Les augmentations de températures et d'humidité (IPCC 2007) devraient également favoriser la survie des agents pathogènes comme *T. gondii* qui ont une phase environnementale dans leur cycle de vie (Meerburg et Kijlstra 2009). D'ailleurs, une meilleure survie des oocystes de *T. gondii* dans les eaux marines de l'Atlantique Nord baignant les côtes du Svalbard et provenant de régions plus au sud est l'une des hypothèses avancées pour expliquer le doublement de la prévalence d'infection des ours polaires du Svalbard dans les dernières décennies (Oksanen et al. 2009; Jensen et al. 2010). L'augmentation globale des températures pourrait également permettre à des réservoirs potentiels de *T. gondii* comme les lynx ou d'autres espèces de coloniser les régions nordiques et ainsi de favoriser la propagation de *T. gondii* vers de nouveaux territoires où des populations naïves pourraient être infectées. Par exemple, la croissance des arbres plus au nord (ACIA 2004) devrait étendre l'aire de répartition des lynx vers le nord et ainsi la zone de contamination par les oocystes. De même des changements dans l'écologie des hôtes pourraient influencer la transmission de *T. gondii* dans l'Arctique Canadien (Burek et al. 2008; Meerburg et Kijlstra 2009). Les changements observés dans les caractères impliqués dans la reproduction et la survie de ces phoques ainsi que l'écologie alimentaire des phoques annelés de la Baie d'Hudson, liés probablement à l'impact des changements climatiques sur le cycle de la glace de mer (Chambellant 2010a), pourraient ainsi modifier l'exposition des phoques à *T. gondii*. Par exemple, une rupture précoce de la glace de mer devrait permettre et faciliter l'accès des phoques adultes aux estuaires contaminés.

Vu la complexité des phénomènes en jeu révélée dans nos travaux, les effets des changements climatiques sur l'apport hydrique de *T. gondii* et l'infection de ses hôtes dans l'Arctique Canadien sont extrêmement difficiles à prédire. Il est donc d'autant plus important d'améliorer la compréhension de la dynamique et de la réponse de ce système à ces profonds changements. Dans ce sens, nos travaux constituent une première étape et suggère que les phoques, du fait de leur position de prédateur dans le réseau trophique marin de l'Arctique et de leur longue durée de vie, pourraient potentiellement constituer des

sentinelles idéales dans l'évaluation de l'impact potentiel des changements climatiques sur l'apport potentiel d'oocystes dans les eaux de la fonte.

Principales limites

Modélisation hydrologique

Un des objectifs principaux de ce projet était d'étudier la dynamique du transport hydrique de *T. gondii* lors de la fonte printanière. Plusieurs modèles de transport à l'échelle du bassin versant ont été développés pour les protozoaires *Cryptosporidium* et *Giardia* (Jamieson et al. 2004), mais aucun modèle spécifique à *T. gondii* n'existe à ce jour. Nous avons utilisé le modèle hydrologique GIBSI qui a démontré son utilité dans le transport de microorganismes (Rogel 2007). Cependant, ce modèle n'a pas été validé pour le transport des oocystes de *T. gondii*. La validation d'un modèle hydrologique pour le transport des oocystes de *T. gondii* est difficile actuellement en raison d'un manque de sensibilité dans les méthodes disponibles pour détecter les oocystes dilués dans l'eau (Dumetre et Darde 2003). L'utilisation des données de prévalence chez les phoques pourrait servir à la validation des concentrations d'oocystes aux estuaires obtenues par la modélisation. Cependant, afin d'établir des associations spatio-temporelles plus directes entre le niveau de contamination potentiel des estuaires et l'infection des mammifères marins, un suivi longitudinal des populations de phoques sur plusieurs années et à différents endroits serait idéal bien que difficilement envisageable.

Le modèle hydrologique GIBSI nous a permis d'explorer la dynamique temporelle des concentrations d'oocystes à l'exutoire de deux rivières au moment de la fonte. Cependant, des simplifications importantes ont dû être faites : les oocystes ont été considérés comme des composés conservatifs (pas de perte) et le rejet des oocystes s'est fait directement dans la rivière. En effet, aucune donnée n'existe sur la viabilité des

oocystes dans la neige et sur la probabilité que des oocystes viables et infectieux puissent se retrouver dans les rivières au moment de la fonte. À ce jour, aucun modèle d'excrétion, de survie et de transport des oocystes de *T. gondii* dans la neige et les sols jusqu'aux rivières n'est disponible. La rareté des données sur le comportement de dispersion des oocystes dans l'environnement et la nature diffuse des sources d'oocystes rendent la mise en place d'un tel modèle fastidieuse. Cependant, nous pensons que le choix de scénarios extrêmes dans le calcul de la quantité d'oocystes et dans le type de rejet en rivière a pu permettre de prendre en compte ces sources d'incertitudes. Plus particulièrement, les concentrations minimales d'oocystes estimées sont d'une grande importance dans l'interprétation de l'importance du phénomène de contamination dans l'exposition des organismes aquatiques. Pour calculer les quantités minimales d'oocystes rejetées, nous avons utilisé les valeurs minimales théoriques de quantités d'oocystes possiblement excrétées par les lynx et de densités de lynx dans le bassin versant. Nous avons choisi une incidence d'infection (prévalence d'excrétion) minimale de 1% sur la période hivernale. Dans l'étude réalisée en 1997 par Labelle et al. (2001), 18% (6/33) des lynx âgés de 6 mois étaient séropositifs. Si on fait l'hypothèse que l'incidence d'infection était constante sur une période de 6 mois, la probabilité mensuelle d'infection est de 0.03, et cette valeur est comparable à celles calculées dans l'étude d'Afonso et al. (2007) sur la population de chats de l'Archipel des Kerguelen dans le subantarctique (0.023 à 0.054). L'incidence choisie de 1% correspond à une probabilité mensuelle d'infection de l'ordre de 0.001, valeur inférieure à celle estimée d'après les données disponibles chez les lynx. Le type de rejet continu des oocystes dans la rivière suppose une répartition homogène des oocystes dans la neige. Ce type de rejet ne tenant pas compte de l'agrégation probable de la contamination (distribution hétérogène des fèces) sous estime probablement les pics de concentrations journalières d'oocystes. Ainsi, les concentrations minimales d'oocystes modélisées, basées sur un calage conservateur du modèle, ne devraient pas surestimer le niveau de risque minimal potentiel.

Tests diagnostiques

Nous avons choisi le test MAT pour les raisons suivantes : sa popularité dans les enquêtes sérologiques chez les espèces fauniques, sa capacité à détecter les phoques infectés expérimentalement dans l'étude de Gajadhar et al. (2004) et sa facilité de mise en œuvre. Cependant, le MAT est sujet aux biais de classement du fait de la subjectivité dans l'interprétation de ces résultats. Pour limiter ce biais potentiel, la lecture des résultats a été effectuée par une même personne. La non-validation de ce test chez le phoque annelé pose le problème de la sensibilité et de la spécificité du test MAT. Celles-ci dépendent des prévalences d'infection dans les différentes populations testées, mais également de la qualité des échantillons utilisés. L'obtention de sérums de qualité chez les animaux sauvages est souvent difficile et représente un certain challenge dans les régions arctiques où les températures très basses nuisent au prélèvement et à la qualité des échantillons. Par exemple, les cycles de congélation-décongélation provoquent l'hémolyse des échantillons et pourraient mener à une destruction partielle des anticorps qui les rend plus difficiles à détecter, surtout si les titres sont faibles (Brey et al. 1994). Ces inconnues sur la sensibilité et la spécificité ont rendu impossible l'estimation des niveaux de séroprévalence réels dans les populations échantillonnées de phoques. Cependant, les analyses de sensibilité portant sur les associations trouvées entre la probabilité qu'un phoque soit séropositif et les facteurs explicatifs ont montré une bonne robustesse aux variations des valeurs de sensibilité et spécificité. L'impact de ces inconnues sur les conclusions est donc *a priori* minime.

Pour rechercher la présence de bradyzoïtes de *T. gondii* dans les tissus de phoque, nous avons choisi la technique de PCR car c'était la seule capable de détecter le parasite sur des échantillons congelés et conservés depuis plusieurs années. Le bio essai, qui est actuellement la méthode de référence, nécessite des échantillons relativement frais dans lesquels *T. gondii* restent viables et infectieux, une qualité d'échantillons impossible à assurer dans les conditions de notre étude. Malgré l'utilisation de 191 échantillons de tissus provenant de 149 phoques dont 30 étaient séropositifs à *T. gondii*, nous n'avons pas pu détecter *T. gondii*. La faible quantité de tissus analysable par PCR (≤ 50 mg) pourrait expliquer l'absence de détection du parasite dans notre étude. De plus, les faibles titres en

anticorps trouvés ($\leq 1 : 180$) pourraient indiquer une faible concentration dans les tissus de *T. gondii* et donc être associés à une faible probabilité d'isolement, relation suggérée dans plusieurs études (Dubey et al. 2008b; Opsteegh et al. 2010; More et al. 2012).

Les différents travaux réalisés dans le cadre de cette thèse appuient l'hypothèse de l'infection des phoques de l'Arctique Canadien par *T. gondii* via leurs proies contaminées par des oocystes excrétés par des lynx et transportés dans les eaux de la fonte printanière jusqu'au niveau des côtes à des milliers de kilomètres en aval. Les limites identifiées dans ce projet constituent d'éventuelles pistes de recherche futures afin d'explorer davantage l'écologie de *T. gondii* dans l'Arctique Canadien.

Conclusion et perspectives de recherche

Globalement, cette thèse démontre l'importance de considérer les processus épidémiologiques sur des échelles spatio-temporelles variées et notamment les phénomènes de contamination microbiologique au niveau des estuaires dont la source pourrait se trouver à des milliers de kilomètres en amont. Notre projet représente ainsi un cas type méthodologique pour l'étude des problématiques complexes qui se déroulent sur de vastes étendues géographiques et qui font intervenir différents acteurs dans l'espace et le temps. Plus particulièrement, nos travaux ont permis, dans un contexte exploratoire, de formaliser un modèle de dispersion des oocystes dans l'environnement, d'identifier certains points critiques et, pour la première fois, d'estimer un intervalle d'ordres de grandeur des concentrations d'oocystes de *T. gondii* potentiellement présents dans l'eau, établissant ainsi la vraisemblance de la voie hydrique comme source de contamination saisonnière pour les mammifères marins. Cette contamination pourrait être liée au cycle de transmission sylvestre de *T. gondii* dans la forêt boréale, et potentiellement aux cycles de densité des lynx et de leurs proies. Les résultats de ce projet renforcent l'hypothèse que le phoque est une source de toxoplasmose pour les Inuits et suggèrent des variations spatio-temporelles dans l'exposition des Inuits à *T. gondii*, potentiellement liées aux variations spatio-temporelles de la contamination des côtes par les oocystes. Notre étude justifie le maintien des recommandations actuellement en place visant à prévenir les cas de toxoplasmose congénitale chez les femmes enceintes au Nunavik (Proulx 1999). Plus particulièrement, la manipulation et la consommation de viande de phoque crue non congelée sont à éviter pendant la grossesse.

En conclusion, les régions arctiques offrent une merveilleuse opportunité d'étudier les stratégies utilisées par *T. gondii* pour se maintenir dans un environnement extrême sans hôte définitif et est également, un terrain privilégié pour évaluer l'impact des changements climatiques sur la dynamique de transmission des parasites. La compréhension sur des échelles spatio-temporelles variées des processus qui gouvernent la contamination terrestre par les pathogènes et leur transport dans les rivières jusqu'aux estuaires où ils contaminent

leurs hôtes aquatiques nécessite des approches multidisciplinaires au carrefour des sciences hydrologique, météorologique, écologique, épidémiologique, microbiologique et pédologique.

Nos travaux pourraient servir de cadre à l'étude des mécanismes impliqués dans la contamination des estuaires par les oocystes et plus largement par les agents pathogènes d'origine hydrique. Plus spécifiquement, nous proposons deux perspectives de recherche : une analyse quantitative du risque d'exposition des phoques dans l'Arctique Canadien et une appréciation quantitative du risque d'infection des Inuits par la consommation de viande de phoque.

Analyse quantitative du risque d'exposition des phoques dans l'Arctique Canadien

Ces travaux constituent une première étape dans l'analyse du risque d'exposition des phoques de l'Arctique Canadien qui jouent un rôle clef dans les écosystèmes marins et qui sont d'importantes sources alimentaires pour les Inuits. En effet, nos travaux ont permis de développer une méthode d'estimation d'un intervalle d'ordres de grandeur des concentrations d'oocystes. Cette méthode devrait permettre de mener une analyse de risque quantitative de l'exposition des phoques dans le bassin versant de l'Arctique Canadien où peu de données sont disponibles. La Baie d'Hudson constitue une zone d'étude d'intérêt pour quantifier le risque d'exposition des phoques par *T. gondii* dans l'Arctique Canadien. En effet, les niveaux de séroprévalence chez les Inuit vivant dans les communautés bordant la Baie d'Hudson sont particulièrement élevés (Figure 4) et les résultats de ce projet indiquent que les phoques de la Baie d'Hudson sont plus exposés à *T. gondii* que les phoques d'autres régions de l'Arctique Canadien. De plus, le bassin versant de la Baie d'Hudson, occupé en grande partie par la forêt boréale, pourrait soutenir une population potentiellement importante de lynx et la proximité de l'habitat forestier aux écosystèmes

côtiers devrait potentiellement favoriser une exposition particulièrement importante des organismes marins de la Baie d'Hudson aux oocystes de *T. gondii*.

L'application du modèle développé dans cette thèse au bassin versant de l'Arctique Canadien devrait également constituer un outil pour valider l'hypothèse de contamination hydrique par les eaux de fonte. En effet, les données de prévalence chez les phoques offrent la possibilité de valider en partie cette hypothèse comme suggéré précédemment. L'analyse de risque devrait aussi permettre de cibler potentiellement les zones à échantillonner et d'optimiser ainsi la probabilité de détection des oocystes. Ainsi, la recherche de *T. gondii* pourrait se faire grâce à l'échantillonnage printanier de mollusques ou bien de jeunes phoques aux niveaux des estuaires identifiés par la modélisation comme étant les plus à risque (concentrations possiblement les plus élevées). La détermination du génotype des souches de *T. gondii* potentiellement isolées et la comparaison avec le génotype des souches trouvées chez les hôtes définitifs dans le bassin versant de l'Arctique Canadien permettraient d'appuyer l'hypothèse d'un flux hydrique de *T. gondii* entre les écosystèmes terrestre et marin.

Appréciation quantitative du risque d'infection des Inuits par la consommation de viande de phoque

Ce projet soulève le besoin de documenter l'importance relative du phoque par rapport à d'autres gibiers dans l'infection des Inuits, importance qui devrait varier d'une communauté à l'autre en fonction de la disponibilité des phoques et de la prévalence d'infection dans la population chassée. L'étude de séroprévalence réalisée chez les phoques a indiqué qu'ils étaient une source probable d'infection des Inuits. Dans le but d'évaluer l'importance de la consommation de viande de phoque dans l'infection des Inuits, une analyse de risque quantitative est nécessaire. Une appréciation quantitative du risque (AQR) se définit comme une méthode permettant entre autre de déterminer le risque pour une population donnée face à un danger et d'estimer le nombre de cas suite à l'ingestion

d'une denrée contaminée. L'AQR fournit ainsi des réponses quantitatives aux questionnaires de risque (Afssa 2005). L'objectif de cette AQR serait de quantifier le nombre de toxoplasmoses symptomatiques attendues chez les Inuits suite à la consommation de viande de phoque avec un certain niveau d'incertitude et de variabilité. L'AQR suit plusieurs étapes résumées dans la Figure 20.

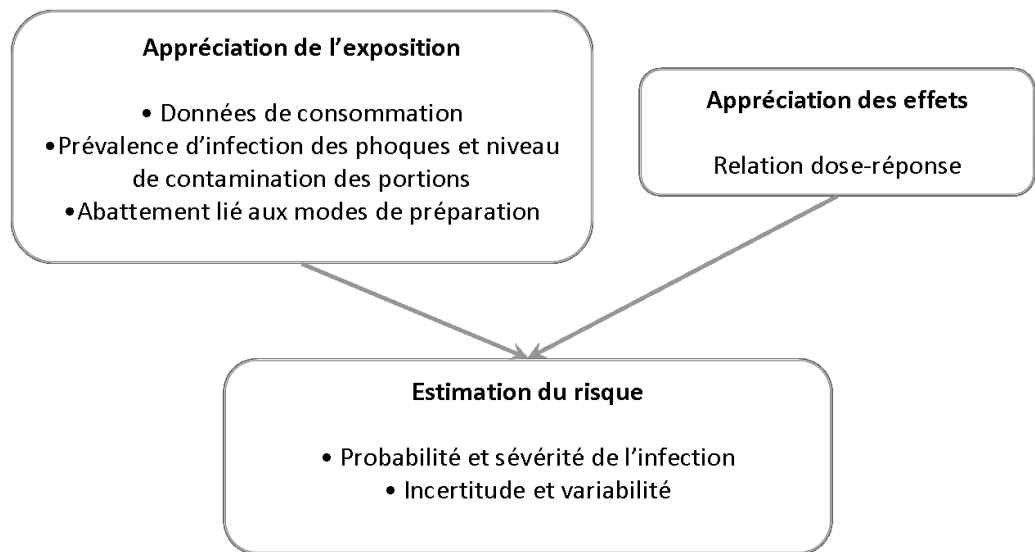


Figure 20. Schéma résumant les principales étapes de l'appréciation quantitative du risque de toxoplasmose suite à la consommation de phoque par les Inuits.

L'AQR nécessite des connaissances sur la consommation et les modes de préparation alimentaire chez les Inuits, sur la contamination des portions préparées de phoque et sur la relation dose-réponse.

Grâce au questionnaire administré dans les communautés inuites du Nunavik lors de l'enquête santé Qanuippitaa en 2004, des données quantitatives et qualitatives sur la consommation de phoque (quantité et fréquence consommées, mode de préparation) sont disponibles. Les données de séroprévalence chez les phoques obtenues dans le cadre de ce projet pourraient permettre d'alimenter l'AQR par l'estimation de la prévalence de

carcasses infectées. Ces données de séroprévalence suggérant qu'il pourrait y avoir des variations spatiales dans le risque infectieux chez les Inuits, l'AQR devrait être adaptée à chacune des communautés inuites. L'absence de détection de kystes tissulaires chez les phoques dans notre projet suggère que leur détection constitue un point critique de l'AQR. La technique de PCR récemment développée par Opteegh et al. (2011a), capable de quantifier l'ADN de *T. gondii* à partir d'une large quantité de tissus (100 g), pourrait permettre de déterminer la distribution et la densité des kystes tissulaires par portion de phoque consommée. L'abattement du nombre de bradyzoïtes par les modes de préparation alimentaire est très peu connu. Une seule étude a évalué la capacité infectieuse de certains mets traditionnels à base de phoque, mais le devis de cette étude n'a pas permis de conclure à l'absence d'infectivité de ces mets de façon générale (Forbes et al. 2009). La relation dose réponse n'étant pas connue chez l'Homme, elle doit être extrapolée à partir des données acquises chez l'animal (Afssa 2005) pour permettre le calcul de la probabilité d'infection humaine suite à l'ingestion d'une portion de phoque contaminée. La probabilité d'apparition de symptômes (toxoplasmose clinique) pourrait alors être estimée à partir des chiffres publiés dans la documentation scientifique.

Dans l'objectif de développer des stratégies de prévention efficace et d'améliorer la prévention de la toxoplasmose en ciblant davantage les recommandations alimentaires déjà en place au Nunavik pour les femmes enceintes non immunes, la comparaison de l'exposition à *T. gondii* via la consommation de différents types de gibier permettrait de déterminer la ou les sources majeures dans l'infection des Inuits. Grâce à l'intégration des autres espèces de gibier consommées par les Inuits dans une évaluation comparative du risque, le nombre d'infections par année suite à la consommation de chaque type de viande serait estimé grâce à une AQR, permettant de comparer leur importance dans la toxoplasmose chez les Inuits et potentiellement d'explicitier les variations spatiales de la séroprévalence au Nunavik. Ces informations sont nécessaires aux gestionnaires de santé publique qui doivent prendre des décisions éclairées en matière de sécurité alimentaire dans les populations inuites, en tenant compte des particularités culturelles propres à ces populations.

Sources documentaires

- ACIA (2004). Impacts of a Warming Arctic: Arctic Climate Impact Assessment.
- Afonso, E, Thulliez, P, Pontier, D and Gilot-Fromont, E (2007). Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. *Parasitology*, 134(Pt.14), 1963-1971.
- Afssa (2005). Toxoplasmose: état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. (ed. AFSSA), pp. 318. Maisons-Alfort.
- Ajzenberg, D, Cogne, N, Paris, L, Bessieres, MH, Thulliez, P, Filisetti, D, Pelloux, H, Marty, P and Darde, ML (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *Journal of Infectious Diseases*, 186(5), 684-689.
- Ajzenberg, D, Banuls, AL, Su, C, Dumetre, A, Demar, M, Carme, B and Darde, ML (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 34(10), 1185-1196.
- Ajzenberg, D (2011). Unresolved questions about the most successful known parasite. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(2), 169-171. doi: 10.1586/eri.10.169.
- Angles, ML, Chandy, JP, Cox, PT, Fisher, IH and Warnecke, MR (2007). Implications of biofilm-associated waterborne *Cryptosporidium* oocysts for the water industry. *Trends in Parasitology*, 23(8), 352-356.
- Aramini, JJ, Stephen, C and Dubey, JP (1998). *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *Journal of Parasitology*, 84(2), 438-440.
- Aramini, JJ, Stephen, C, Dubey, JP, Engelstoft, C, Schwantje, H and Ribble, CS (1999). Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology and Infection*, 122(2), 305-315.
- Arkush, KD, Miller, MA, Leutenegger, CM, Gardner, IA, Packham, AE, Heckerroth, AR, Tenter, AM, Barr, BC and Conrad, PA (2003). Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1087-1097.
- Bahia-Oliveira, LM, Jones, JL, Azevedo-Silva, J, Alves, CC, Orefice, F and Addiss, DG (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 55-62.
- Baldursson, S and Karanis, P (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. *Water Research*, 45(20), 6603-6614.
- Benenson, MW, Takafuji, ET, Lemon, SM, Greenup, RL and Sulzer, AJ (1982). Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *The New England Journal of Medicine*, 307(11), 666-669.

- Borchardt, MA, Spencer, SK, Bertz, PD, Ware, MW, Dubey, JP and Lindquist, HDA (2009). Concentrating *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* from surface water and drinking water by continuous separation channel centrifugation. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1089-1097.
- Born, EW, Teilmann, J, Acquarone, M and Riget, FF (2004). Habitat use of ringed seals (*Phoca hispida*) in the North Water Area (North Baffin Bay). *Arctic*, 57(2), 129-142.
- Bowie, WR, King, AS, Werker, DH, Isaac-Renton, JL, Bell, A, Eng, SB and Marion, SA (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet*, 350(9072), 173-177.
- Boyer, K, Hill, D, Mui, E, Wroblewski, K, Karrison, T, Dubey, JP, Sautter, M, Noble, AG, Withers, S, Swisher, C, Heydemann, P, Hosten, T, Babiarz, J, Lee, D, Meier, P and McLeod, R (2011). Unrecognized Ingestion of *Toxoplasma gondii* Oocysts Leads to Congenital Toxoplasmosis and Causes Epidemics in North America. *Clinical Infectious Diseases*, 53(11), 1081-1089.
- Brey, RL, Cote, SA, Mcglasson, DL, Triplett, DA and Barna, LK (1994). Effects of Repeated Freeze-Thaw Cycles on Anticardiolipin Antibody Immunoreactivity. *American Journal of Clinical Pathology*, 102(5), 586-588.
- Burek, KA, Gulland, FMD and O'Hara, TM (2008). Effects of climate change on Arctic marine mammal health. *Ecological Applications*, 18(2), S126-S134.
- Burnett, AJ, Shortt, SG, Isaac-Renton, J, King, A, Werker, D and Bowie, WR (1998). Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology*, 105(6), 1032-1037.
- Campagna, S, Levesque, B, Anassour-Laouan-Sidi, E, Cote, S, Serhir, B, Ward, BJ, Libman, MD, Drebot, MA, Makowski, K, Andonova, M, Ndao, M and Dewailly, E (2011). Seroprevalence of 10 zoonotic infections in 2 Canadian Cree communities. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(2), 191-199.
- Carne, B, Bissuel, F, Ajzenberg, D, Bouyne, R, Aznar, C, Demar, M, Bichat, S, Louvel, D, Bourbigot, AM, Peneau, C, Neron, P and Darde, ML (2002). Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 4037-4044.
- Carne, B, Demar, M, Ajzenberg, D and Darde, ML (2009). Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 656-658.
- Chambellant, M (2010a). Hudson Bay Ringed Seal: Ecology in a Warming Climate. In *A Little Less Arctic Top Predators in the World's Largest Northern Inland Sea, Hudson Bay* Springer Netherlands, Dordrecht. <http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9121-5>.

- Chambellant, M (2010b). Ecology of ringed seals (*Phoca hispida*) in western Hudson Bay, Canada. In Department of Biological Sciences, Vol. Doctor of Philosophy pp. 279. The University of Manitoba, Winnipeg.
- Chomel, BB, Zarnke, RL, Kasten, RW, Kass, PH and Mendes, E (1995). Serologic survey of *Toxoplasma gondii* in grizzly bears (*Ursus arctos*) and black bears (*Ursus americanus*), from Alaska, 1988 to 1991. *Journal of Wildlife Diseases*, 31(4), 472-479.
- Conrad, PA, Miller, MA, Kreuder, C, James, ER, Mazet, J, Dabritz, H, Jessup, DA, Gulland, F and Grigg, ME (2005). Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), 1155-1168.
- Cook, AJC, Gilbert, RE, Buffolano, W, Zufferey, J, Petersen, E, Jennum, PA, Foulon, W, Semprini, AE and Dunn, DT (2000). Sources of *toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *British Medical Journal*, 321(7254), 142-147.
- Dabritz, HA and Conrad, PA (2010). Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 34-52. Epub 2009 Sep 2010.
- de Moura, L, Bahia-Oliveira, LM, Wada, MY, Jones, JL, Tuboi, SH, Carmo, EH, Ramalho, WM, Camargo, NJ, Trevisan, R, Graca, RM, da Silva, AJ, Moura, I, Dubey, JP and Garrett, DO (2006). Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 326-329.
- Dery, SJ, Hernandez-Henriquez, MA, Burford, JE and Wood, EF (2009). Observational evidence of an intensifying hydrological cycle in northern Canada. *Geophysical Research Letters*, 36.
- Dubey, JP, Thulliez, P and Powell, EC (1995). *Toxoplasma-Gondii* in Iowa Sows - Comparison of Antibody-Titers to Isolation of *Toxoplasma-Gondii* by Bioassays in Mice and Cats. *Journal of Parasitology*, 81(1), 48-53.
- Dubey, JP, Lunney, JK, Shen, SK, Kwok, OCH, Ashford, DA and Thulliez, P (1996). Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *Journal of Parasitology*, 82(3), 438-443.
- Dubey, JP, Rollor, EA, Smith, K, Kwok, OCH and Thulliez, P (1997a). Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. *Journal of Parasitology*, 83(5), 839-841.
- Dubey, JP, Speer, CA, Shen, SK, Kwok, OCH and Blixt, JA (1997b). Oocyst-induced murine toxoplasmosis: Life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Journal of Parasitology*, 83(5), 870-882.
- Dubey, JP, Zarnke, R, Thomas, NJ, Wong, SK, Van Bonn, W, Briggs, M, Davis, JW, Ewing, R, Mense, M, Kwok, OC, Romand, S and Thulliez, P (2003). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, 116(4), 275-296.

- Dubey, JP (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), 57-72.
- Dubey, JP, Parnell, PG, Sreekumar, C, Vianna, MCB, De Young, RW, Dahl, E and Lehmann, T (2004). Biologic and molecular characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from striped skunk (*Mephitis mephitis*), Canada goose (*Branta canadensis*), black-winged lory (*Eos cyanogenia*), and cats (*Felis catus*). *Journal of Parasitology*, 90(5), 1171-1174.
- Dubey, JP, Huong, LT, Sundar, N and Su, C (2007). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in dogs from Vietnam suggests their South American origin. *Veterinary Parasitology*.
- Dubey, JP, Fair, PA, Sundar, N, Velmurugan, G, Kwok, OCH, Mcfee, WE, Majumdar, D and Su, C (2008a). Isolation of *Toxoplasma gondii* from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Parasitology*, 94(4), 821-823.
- Dubey, JP and Jones, JL (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1257-1278.
- Dubey, JP, Sundar, N, Hill, D, Velmurugan, GV, Bandini, LA, Kwok, OCH, Majumdar, D and Su, C (2008b). High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, 38(8-9), 999-1006.
- Dubey, JP, Velmurugan, GV, Chockalingam, A, Pena, HFJ, de Oliveira, LN, Leifer, CA, Gennari, SM, Oliveira, LMGB and Su, C (2008c). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 157(3-4), 299-305.
- Dubey, JP, Jenkins, MC, Kwok, OC, Zink, RL, Michalski, ML, Ulrich, V, Gill, J, Carstensen, M and Thulliez, P (2009). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Iowa and Minnesota using four serologic tests. *Veterinary Parasitology*, 161(3-4), 330-334.
- Dubey, JP (Ed.) (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*, CRC Press, Boca Raton.
- Dubey, JP, Velmurugan, GV, Rajendran, C, Yabsley, MJ, Thomas, NJ, Beckmen, KB, Sinnott, D, Ruid, D, Hart, J, Fair, PA, McFee, WE, Shearn-Bochsler, V, Kwok, OCH, Ferreira, LR, Choudhary, S, Faria, EB, Zhou, H, Felix, TA and Su, C (2011). Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *International Journal for Parasitology*, 41(11), 1139-1147.
- Dumetre, A and Darde, ML (2003). How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiology Reviews*, 27(5), 651-661.
- Dumetre, A and Darde, ML (2007). Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. *Parasitology Research*, 101(4), 989-996.

- EFSA (2007). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. The EFSA Journal, 583, 1-64.
- Elbez-Rubinstein, A, Ajzenberg, D, Darde, ML, Cohen, R, Dumetre, A, Yera, H, Gondon, E, Janaud, JC and Thulliez, P (2009). Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. Journal of Infectious Diseases, 199(2), 280-285.
- Elmore, SA, Jenkins, EJ, Huyvaert, KP, Polley, L, Root, JJ and Moore, CG (2012). *Toxoplasma gondii* in Circumpolar People and Wildlife. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 12(1), 1-9.
- Fayer, R, Dubey, JP and Lindsay, DS (2004). Zoonotic protozoa: from land to sea. Trends in Parasitology, 20(11), 531-536.
- Feldman, HA and Miller, LT (1956). Serological study of toxoplasmosis prevalence. American Journal of Hygiene, 64(3), 320-335.
- Ferguson, C, Husman, AMD, Altavilla, N, Deere, D and Ashbolt, N (2003). Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 33(3), 299-361.
- Forbes, LB, Measures, L and Gajadhar, A (2009). Infectivity of *Toxoplasma gondii* in northern traditional (country) foods prepared with meat from experimentally infected seals. Journal of Food Protection, 72(8), 1756-1760.
- Fortin, C and Tardif, J (2003). Situation du lynx du Canada (*Lynx canadensis*) au Québec. Société de la faune et des parcs du Québec, Québec.
- Fortin, JP, Turcotte, R, Massicotte, S, Moussa, R and Fitzback, J (2001a). A distributed watershed model compatible with remote sensing and GIS data. Part 1: Description of the model. Journal of Hydrologic Engineering - ASCE, 6(2), 91-99.
- Fortin, JP, Turcotte, R, Massicotte, S, Moussa, R and Fitzback, J (2001b). A distributed watershed model compatible with remote sensing and GIS data. Part 2: Application to the Chaudière watershed. Journal of Hydrologic Engineering - ASCE, 6(2), 100-108.
- Gajadhar, AA, Measures, L, Forbes, LB, Kapel, C and Dubey, JP (2004). Experimental *Toxoplasma gondii* infection in grey seals (*Halichoerus grypus*). Journal of Parasitology, 90(2), 255-259.
- Garcia, JL, Gennari, SM, Machado, RZ and Navarro, IT (2006). *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. Experimental Parasitology, 113(4), 267-271.
- Gaydos, JK, Conrad, PA, Gilardi, KV, Blundell, GM and Ben-David, M (2007). Does human proximity affect antibody prevalence in marine-foraging river otters (*Lontra canadensis*)? Journal of Wildlife Diseases, 43(1), 116-123.

- Grigg, ME and Suzuki, Y (2003). Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microbes & Infection*, 5(7), 685-690.
- Grigg, ME and Sundar, N (2009). Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 925-933.
- Gyorkos, TW (1980). Serological investigation for five selected parasitic infections in Inuvik and Arctic Bay / Strathcona Sound, Northwest Territories. *Canada Diseases Weekly Report*, 6, 134-136.
- Hall, SM, Pandit, A, Golwilkar, A and Williams, TS (1999). How do Jains get *toxoplasma* infection? *Lancet*, 354(9177), 486-487.
- Hanni, KD, Mazet, JA, Gulland, FM, Estes, J, Staedler, M, Murray, MJ, Miller, M and Jessup, DA (2003). Clinical pathology and assessment of pathogen exposure in southern and Alaskan sea otters. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4), 837-850.
- Havelaar, AH, van Rosse, F, Bucura, C, Toetenel, MA, Haagsma, JA, Kurowicka, D, Heesterbeek, JAP, Speybroeck, N, Langelaar, MFM, van der Giessen, JWB, Cooke, RM and Braks, MAH (2010). Prioritizing Emerging Zoonoses in The Netherlands. *Plos One*, 5(11).
- Hill, D, Coss, C, Dubey, JP, Wroblewski, K, Sautter, M, Hosten, T, Munoz-Zanzi, C, Mui, E, Withers, S, Boyer, K, Hermes, G, Coyne, J, Jagdis, F, Burnett, A, McLeod, P, Morton, H, Robinson, D and McLeod, R (2011). Identification of a Sporozoite-Specific Antigen from *Toxoplasma Gondii*. *Journal of Parasitology*, 97(2), 328-337.
- Hill, DE, Chirukandoth, S, Dubey, JP, Lunney, JK and Gamble, HR (2006). Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Veterinary Parasitology*, 141(1-2), 9-17.
- Howe, DK and Sibley, LD (1995). *Toxoplasma-Gondii* Comprises 3 Clonal Lineages - Correlation of Parasite Genotype with Human-Disease. *Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1561-1566.
- IPCC (2007). *Climate Change 2007 : Synthesis Report*. Intergovernmental Panel on Climate Change. Valencia, Spain.
- Isaac-Renton, J, Bowie, WR, King, A, Irwin, GS, Ong, CS, Fung, CP, Shokeir, MO and Dubey, JP (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2278-2280.
- Jamieson, R, Gordon, R, Joy, D and Lee, H (2004). Assessing microbial pollution of rural surface waters - A review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management*, 70(1), 1-17.
- Jensen, SK, Aars, J, Lydersen, C, Kovacs, KM and Asbakk, K (2010). The prevalence of *Toxoplasma gondii* in polar bears and their marine mammal prey: evidence for a marine transmission pathway? *Polar Biology*, 33, 599-606.

- Johnson, D, Harms, NJ, Larter, NC, Elkin, BT, Tabel, H and Wei, GJ (2010). Serum Biochemistry, Serology, and Parasitology of Boreal Caribou (*Rangifer Tarandus Caribou*) in the Northwest Territories, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(4), 1096-1107.
- Jokelainen, P, Nareaho, A, Knaapi, S, Oksanen, A, Rikula, U and Sukura, A (2010). *Toxoplasma gondii* in wild cervids and sheep in Finland: North-south gradient in seroprevalence. *Veterinary Parasitology*, 171(3-4), 331-336.
- Jones, JL, Dargelas, V, Roberts, J, Press, C, Remington, JS and Montoya, JG (2009). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 878-884.
- Jones, JL and Dubey, JP (2010). Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Experimental Parasitology*, 124(1), 10-25.
- Jones, JL and Holland, GN (2010). Annual burden of ocular toxoplasmosis in the US. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(3), 464-465. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0664.
- Jutras, S, Rousseau, AN and Clerc, C (2009). Implementation of a Peatland-Specific Water Budget Algorithm in HYDROTEL. *Canadian Water Resources Journal*, 34(4), 349-363.
- Kennish, MJ (2002). Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental Conservation*, 29(1), 78-107.
- Khan, A, Dubey, JP, Su, CL, Ajioka, JW, Rosenthal, BM and Sibley, LD (2011). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology*, 41(6), 645-655.
- Kijlstra, A and Jongert, E (2008). Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *International Journal for Parasitology*, 38(12), 1359-1370.
- Kirk, CM, Amstrup, S, Swor, R, Holcomb, D and O'Hara, TM (2010). Morbillivirus and *Toxoplasma* Exposure and Association with Hematological Parameters for Southern Beaufort Sea Polar Bears: Potential Response to Infectious Agents in a Sentinel Species. *EcoHealth*, 7(3), 321-331.
- Kocan, AA, Barron, SJ, Fox, JC and Franzmann, AW (1986). Antibodies to *Toxoplasma gondii* in moose (*Alces alces L.*) from Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 22(3), 432.
- Kutz, SJ, Elkin, B, Gunn, A and Dubey, JP (2000). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in muskox (*Ovibos moschatus*) sera from northern Canada. *Journal of Parasitology*, 86(4), 879-882.
- Kutz, SJ, Elkin, BT, Panayi, D and Dubey, JP (2001). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in barren-ground caribou (*Rangifer tarandus groenlandicus*) from the Canadian Arctic. *Journal of Parasitology*, 87(2), 439-442.

- Kutz, SJ, Jenkins, EJ, Veitch, AM, Ducrocq, J, Polley, L, Elkin, B and Lair, S (2009). The Arctic as a model for anticipating, preventing, and mitigating climate change impacts on host-parasite interactions. *Vet Parasitol*, 163(3), 217-228.
- Labelle, P, Dubey, JP, Mikaelian, I, Blanchette, N, Lafond, R, St-Onge, S and Martineau, D (2001). Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) from Quebec, Canada. *Journal of Parasitology*, 87(5), 1194-1196.
- Lavoie, E, Lévesque, B, Proulx, JF, Grant, J, Davys Ndassebe, A, Gingras, S, Hubert, B and Libman, M (2008). Evaluation du Programme de dépistage de la toxoplasmose chez les femmes enceintes du Nunavik, 1994-2003. *Canadian Journal of Public Health*, 99(5), 397-400.
- Leclair, D and Doidge, W (1998). Seropositive Cases of Toxoplasmosis in Nunavik wildlife. Nunavik Research Centre, Makivik Corporation, Kuujjuaq.
- Leclair, D and Doidge, W (2001). Seroprevalence Survey for *Toxoplasma gondii* in Arctic Wildlife from Nunavik. Progress Report 12-349 submitted to Nunavik Regional Board of Health and Social Services. Nunavik Research Centre, Makivik Corporation, Kuujjuaq.
- Lehmann, T, Marcet, PL, Graham, DH, Dahl, ER and Dubey, JP (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11423-11428.
- Levesque, B, Messier, V, Bonnier-Viger, Y, Couillard, M, Cote, S, Ward, BJ, Libman, MD, Gingras, S, Dick, D and Dewailly, E (2007). Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59(3), 283-286.
- Lindsay, DS, Collins, MV, Mitchell, SM, Cole, RA, Flick, GJ, Wetch, CN, Lindquist, A and Dubey, JP (2003). Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50 Suppl, 687-688.
- Lindsay, DS, Collins, MV, Mitchell, SM, Wetch, CN, Rosypal, AC, Flick, GJ, Zajac, AM, Lindquist, A and Dubey, JP (2004). Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Parasitology*, 90(5), 1054-1057.
- Lindsay, DS and Dubey, JP (2009). Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *Journal of Parasitology*, 95(4), 1019-1020.
- Lindsay, DS and Dubey, JP (2011). *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. *Parasitology*, 138(14), 1829-1831.
- Ljungstrom, I, Gille, E, Nokes, J, Linder, E and Forsgren, M (1995). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* among pregnant women in different parts of Sweden. *European Journal of Epidemiology*, 11(2), 149-156.

- Malmsten, J, Jakubek, EB and Bjorkman, C (2011). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in moose (*Alces alces*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Sweden. *Veterinary Parasitology*, 177(3-4), 275-280.
- Mann, KH and Lazier, JRN (2006). *Dynamics of marine ecosystems biological-physical interactions in the oceans*. Blackwell Pub., Malden, MA. <http://www.knoval.com/knoval2/Toc.jsp?BookID=3398>.
- Marchiondo, AA, Duszynski, DW and Maupin, GO (1976). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals of New Mexico, Arizona and Colorado. *J Wildl Dis*, 12(2), 226-232.
- Maubon, D, Brenier-Pinchart, MP, Fricker-Hidalgo, H and Pelloux, H (2007). Real-time PCR in the diagnosis of toxoplasmosis: the way to standardisation? *Pathologie Biologie*, 55(6), 304-311.
- McAllister, MM (2005). A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of "subclinical" toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 132(3-4), 241-247.
- McDonald, JC, Gyorkos, TW, Alberton, B, MacLean, JD, Richer, G and Juranek, D (1990). An outbreak of toxoplasmosis in pregnant women in northern Quebec. *Journal of Infectious Diseases*, 161(4), 769-774.
- Measures, LN, Dubey, JP, Labelle, P and Martineau, D (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian pinnipeds. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(2), 294-300.
- Meerburg, BG and Kijlstra, A (2009). Changing climate-changing pathogens: *Toxoplasma gondii* in North-Western Europe. *Parasitol Res*, 105(1), 17-24.
- Mercier, A, Devillard, S, Ngoubangoye, B, Bonnabau, H, Banuls, AL, Durand, P, Salle, B, Ajzenberg, D and Darde, ML (2010). Additional Haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population Structure and Mouse-Virulence of Strains from Gabon. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 4(11).
- Messier, V, Levesque, B, Proulx, JF, Rochette, L, Libman, MD, Ward, BJ, Serhir, B, Couillard, M, Ogden, NH, Dewailly, E, Hubert, B, Dery, S, Barthe, C, Murphy, D and Dixon, B (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among Nunavik Inuit (Canada). *Zoonoses and Public Health*, 56(4), 188-197.
- Meyer, T and Wania, F (2008). Organic contaminant amplification during snowmelt. *Water Research*, 42(8-9), 1847-1865.
- Mikaelian, I, Boisclair, J, Dubey, JP, Kennedy, S and Martineau, D (2000). Toxoplasmosis in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence estuary: two case reports and a serological survey. *Journal of Comparative Pathology*, 122(1), 73-76.
- Miller, MA, Sverlow, K, Crosbie, PR, Barr, BC, Lowenstine, LJ, Gulland, FM, Packham, A and Conrad, PA (2001). Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. *Journal of Parasitology*, 87(4), 816-822.

- Miller, MA, Gardner, IA, Kreuder, C, Paradies, DM, Worcester, KR, Jessup, DA, Dodd, E, Harris, MD, Ames, JA, Packham, AE and Conrad, PA (2002). Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *International Journal for Parasitology*, 32(8), 997-1006.
- Miller, MA, Miller, WA, Conrad, PA, James, ER, Melli, AC, Leutenegger, CM, Dabritz, HA, Packham, AE, Paradies, D, Harris, M, Ames, J, Jessup, DA, Worcester, K and Grigg, ME (2008). Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1319-1328.
- Miller, MA, Byrne, BA, Jang, SS, Dodd, EM, Dorfmeier, E, Harris, MD, Ames, J, Paradies, D, Worcester, K, Jessup, DA and Miller, WA (2010). Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Veterinary Research*, 41(1), 13.
- Miller, NL, Frenkel, JK and Dubey, JP (1972). Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *Journal of Parasitology*, 58(5), 928-937.
- Miller, WA, Miller, MA, Gardner, IA, Atwill, ER, Byrne, BA, Jang, S, Harris, M, Ames, J, Jessup, D, Paradies, D, Worcester, K, Melli, A and Conrad, PA (2006). *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium perfringens*, and *Plesiomonas shigelloides* in marine and freshwater invertebrates from coastal California ecosystems. *Microb Ecol.*, 52(2), 198-206. Epub 2006 Aug 2008.
- More, G, Maksimov, P, Pardini, L, Herrmann, DC, Bacigalupe, D, Maksimov, A, Basso, W, Conraths, FJ, Schares, G and Venturini, MC (2012). *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. *Vet Parasitol.*, 184(2-4), 116-121. Epub 2011 Sep 2012.
- Mowat, G, Poole, KG and O'Donoghue, M (2000). Ecology of lynx in northern Canada and Alaska. In *Ecology and Conservation of Lynx in the United States* (eds. Ruggerio, LF, Aubry, KB, Buskirk, SW, Koehler, GM, Krebs, CJ, McKelvey, KS, and Squires, JR), pp. 265-306. University of Colorado Press, Boulder, Colorado.
- Mowat, G and Slough, B (2003). Habitat preference of Canada lynx through a cycle in snowshoe hare abundance. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 81(10), 1736-1745.
- Munday, BL (1972). Serological evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep. *Research in Veterinary Science*, 13(1), 100-102.
- Oksanen, A, Tryland, M, Johnsen, K and Dubey, JP (1998). Serosurvey of *Toxoplasma gondii* in North Atlantic marine mammals by the use of agglutination test employing whole tachyzoites and dithiothreitol. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 21(2), 107-114.

- Oksanen, A, Asbakk, K, Prestrud, KW, Aars, J, Derocher, AE, Tryland, M, Wiig, O, Dubey, JP, Sonne, C, Dietz, R, Andersen, M and Born, EW (2009). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in polar bears (*Ursus maritimus*) from Svalbard and East Greenland. *Journal of Parasitology*, 95(1), 89-94.
- Opsteegh, M, Langelaar, M, Sprong, H, den Hartog, L, De Craeye, S, Bokken, G, Ajzenberg, D, Kijlstra, A and van der Giessen, J (2010). Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 193-201. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.027.
- Opsteegh, M, Prickaerts, S, Frankena, K and Evers, EG (2011a). A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 150(2-3), 103-114.
- Opsteegh, M, Swart, A, Fonville, M, Dekkers, L and van der Giessen, J (2011b). Age-related *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch wild boar inconsistent with lifelong persistence of antibodies. *PLoS One*, 6(1), e16240. doi: 10.1371/journal.pone.0016240.
- Paul, V and Trudeau, C (2010). Bilan d'exploitation du lynx du Canada (*Felis lynx*) en Abitibi-Témiscamingue. Ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Rouyn-Noranda.
- Pena, HFJ, Gennari, SM, Dubey, JP and Su, C (2008). Population structure and mouse-irulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*, 38(5), 561-569.
- Peterson, DR, Cooney, MK and Beasley, RP (1974). Prevalence of antibody to *Toxoplasma* among Alaskan natives: relation to exposure to the felidae. *Journal of Infectious Diseases*, 130(6), 557-563.
- Petit, JG, Bonnier Viger, Y, Aatami, P and Iserhoff, A (2011). Les Inuit et les Cris du Nord du Québec. (ed. Québec, PdlUd), pp. 432.
- Philippa, JD, Leighton, FA, Daoust, PY, Nielsen, O, Pagliarulo, M, Schwantje, H, Shury, T, Van Herwijnen, R, Martina, BE, Kuiken, T, Van de Bildt, MW and Osterhaus, AD (2004). Antibodies to selected pathogens in free-ranging terrestrial carnivores and marine mammals in Canada. *Veterinary Record*, 155(5), 135-140.
- Pomares, C, Ajzenberg, D, Bornard, L, Bernardin, G, Haseine, L, Darde, ML and Marty, P (2011). Toxoplasmosis and Horse Meat, France. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7), 1327-1328.
- Prestrud, KW, Asbakk, K, Fuglei, E, Mork, T, Stien, A, Ropstad, E, Tryland, M, Gabrielsen, GW, Lydersen, C, Kovacs, KM, Loonen, MJ, Sagerup, K and Oksanen, A (2007). Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. *Veterinary Parasitology*, 150(1-2), 6-12.
- Prestrud, KW, Asbakk, K, Mork, T, Fuglei, E, Tryland, M and Su, C (2008). Direct high-resolution genotyping of *Toxoplasma gondii* in arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in the

- remote arctic Svalbard archipelago reveals widespread clonal Type II lineage. *Veterinary Parasitology*, 158(1-2), 121-128.
- Proulx, JF (1999). Protocole de prévention et de contrôle de la toxoplasmose congénitale au Nunavik. pp. 41. Régie régionale de la santé et des services sociaux Nunavik. http://www.rrsss17.gouv.qc.ca/santepub/pdf/Nunavik_Toxoplasmose_1999A.pdf.
- Rah, H, Chomel, BB, Follmann, EH, Kasten, RW, Hew, CH, Farver, TB, Garner, GW and Amstrup, SC (2005). Serosurvey of selected zoonotic agents in polar bears (*Ursus maritimus*). *Veterinary Record*, 156(1), 7-13.
- Rajendran, C, Su, C and Dubey, JP (2012). Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 359-368. Epub 2011 Dec 2029.
- Reichard, MV, Torretti, L, Garvon, JM and Dubey, JP (2008). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wolverines from Nunavut, Canada. *Journal of Parasitology*, 94(3), 764-765.
- Riedman, M (1990). The pinnipeds : seals, sea lions, and walruses, University of California Press, Berkeley.
- Robertson, LJ (2007). The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 120(3), 201-216.
- Rogel, G (2007). Développement et intégration au système de modélisation intégré GIBSI d'un modèle de transport et du devenir des coliformes fécaux d'origine agricole à l'échelle du bassin versant. Vol. Maître ès Sciences (M.Sc.) en Sciences de l'eau pp. 164. Université du Québec, Québec. <http://ete.inrs.ca/pub/theses/T000429.pdf>.
- Rousseau, AN, Savary, S and Konan, B (2008). Implantation du modèle HYDROTEL sur le bassin de la rivière Montmorency afin de simuler les débits observés et de produire des scénarios de crues du printemps pour l'année 2008. Centre Eau Terre et Environnement, Institut national de la recherche scientifique, Québec.
- Ryser-Degiorgis, MP, Jakubek, EB, af Segerstad, CH, Brojer, C, Morner, T, Jansson, DS, Lunden, A and Uggla, A (2006). Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-ranging Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from Sweden. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(1), 182-187.
- Sampasa-Kanyinga, H, Levesque, B, Anassour-Laouan-Sidi, E, Cote, S, Serhir, B, Ward, BJ, Libman, MD, Drebot, MA, Ndao, M and Dewailly, E (2012). Zoonotic Infections in Native Communities of James Bay, Canada. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. doi: 10.1089/vbz.2011.0739.
- Scallan, E, Hoekstra, RM, Angulo, FJ, Tauxe, RV, Widdowson, MA, Roy, SL, Jones, JL and Griffin, PM (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7-15.

- Sekla, L, Stackiw, W and Rodgers, S (1981). A serosurvey of toxoplasmosis in Manitoba. *Canadian Journal of Public Health*, 72(2), 111-117.
- Shapiro, K, Largier, J, Mazet, JA, Bernt, W, Ell, JR, Melli, AC and Conrad, PA (2009). Surface properties of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1185-1191.
- Shapiro, K, Conrad, PA, Mazet, JA, Wallender, WW, Miller, WA and Largier, JL (2010). Effect of estuarine wetland degradation on the transport of *Toxoplasma gondii* surrogates from land to sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6821-6828.
- Shapiro, K, Miller, M and Mazet, J (2012a). Temporal association between land-based runoff events and california sea otter (*enhydra lutris nereis*) protozoal mortalities. *J Wildl Dis.*, 48(2), 394-404.
- Shapiro, K, Silver, MW, Largier, JL, Conrad, PA and Mazet, JAK (2012b). Association of *Toxoplasma gondii* oocysts with fresh, estuarine, and marine macroaggregates. *Limnology and Oceanography*, 57(2), 449-456.
- Smith, DD and Frenkel, JK (1995). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. *Journal of Wildlife Diseases*, 31(1), 15-21.
- Smith, JE (2009). Tracking transmission of the zoonosis *Toxoplasma gondii*. *Advances in Parasitology*, 68, 139-159.
- Sorensen, KK, Mork, T, Sigurdardottir, OG, Asbakk, K, Akerstedt, J, Bergsjo, B and Fuglei, E (2005). Acute toxoplasmosis in three wild arctic foxes (*Alopex lagopus*) from Svalbard; one with co-infections of *Salmonella Enteritidis* PT1 and *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 2b. *Research in Veterinary Science*, 78(2), 161-167.
- Sroka, J, Wojcik-Fatla, A and Dutkiewicz, J (2006). Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 13(1), 169-175.
- Sroka, J, Wojcik-Fatla, A, Szymanska, J, Dutkiewicz, J, Zajac, V and Zwolinski, J (2010). The Occurrence of *Toxoplasma Gondii* Infection in People and Animals from Rural Environment of Lublin Region - Estimate of Potential Role of Water as a Source of Infection. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 17(1), 125-132.
- Stewart, JR, Gast, RJ, Fujioka, RS, Solo-Gabriele, HM, Meschke, JS, Amaral-Zettler, LA, del Castillo, E, Polz, MF, Collier, TK, Strom, MS, Sinigalliano, CD, Moeller, PDR and Holland, AF (2008). The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environmental Health*, 7.
- Stieve, E, Beckmen, K, Kania, SA, Widner, A and Patton, S (2010). *Neospora Caninum* and *Toxoplasma Gondii* Antibody Prevalence in Alaska Wildlife. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(2), 348-355.

- Su, C, Evans, D, Cole, RH, Kissinger, JC, Ajioka, JW and Sibley, LD (2003). Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, 299(5605), 414-416.
- Tanner, CE, Staudt, M, Adamowski, R, Lussier, M, Bertrand, S and Prichard, RK (1987). Seroepidemiological study for five different zoonotic parasites in northern Quebec. *Canadian Journal of Public Health*, 78(4), 262-266.
- Tenter, AM, Heckeroth, AR and Weiss, LM (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1217-1258.
- Tenter, AM (2009). *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 364-369.
- Thorp, JH, Covich, AP and ScienceDirect (Online service) (2010). Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. In *Aquatic ecology series Academic Press, Amsterdam ; Boston*. <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123748553>.
- Tizard, IR, Fish, A and Quinn, JP (1976). Some observations on the epidemiology of toxoplasmosis in Canada. *Journal of Hygiene*, 77(1), 11-21.
- Turcotte, R, Rousseau, AN, Fortin, JP and Villeneuve, JP (2003). Development of a process-oriented, multiple-objective, hydrological calibration strategy accounting for model structure. In *Advances in Calibration of Watershed Models, Water Science & Application, Vol. 6* (eds. Duan, Q, Sorooshian, S, Gupta, H, Rousseau, AN, and Turcotte, R), pp. 153-163.
- Turcotte, R, Fortin, LG, Fortin, V, Fortin, JP and Villeneuve, JP (2007). Operational analysis of the spatial distribution and the temporal evolution of the snowpack water equivalent in southern Québec, Canada. *Nordic Hydrology*, 38(3), 211-234.
- USEPA (2005). Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. Vol. EPA 815-R-05-002 pp. 76. Office of Water.
- Viens, P, Auger, P, Villeneuve, R and Stefanescu-Soare, I (1977). Serological survey for congenital toxoplasmosis among 4,136 pregnant women. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(2), 136-139.
- Vikoren, T, Tharaldsen, J, Fredriksen, E and Handeland, E (2004). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild red deer, roe deer, moose, and reindeer from Norway. *Veterinary Parasitology*, 120(3), 159-169.
- Villena, I, Aubert, D, Gomis, P, Ferte, H, Inglard, JC, Denis-Bisiaux, H, Dondon, JM, Pisano, E, Ortis, N and Pinon, JM (2004). Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4035-4039.
- Villena, I, Ancelle, T, Delmas, C, Garcia, P, Brezin, AP, Thulliez, P, Wallon, M, King, L, Goulet, V, Network, T and Toxoplasmosis, NRC (2010). Congenital toxoplasmosis

- in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Eurosurveillance*, 15(25), 14-19.
- Vyas, A, Kim, SK, Giacomini, N, Boothroyd, JC and Sapolsky, RM (2007). Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), 6442-6447.
- Wallace, GD, Marshall, L and Marshall, M (1972). Cats, rats, and toxoplasmosis on a small Pacific island. *American Journal of Epidemiology*, 95(5), 475-482.
- Whitman, RL, Przybyla-Kelly, K, Shively, DA, Nevers, MB and Byappanahalli, MN (2008). Sunlight, season, snowmelt, storm, and source affect *E. coli* populations in an artificially ponded stream. *Science of the Total Environment*, 390(2-3), 448-455.
- Woo, M-K (1993). Northern Hydrology. In *Canada's cold environments* (eds. French, HM, and Slaymaker, O), pp. 117-142. McGill-Queen's University Press, Montréal ; Buffalo.
- Yolken, RH, Dickerson, FB and Fuller Torrey, E (2009). *Toxoplasma* and schizophrenia. *Parasite Immunology*, 31(11), 706-715.
- Zarnke, RL, Dubey, JP, Kwok, OCH and Hoef, JMV (1997). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in grizzly bears from Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(2), 267-270.
- Zarnke, RL, Dubey, JP, Kwok, OC and Ver Hoef, JM (2000). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in selected wildlife species from Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(2), 219-224.
- Zarnke, RL, Dubey, JP, Ver Hoef, JM, McNay, ME and Kwok, OC (2001). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in lynx from interior Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), 36-38.
- Zhu, ZX, Broersma, K and Mazumder, A (2011). Model Assessment of Cattle and Climate Impacts on Stream Fecal Coliform Pollution in the Salmon River Watershed, British Columbia, Canada. *Water Air and Soil Pollution*, 215(1-4), 155-176.

