Année 2007

THESE
Présentée à
L'Université de Reims Champagne Ardenne
UFR Sciences Exactes et Naturelles

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Reims Champagne Ardennes

Spécialité : Ecologie parasitaire
Ecole Doctorale « Sciences, Technologie, Santé » (ED 358)

Soutenue publiquement le 11 décembre 2007
par

Eve AFONSO

ETUDE DE LA DYNAMIQUE DE LA TRANSMISSION DE *TOXOPLASMA GONDII* DANS DES MILIEUX CONTRASTES

Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558
2C2A-CERFE, Centre de Formation et de Recherche en Eco-éthologie
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA3800

Membres du jury :

Jacques CABARET (Directeur de recherche, INRA, Tours)	Rapporteur
Peter DEPLAZES (Professeur, Université de Zürich)	Rapporteur
Isabelle VILLENA (Professeur, Université de Reims)	Examinateur
Marie-Lazarine POULLE (Chargée de mission, 2C2A-CERFE)	Directeur de thèse
Emmanuelle GILOT-FROMONT (Maître de conférence, Université Lyon1)	Co-directeur de thèse

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude de la dynamique de la transmission d'un parasite à cycle complexe, *Toxoplasma gondii*, dans des milieux contrastés. Dans une première partie, la dynamique de la transmission du parasite est étudiée dans un site urbain abritant une population très dense de chats domestiques (*Felis catus*). Nos travaux permettent de poser l'hypothèse d'un cycle de transmission parasitaire simple lorsque les hôtes intermédiaires sont en densité très faible relativement à celle des chats. Par ailleurs, nous mettons en évidence l'existence de zones de contamination du sol par les oocystes de *T. gondii*, qui sont très localisées, et qui correspondent aux zones de défécation communes des chats. Dans une deuxième partie, la variabilité de la dynamique de transmission de *T. gondii* dans les milieux riches en hôtes intermédiaires est abordée. Nous mettons notamment en évidence des indicateurs de la variabilité interspécifique du niveau d'infection chez les hôtes intermédiaires (masse corporelle spécifique et habitat). Par ailleurs, nous montrons qu'il existe des relations entre la composition de l'environnement, la variabilité du climat, et le niveau d'infection de la toxoplasmose chez le chat domestique et le chat forestier (*Felis silvestris*). L'ensemble du travail montre l'intérêt d'une approche éco-épidémiologique dans la compréhension de la variabilité du cycle de *T. gondii*, notamment par l'utilisation du suivi à long terme de plusieurs populations de chats vivant dans différents environnements. Il ouvre la voie à différentes perspectives de recherche, tant sur le plan appliqué (amélioration de la détection d'oocystes) que sur un aspect de modélisation.

Mots-clés : *Toxoplasma gondii*, cycle complexe, transmission, chat domestique, hôtes intermédiaires, milieux contrastés.

Abstract

We studied the dynamic of the transmission of a parasite with complex life-cycle, *Toxoplasma gondii*, in contrasted environments. First, the dynamic of the parasite transmission was studied in an urban area where a population of domestic cats (*Felis catus*) live at high density. Our results raise the hypothesis that the parasite transmission could occur via a simple life-cycle when intermediate hosts are in very low density, relative to cats. We also highlighted the presence of localised areas contaminated by *T. gondii* oocysts, which correspond to defecation site of cats. Second, we studied the dynamic of the transmission of *T. gondii* in environments where intermediate hosts are in high density. We found indicators of the interspecific variability in the level of infection of intermediate hosts, such as body mass or habitat. Moreover, we showed that environment composition, climate fluctuations and the level of infection of toxoplasmosis in domestic cats and wildcats (*Felis silvestris*) could be related. The whole study shows the interest of an eco-epidemiological approach to understand the variability of the life-cycle of *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, complex life-cycle, transmission, domestic cat, intermediate hosts, contrasted environements.

Remerciements

Je remercie sincèrement les personnes qui ont encadré et évalué ce travail.

Emmanuelle Gilot-Fromont m'a donné la chance d'effectuer un travail passionnant sur une parasitose. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour m'avoir guidée et formée, et pour avoir toujours exigé le meilleur de moi. Je la remercie également de m'avoir laissé une grande autonomie et une précieuse indépendance dans mes prises d'intitatives (parfois farfelues), mes mouvements et mes réflexions.

Marie-Lazarine Poulle a co-dirigé ce travail. Qu'elle soit assurée de ma gratitude pour son investissement dans l'étude, et notamment pour avoir entrepris de me transmettre son expérience du terrain et ses talents de rédaction. Je suis heureuse d'avoir pu bénéficier de ses points de vue critiques, de son enthousiasme et de sa générosité.

Rémi Helder m'a accueillie au sein du 2C2A-CERFE, et a fait d'une poignée de thésards venus des quatre coins de la France, une équipe enthousiaste et solidaire. Je le remercie sincèrement.

Isabelle Villena et Dominique Aubert m'ont chaleureusement accueillie au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Reims. Je les remercie pour leur implication dans mes travaux, pour leur disponibilité et leurs discussions concernant les expérimentations en laboratoire. Je remercie sincèrement Isabelle Villena d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Jacques Cabaret a également évalué ce travail de thèse. Je le remercie d'avoir apporté à ce travail son point de vue et son esprit critique.

I sincerely thank Peter Deplazes for the honour he made me in accepting to evaluate this work.

Je remercie la Région Champagne-Ardenne, le laboratoire Grünenthal, et la communauté de commune de l'Argonne Ardennaise pour leur soutien financier, qui m'a permis de me consacrer entièrement à la recherche durant ces trois années.

Je remercie également tous ceux que j'ai pu côtoyer, de près ou de loin, et qui ont contribué à la motivation ou la réflexion dans mon travail, ou simplement à rendre ces quelques années inoubliables.

Philippe Thulliez, Marie-Laure Dardé, Muriel Rabilloud et Aurélien Dumètre ont été présents lors des comités de thèse et ont aidé à la réflexion de ces travaux. Je les remercie sincèrement. Merci à Phillipe pour l'organisation des analyses sérologiques des centaines de sérums de chats !

Dominique Pontier, Sébastien Devillard et Ludovic Say ont été d'une aide précieuse au moment de la relecture de mes travaux. Je les remercie pour leur aide, leurs conseils, et les discussions qui ont suivi. Je remercie également l'ensemble de l'équipe Ecologie Evolutive des Populations, ainsi que François Debias et de nombreux étudiants de passage, pour leur mobilisation lors des captures de chats.

J'adresse toutes ma reconnaissance à Daniel Chessel, qui a su m'ouvrir les portes du monde des statistiques.

J’ai également une pensée pour Mélissa Lemoine, qui m’a donné de précieux coups de main sur le terrain et au laboratoire. Merci également à Marie-Caroline Ravat pour ses investigations sur les crottiers de la Croix-Rousse, et à Maud Lélu pour avoir posé un œil neuf sur mes travaux avant de reprendre le flambeau.

Je remercie le personnel du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Reims, qui m’a toujours accueillie avec beaucoup de gentillesse, malgré la pagaille que je répandais sur leurs paillasses, et plus particulièrement Francine Marnef, Régine Geers et Eric Pisano. Ils ont su me prodiguer aide et conseils lorsque j’en avais besoin.

La « pièce 60 » du laboratoire de Biométrie de Lyon a été mon environnement de travail pendant ces quelques années. Ah, ce bureau étrange, un mélange de rires et de coup de gueules, probablement dus à la forte proximité que nous ont imposé les lieux. Une chance ? Nous avons fini par former un groupe, une équipe, dont tous les membres étaient indispensables. Je remercie donc Emilie, Micheline, Vincent, Pierrick, Stéphanie, Gaelle, Jodie, Mathieu, et Bram sans qui ces quelques années n’auraient assurément pas été les mêmes !

Les étudiants extérieurs au bureau n’en ont pas moins été importants. Je remercie donc Marie, Etienne, Arnaud, et Patrice qui ont su apporter écoute, fantaisie, et divertissements.

Et puis il y a le 2C2A-CERFE, amoureux de la nature, passionnés installés au milieu de la campagne ardennaise, équipe soudée et solidaire, véritable bouffée d’oxygène face aux longs mois passés à Lyon. Pour toutes les discussions, les moments passés sur le terrain, les soirées arrosées autour de la table, je les remercie tous sincèrement ! Quelle chance d’avoir parcouru un bout de chemin avec vous !

J’adresse plus particulièrement mes remerciements à Estelle Germain, avec qui j’ai eu la chance de collaborer pour l’étude de la toxoplasmose chez le chat forestier. Je la remercie de m’avoir initiée au radio-pistage des chats, au thé à la mûre et au pain d’épice bio ! Qu’elle soit assurée de ma considération et de mon amitié.

Je remercie également Sandrine Ruette et François Léger pour l’organisation de la récolte des cadavres des chats forestiers et pour nous avoir accueillies à l’ONCFS de Birieux pour les autopsies.

Enfin, il y a les proches, ceux qui nous voient de l’extérieur et ne comprennent pas toujours très bien où l’on est, ni pourquoi.

Je remercie ma famille, pour son soutien et ses encouragements. Ma mère, qui m’a inondée de leurs nouvelles, a largement contribué à effacer le mal du pays et de la famille dans les moments difficiles.

Un grand merci à mes ami(e)s, particulièrement à Cécile et Lydie, pour m’avoir encouragée, et pour leur indulgence face à la désociabilisation qu’implique la thèse.

Enfin, je remercie Alexandre d’avoir toujours montré son soutien et son intérêt dans mes travaux. Je me rappelle notamment de lui creusant des trous pour attraper des campagnols en plein hiver, ou photographiant les chats de la Croix Rousse sous la pluie…Je pense à notre Lili qui a su nous montrer qu’un félin n’est pas toujours gentil, doux et agréable !

Il y a dans la nature un certain nombre de choses où la beauté et l'utilité, la perfection esthétique et la perfection technique se combinent de façon incompréhensible. Citons : la toile d'araignée, l'aile de la libellule, le corps profilé du dauphin et les mouvements du chat. Dessinés par un chorégraphe de génie, composés sous la pression même de la lutte pour l'existence (le plus rigoureux des impératifs), ils ne pourraient être ni plus beaux ni plus fonctionnels. Et l'animal semble avoir conscience de cette beauté, car il est évident qu'il s'en délecte, qu'il les accomplit pour l'amour de leur propre perfection. Il en fait un jeu qui occupe une place toute particulière dans la vie de l'arbitre des élégances animales.

KONRAD LORENZ
Tous les chiens, tous les chats
« Jeux de chats »

Table des matières

Résumé 3
Abstract 4
Remerciements 5
Table des matières 9
Table des figures 12
Liste des tables 14
Liste des abbréviations 15
Principales publications et communications sur le sujet 16
Avant-propos 17

Première partie : Introduction générale 21

1.1. Maladies infectieuses et environnement 23
1.1.1. Maladies infectieuses et parasitaires transmissibles entre espèces : un sujet de société 23
1.1.2. Parasite et parasitisme 25
1.1.3. Ecologie de la transmission des parasites 26

1.2. Environnement et transmission parasitaire 29
1.2.1. Composition du paysage et survie des parasites 29
1.2.2. Composition du paysage et transmission parasitaire 29
1.2.3. Milieu urbain et écologie de la transmission parasitaire 32
1.2.4. Variabilité de l'environnement et cycles parasitaires 37

1.3. Modèle d'étude : *Toxoplasma gondii* 40
1.3.1. Cycle et formes parasitaires 40
1.3.2. Toxoplasmose chez l'hôte définitif : symptômes et immunité 43
1.3.3. Etat des connaissances épidémiologiques de la toxoplasmose 45
1.3.4. Phase clonale et phase sexuée dans le cycle de *Toxoplasma gondii* 46

1.4. Distribution et contamination des espèces hôtes 51
1.4.1. Chat domestique et chat forestier 51
1.4.2. Hôtes intermédiaires 54
1.4.3. Méthodes de diagnostic de la toxoplasmose chez l'animal 56

1.5. Contamination de l'environnement par les oocystes de *Toxoplasma gondii* 59
1.5.1. Présence et survie des oocystes dans l'eau 59
1.5.2. Présence et survie des oocystes dans le sol 61
1.5.3. Survie des oocystes et variations spatio-temporelles de la prévalence 62

1.6. Objectifs de l'étude et hypothèses testées 64
1.6.1. Milieu avec faible densité d'hôtes intermédiaires 64
1.6.2. Milieux avec forte densité d'hôtes intermédiaires 66

Deuxième partie : Dynamique de la transmission de la toxoplasmose dans une population urbaine de chats domestiques 69

2.1. Introduction 71
2.1.1. Le chat en milieu urbain 71
2.1.2. Les risques de zoonoses dues aux chats urbains 72
2.1.3. La toxoplasmose en milieu urbain 72
2.1.4. Objectifs 74

2.2. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). 77

2.3. Spatial distribution of soil contamination by Toxoplasma gondii in relation to cat defecation behaviour in an urban area 101

2.4. Conclusions 119
2.4.1. Méthodes utilisées 119
2.4.2. Séroprévalence et incidence chez les chats de l'hôpital de la Croix-Rousse 121
2.4.3. Facteurs associés à la séroprévalence 122
2.4.4. Titres en anticorps 123
2.4.5. Distribution spatiale de la contamination environnementale 123
2.4.6. Conclusion 124

Troisième partie : Dynamique de la transmission de *Toxoplasma gondii* dans les milieux riches en hôtes intermédiaires 127

3.1. Introduction 129
3.1.1. Exposition des prédateurs : toutes les proies ne sont pas équivalentes 129
3.1.2. Diversité des populations prédatrices 131
3.1.3. Séroprévalence chez l'hôte définitif 133
3.1.4. Objectifs et hypothèses 135

3.2. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in small mammals from the Ardennes region, France. 137

3.3. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey are equal. 145

3.4. Factors influencing the seroconversion to anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in rural cats (*Felis catus*) in France 165

3.5. Spatio-temporal variability in the prevalence of *Toxoplasma gondii* in definitive hosts in rural areas in France 183

3.6. Conclusions: 201
3.6.1. Niveaux d'infection chez les hôtes intermédiaires : 201
3.6.2. Différentes échelles de variabilité chez l'hôte définitif 203
3.6.3. Variabilité du climat et toxoplasmose féline 205
3.6.4. Conclusions 206

Quatrième partie : Discussion générale 209

4.1. Limites de l'étude et améliorations 211
4.1.1. Constitution et représentativité des échantillons de chats 211
4.1.2. Périodes de réalisation des sessions de captures 212
4.1.3. Méthode sérologique 212
4.1.4. Durée de l'étude 213
4.1.5. Analyse des données 214

4.2. Environnement et variabilité du cycle de *Toxoplasma gondii* : principaux résultats des travaux 216
4.2.1. Variabilité de la toxoplasmose chez les hôtes intermédiaires 217
4.2.2. Environnement et variabilité de la contamination chez l'hôte définitif 222
4.2.3. Variations spatio-temporelles de la toxoplasmose chez le chat 224
4.2.4. Contamination environnementale 227
4.2.5. Existe-t-il un profil de chat à risque ? 227
4.2.6. Phase clonale et phase sexuée : quelle importance relative en fonction de l'environnement ? 229
4.2.7. Quels sont les risques pour l'homme ? 230

4.3. Axes de réflexion : 232
4.3.1. Risques d'exposition aux zoonoses : faut-il nourrir les chats en ville ? 232
4.3.2. Réchauffement climatique et toxoplasmose : quel scénario envisager ? 234
4.3.3. Va-t-on vers une spécialisation des souches de *Toxoplasma gondii* en fonction de l'environnement ? 235

4.4. Perspectives 237

Conclusion générale 241

Références bibliographiques 245

Table des figures

Figure 1.1. Combinaisons d'ouverture/fermeture des filtres de rencontre (R) et de compatibilité (C). 27
Figure 1. 2. Variables qui conditionnent l'ouverture et la fermeture des filtres de rencontre et de compatibilité entre le parasite (P) et l'hôte (H). 28
Figure 1. 3. Répartition des rongeurs en fonction de la fermeture du milieu en zones rurales françaises. ..... .30
Figure 1. 4. Distribution des catégories d'espèces et richesse spécifique selon le gradient d'urbanisation. 33
Figure 1. 5. Présence d'hôtes carnivores en forte densité en milieu urbain. 34
Figure 1. 6. Facteurs affectant le cycle d'*Echinococcus multilocularis* et les risques de contamination de l'homme par les œufs d'*Echinococcus multilocularis*..... 37
Figure 1.7. Type de transmission parasitaire privilégié en fonction de la densité relative d'hôtes intermédiaires et définitifs. 38
Figure 1. 8. Photographies de *Toxoplasma gondii* 40
Figure 1. 9. Cycle de *Toxoplasma gondii*..... 41
Figure 1. 10. Voies de transmission de *Toxoplasma gondii*..... 43
Figure 1.11. Séries de dilution de sérum dans une plaque pour une analyse sérologique des anticorps anti-*Toxoplasma gondii* ……..57
Figure 1. 12. Objectifs de l'étude aux différentes échelles de perception..... 65

Chapitre 2.2 :

Figure 1. Population size and number of captures for each capture session. 87
Figure 2. Factorial map of the first two axes of the fuzzy correspondence analysis..... 89
Figure 3. Prevalence of *Toxoplasma gondii* for each capture session..... 90
Figure 4. Relationship between age of cats and seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Croix-Rousse population. 91
Figure 5. Influence of maximal temperature (*Tmax*) and rain (*Rain*) on the probability of cats being antibody-positive for *Toxoplasma gondii*..... 93

Chapitre 2.3 :

Figure 1. Location of feeding (1-5) and defacation (A-P) sites recorded at the Croix-Rousse Hospital in November 2005. ……...…110

Chapitre 3.3 :

Figure 1. Linear relationship between antibody prevalence for *T. gondii* (arcsine square root-transformed) and body mass (log-transformed) in rodents and lagomorphs (data from Table I). 152
Figure 2. Observed seroprevalence of *T. gondii* in Kerguelen cats for four age classes..... 156
Figure 3. Predicted relationship between age and seroprevalence at RATMANOFF (grey line) and OTHER sites (black line).. 157

Chapitre 3.4 :

Figure 1. Location of the study sites in France. ……...…….170
Figure 2. Maximum temperatures and mean precipitations observed during the 1991-2005 period in the studied populations. ……...…….171
Figure 3. Seroprevalence of cats adjuste on age in villages and farms of the studied populations. …….174

Figure 4. Predictions of the final model for free-roaming cats. 177

Chapitre 3.5 :

Figure 1. Inter-annual variations in serprevalence in cats standardized on age (bars) and observed values of NAO winter index (full line) during the study period. ……..191
Figure 2. Predicted relationship between log-transformed number of farms and the probability of being infected. ……..……...……192

Figure 4. 1. Facteurs influençant le cycle de transmission de *Toxoplasma gondii*. 216
Figure 4. 2. Facteurs déterminant la prévalence chez les hôtes de *T. gondii* rongeurs et lagomorphes à l'échelle de l'espèce. 217
Figure 4. 3. Répartition des hôtes intermédiaires en milieu rural et zones de risque maximal d'infection à *Toxoplasma gondii* pour les chats domestiques et les chats forestiers. 221
Figure 4.4. Prévalences brutes des anticorps anti-*Toxoplasma gondii* dans les différentes populations étudiées (1996-2004). 226

Liste des tables

Tableau II.1. Prévalence des anticorps anti-*Toxoplasma gondii* chez le chat domestique en milieu urbain.…….……...73

Chapitre 2.2
Table I. Selected model to explain antibody titers from 60 individuals that seroconverted between 1993 and 2004. ……...88
Table II. Variables associated with seropositivity for *Toxoplasma gondii* in domestic cats and parameters of the chosen model. ……..92

Chapitre 2.3
Table I. Number of distilled water (1 mL) or soil (10g) samples found to be positive for three strains of *Toxoplasma gondii* using PCR following experimental inoculation. ……....109
Table II. Characteristics of cat defecation sites and number of positive soil samples for *Toxoplasma gondii*. ……110

Chapitre 3.2
Table I. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in 218 small mammals trapped in the Ardennes (France), as determined by the modified agglutination test……..……..141

Chapitre 3.3
Table I. Mean prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and body mass of various rodents and lagomorphs. …….153
Table II. Number of cats captured at less than 1 year of age and seroposivity for *Toxoplasma gondii* in Kerguelen sites. ……...155
Table III. Variables associated with seropositivity for *Toxoplasma gondii* in Kerguelen cats……..156

Chapitre 3.4
Table I. Number (and %) of cats in each age class in the studied populations. ……...173
Table II. Main characteristics of the studied populations. …….175
Table III. Variables associated with seropositivity for *Toxoplasma gondii* in cats and parameters of the chosen model. ……176

Chapitre 3.5
Tableau I. Variables associated with seropositivity for *Toxoplasma gondii* in cats and parameters of the chosen model. 192
Tableau II. Distribution of the number of small mammals items in stomach of cats according to the serological status of cats for toxoplasmosis. 193

Tableau IV.1. Caractéristiques des différentes populations de chats domestiques étudiées.223

Liste des abbréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
PCR	Polymerase Chain Reaction
HIV	Virus d'Immunodéficience Humaine
FIV	Virus d'Immunodéficience Féline
FeLV	Virus Leucémogène Félin
IgG	Immunoglobuline G
SFDT	Sabine Feldman Dye Test
MAT	Modified Agglutination Test
IHAT	Indirect Haemagglutination Test
LAT	Latex Agglutination Test
NAO	North Atlantic Oscillations
IFAT	Indirect Immunofluorescent Antibody Test
LCR	Lyon Croix-Rousse
BLC	Barisey-La-Côte
STJ	Saint Just Chaleyssin
AIM	Aimargues
KER	Kerguelen
KER(RAT)	Kerguelen (Ratmanoff)

Principales publications et communications sur le sujet

Publications

Afonso, E., Thulliez, P., & Gilot-Fromont, E. 2006. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *International Journal For Parasitology* 36 (13), 1373-1382.

Afonso, E., Thulliez, P., Pontier, D., & Gilot-Fromont, E. 2007. Toxoplasmosis in prey species and consequences on prevalence in cats: not all preys are equal. *Parasitology* 134 (4), 1963-1971.

Afonso, E., Poulle, M.L., Lemoine, M., Villena, I., Aubert, D., & Gilot-Fromont., E. 2007. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Small Mammals from the Ardennes (France). *Folia Parasitologica* 54 (4), 313-314.

Afonso, E., Lemoine, M., Poulle, M.-L., Ravat, M.-C., Romand, S., Thulliez, P., Villena, I., Aubert, D., Riche, B., Rabilloud, M., and Gilot-Fromont, E. Spatial distribution of soil contamination by Toxoplasma gondii in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *International Journal for Parasitology*, In Press.

Afonso, E., Thulliez, P., Gilot-Fromont, E. Variability of the dynamics of toxoplasmosis in natural populations of cats living in rural environment. Manuscrit en cours de preparation.

Afonso, E., Germain, E., Poulle, M.-L., Villena, I., Aubert, D., and Gilot-Fromont, E. Toxoplasmosis in wildcats (*Felis silvestris*) in the North Eastern of France. Manuscrit en cours de preparation.

Communications

Afonso E., Romand S., Lemoine M., Thulliez P., et Fromont E. 2005. Toxoplasmose dans une population urbaine de chats domestiques et estimation du risque de contamination du sol. Communication orale. Congrès de la Société Française de Parasitologie, 25-26 mai 2005, Besançon, France.

Afonso E., Thulliez P., et Fromont E. 2005. Variability of the dynamics of toxoplasmosis in natural populations of cats living in contrasted environments. Communication affichée présentée au « Eighth International Congress on Toxoplasmosis», 27-31 mai 2005, Porticcio, France.

Gilot-Fromont E., Afonso E., Thulliez P. 2006. Variability of the epidemiology of *Toxoplasma gondii* in cats living incontrasted environments and consequences on human risk. Communication orale et affichée présentée au colloque Toxofood, 8-10 mai 2006, Palerme, Italie.

Afonso E., Lemoine M., Romand S., Aubert D., Ravat M.C., Thulliez P., Villena I., Riche B., Rabilloud M., & **Gilot-Fromont E**. 2006. Estimation of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in a urban area: preliminary results. Communication orale présentée à International Workshop on Protozoa, 14-15 décembre 2006, Tours, France.

Avant-propos

Que ce soit un virus qui envahit un organisme, un ver qui se loge dans les intestins d'un chien (*Canis familiaris*), une femelle de coucou gris (*Cuculus canorus*) qui dépose ses œufs dans le nid d'un autre oiseau, ou encore un lion (*Panthera leo*) qui vole le butin de chasse d'une hyène tachetée (*Crocuta crocuta*), la vaste majorité des êtres vivants vit aux dépens d'autres êtres vivants (Hudson et al., 2002). Les association interspécifiques qui se maitiennent dans le temps sont infiniment nombreuses dans le monde vivant. Price (1980) remarque que tous les êtres vivants sont concernés par le parasitisme, soit en tant qu'hôtes, soit en tant que parasites. Hôtes et parasites sont liés par un réseau d'interactions allant de l'infiniment petit (mécanismes moléculaires déployés par l'hôte et le parasite pour se combattre) au plus large (dynamique des populations d'hôtes et structuration des communautés animales). Ces interactions se répartissent sur des échelles temporelles variables, allant du moment de l'infection de l'hôte jusqu'aux phénomènes de co-existence et de co-évolution entre l'hôte et le parasite (Hudson et al., 2002).

C'est pourquoi de nombreuses disciplines étudient les parasites, ou les systèmes hôtes-parasite d'une façon générale : parasitologie, biologie moléculaire, génétique, immunologie, ou encore dynamique des populations, éthologie ou écophysiologie. L'étude des relations hôte-parasite dans l'environnement nécessite une approche intégrée, prenant en compte les caractéristiques de l'hôte, du parasite et de l'environnement : c'est le domaine de l'éco-épidémiologie, qui vise plus particulièrement à étudier les facteurs environnementaux déterminant la répartition des maladies dans l'espace et dans le temps.

Or, l'environnement connaît depuis le XXe siècle une mutation drastique et irréversible, se traduisant notamment par la concentration de la population humaine dans les villes (la population française installée dans les villes est passée de 53% à 75% entre 1936 et 1999 ; IFEN, 2006), et la modification des paysages au profit de l'intensification de l'agriculture (McKinney, 2002). Certaines espèces, particulièrement sensibles aux perturbations de leur environnement, ont disparu des zones colonisées par l'homme, tandis que les espèces pouvant mener une vie commensale à l'homme se sont développées, bouleversant la structure même des communautés animales (Bradley & Altizer, 2006).

Dans ce contexte, notre étude a pour objectif de déterminer les facteurs de variations de la dynamique de transmission d'un parasite généraliste, *Toxoplasma gondii*. Ce parasite, que l'on retrouve chez tous les animaux homéothermes dans le monde, a comme hôte définitif

principal le chat domestique (*Felis catus*). Or, les populations de chats domestiques, qui ont suivi l'homme dans la colonisation du monde, se sont installées dans des environnements variés présentant différentes caractéristiques environnementales (composition du paysage, couverture végétale, climat, etc…) et différentes communautés d'hôtes. Nous nous sommes ici intéressés à l'étude de la transmission du cycle de *Toxoplasma gondii* dans des environnements contrastés, certains offrant des cas particuliers, comme le milieu urbain pauvre en hôtes intermédiaires ou le milieu insulaire extrême des îles subantarctiques offrant une abondance d'hôtes intermédiaires chassés activement par des chats domestiques retournés à l'état sauvage.

Une partie de cette thèse s'appuie sur l'analyse de données issues du suivi de populations de chats domestiques qui a été initié en 1982 par Dominique Pontier et est poursuivi aujourd'hui par l'équipe Ecologie Evolutive des Populations du laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive de Lyon (UMR CNRS 5558). Depuis 2003, j'ai pu moi-même contribuer à la capture et aux manipulations des chats dans ces différentes populations, à l'exception de celle des îles Kerguelen. Les prélèvements sanguins des chats domestiques ont été analysés par l'Institut de Puériculture de Paris. Depuis 2004, j'ai entrepris l'étude en laboratoire et en milieu naturel de la contamination du sol par les oocystes de *Toxoplasma gondii*, en collaboration avec le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Reims. Enfin, cette thèse a été effectuée en co-tutelle entre le laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (Lyon), et le 2C2A-CERFE (Boult-aux-Bois), où j'ai passé neuf mois durant les trois ans qu'aura duré mon travail de thèse. Avec la collaboration de l'équipe du 2C2A-CERFE, j'ai pu organiser, en 2005 et en 2006, la capture de micro-mammifères dans les forêts et prairies Ardennaises.

Ce mémoire se présente en quatre parties. Il s'articule autour de six articles, parus, acceptés ou en cours de préparation, qui constituent chacun un chapitre de la thèse. Les six articles ont été regroupés dans la deuxième et la troisième partie de ce mémoire. Ils sont précédés d'une introduction rappelant le contexte théorique de notre étude, et sont suivis d'une discussion reprenant les principaux résultats des articles et les commentant.

La première partie de ce mémoire consiste en une étude bibliographique des connaissances nécessaires sur le cadre théorique dans lequel se place ce travail. Dans un premier temps, les notions de zoonose et de parasitisme sont décrites. Les facteurs de variabilité des maladies parasitaires en fonction de l'environnement sont abordées dans un deuxième chapitre. Le modèle biologique est ensuite décrit, ainsi que les connaissances actuelles sur son importance chez ses différents hôtes ainsi que dans l'environnement.

Dans la seconde partie de ce mémoire, constituée de deux chapitres, nous étudions la dynamique du cycle de *Toxoplasma gondii* dans le site urbain de l'hôpital de la Croix-Rousse à Lyon. Ce site a été choisi car il abrite une densité remarquablement élevée de chats domestiques, nourris par des volontaires, et qu'il a la particularité de contenir peu d'hôtes intermédiaires. Ce contexte nous a permis d'étudier la transmission de *Toxoplasma gondii* en supposant qu'elle se déroule en majeure partie entre l'hôte définitif et l'environnement. L'aspect dense et concentré de la population nous a également permis d'entreprendre un suivi du comportement défécatoire des chats, et l'étude de la contamination du sol par les oocystes du parasite.

Dans la troisième partie de ce travail, constituée de quatre chapitres, nous étudions la dynamique de la transmission du cycle de la toxoplasmose dans différents milieux riches en hôtes intermédiaires. Nous avons entrepris l'étude de la variabilité du niveau de contamination chez l'hôte intermédiaire, d'une part en capturant des individus de différentes espèces dans deux types de milieu (prairie et forêt), et d'autre part en étudiant les données issues de la littérature. Les populations de chats présentes dans des milieux contrastés (milieu rural agricole, milieu forestier ou îles subantarctiques) ont été échantillonnées afin de déterminer des facteurs liés à l'acquisition de l'infection chez l'hôte définitif.

Enfin, les méthodes utilisées dans nos travaux et les principaux résultats de la thèse sont discutés dans la quatrième partie de ce mémoire.

Première partie

Introduction générale

« Il n'y a pas de preuve que la puce, qui vit sur la souris, craigne le chat. »

Henri Michaux

1.1. Maladies infectieuses et environnement

1.1.1. Maladies infectieuses et parasitaires transmissibles entre espèces : un sujet de société

Les maladies infectieuses et parasitaires sont la deuxième cause de décès chez l'homme au niveau mondial (WHO, 2004) et environ deux tiers d'entre elles sont des zoonoses (Cleaveland et al., 2001), maladies transmissibles à l'homme par les animaux. La crise internationale déclenchée par la récente épidémie du Syndrôme Respiratoire Aigü Sévère (SRAS) à l'échelle de plusieurs continents a montré la vulnérabilité de l'homme face aux agents infectieux provenant des populations animales. En effet, de par leur capacité à se répandre largement dans une population (virus de la grippe, choléra) ou à s'installer chez des animaux « réservoirs » (fièvre hémorragique, peste porcine), les zoonoses ont des impacts importants dans les domaines de la santé publique, de l'élevage, ou de la conservation de la faune sauvage (Cleaveland et al., 2001 ; Daszak et al., 2001 ; Kruse et al., 2004).

Or, la globalisation de l'agriculture, la déforestation, et la concentration des habitations humaines a engendré une fragmentation, voire une destruction de certains habitats (McKinney, 2002), qui a des conséquences en terme de propagation des zoonoses. Le développement de fermes d'élevage dans le paysage agricole a notamment créé un habitat favorable à la transmission des maladies, en augmentant la concentration des hôtes domestiques et sauvages dans le même habitat (Patz et al., 2000). De plus, le fort accroissement, à un niveau local, de la densité de certaines espèces animales impliquées dans la transmission de zoonoses augmente les possibilités de contact et de transmission de maladies entre les animaux domestiques ou d'élevage et la faune sauvage (Daszak et al., 2001) ce qui peut entraîner de lourdes conséquences pour les espèces impliquées. L'apparition d'épidémies peut ainsi causer le déclin à large échelle de nombreuses espèces sauvages (Dobson et Foufopoulos, 2001). C'est notamment le cas pour plusieurs espèces de canidés sauvages : des populations de lycaons (*Lycaon pictus*) en Afrique et de loup d'Abyssinie

(*Canis simensis*) en Ethiopie ont ainsi été décimées par une épidémie de rage ayant pour origine des populations de chiens errants (Gascoyne, et al., 1993 ; Sillero-Zubiri et al., 1996).

Les populations d'animaux d'élevage peuvent, elles, être durement atteintes par des pathogènes à propagation rapide qui causent d'importantes mortalités et occasionnent une perte de rendement, source potentielle de conflits entre humains et faune sauvage locale. Ces conflits prennent plus particulièrement d'ampleur dans les communautés rurales dont les ressources dépendent de la production de viande. Ainsi, au Zimbabwe, le buffle d'Afrique (*Syncerus caffer*) est un réservoir du virus de la fièvre aphteuse, qui peut être transmis au bétail élevé pour la production de viande (Sutmoller et al., 2000). Une surmortalité du bétail, associée à des mesures de prévention (abattages préventifs, interdiction de commercialisation) a entraîné des préjudices financiers importants pour les populations humaines locales. De grandes zones clôturées ont été aménagées pour empêcher le contact entre buffles et animaux d'élevage, ce qui a eu pour conséquence de limiter les déplacements de la faune sauvage locale. Ce type de conflits n'est pas confiné aux pays en voie de développement, comme le montre l'exemple de la tuberculose bovine, problème sensible au Royaume-Uni et en Irlande. La fréquence des troupeaux infectés par cette maladie a augmenté ces dernières années dans ces régions, où le blaireau d'Europe (*Meles meles*) semble être impliqué dans le maintien et la transmission de *Myobacterium bovis* au bétail (Krebs, 1997). De ce fait, il est l'objet d'une politique de contrôle par destruction. Les éleveurs de bétail et les associations de protection et de conservation des animaux s'affrontent régulièrement sur le sujet.

La relation entre l'écologie des populations d'hôtes et la structure de l'environnement est un équilibre complexe que la modification des habitats par l'homme a perturbé. La majorité des épidémies actuelles, comme le choléra, Ebola ou encore les fièvres hémorragiques, résulte du développement de l'agriculture (et dans certains cas de l'augmentation des densités de rongeurs), du changement dans les écosystèmes aquatiques, de la déforestation (ou à l'inverse la reforestation) ou de changements climatiques (Moors, 1995). Dans ce contexte, il apparaît clairement que l'étude des pathogènes qui peuvent être transmis à un assemblage de différentes espèces d'hôtes est d'un intérêt fondamental car elle répond aux attentes actuelles de nos sociétés, que ce soit en terme de santé publique, de gestion des ressources économiques et/ou de gestion de la biodiversité. Parmi ces pathogènes, les parasites offrent des modèles d'étude dont la diversité des hôtes et des voies de transmission permet de caractériser une large variété de situations à différentes échelles de perception.

1.1.2. Parasite et parasitisme

Un parasite est un organisme qui vit aux dépens d'un ou plusieurs hôtes où il trouve un habitat et dont il tire tout ou partie de ses nutriments organiques, le plus souvent sans le (les) tuer (Dajoz, 2006). Les parasites sont, au moins à un stade de leur développement, liés à la surface (ectoparasites) ou à l'intérieur (endoparasites) du corps de leur hôte.

On distingue deux types de parasites : les macroparasites (helminthes, arthropodes et autres métazoaires) et les microparasites (virus, bactéries et protozoaires ; Anderson et May, 1979 ; Hudson et al., 2002). Les macroparasites sont caractérisés par des temps de génération longs, et le fait qu'ils n'induisent pas une immunité durable. Ils sont responsables de maladies souvent endémiques (c'est-à-dire sévissant d'une manière permanente dans un lieu géographique donné) telles que l'échinoccocose alvéolaire ou la trichinellose.

A l'inverse, les microparasites sont caractérisés par une reproduction rapide à l'intérieur de l'hôte. Le temps de génération est court, de telle façon que l'accroissement rapide de la population à l'intérieur de l'hôte peut entraîner la mort ou le développement d'une immunité. Les microparasites sont généralement responsables de maladies épidémiques (c'est-à-dire se développant et se propageant rapidement), et sont les agents de nombreuses maladies émergentes causant de graves épidémies dans le monde, comme le Virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV), les leishmanioses ou le paludisme. En épidémiologie, la distinction la plus importante les concernant est que, dans le cas des microparasites, les hôtes peuvent être simplement classés en positifs et négatifs, alors que dans le cas des macroparasites, cette distinction a peu de sens, puisque c'est la charge parasitaire (nombre de parasites par hôte) qui détermine la pathologie (Combes, 1995).

Les parasites montrent généralement des adaptations spécifiques à leur hôte (Price et al., 1977). Par exemple, certains schistosomes ont adapté leur rythme d'émergence aux moments de la journée qui maximisent leur rencontre avec l'hôte. C'est le cas de *Schistosoma mansoni*, dont la forme cercaire émerge depuis des mollusques juste après la tombée de la nuit, au moment où des populations de rats noirs (*Rattus rattus*), espèces cibles, connaissent un pic d'activité (Théron, 1984). Les parasites peuvent également modifier le comportement de leur hôte en vue d'assurer leur transmission : un exemple bien connu est celui de la petite douve du foie (*Dicrocoelium lanceolatum*). Les cercaires, qui se sont développées dans un gastéropode aquatique, sont libérées puis absorbées par des fourmis, chez qui elles s'enkystent. Les fourmis parasitées grimpent en haut des herbes, ce qui facilite leur ingestion

par le mouton, qui est l'hôte principal du parasite (Dajoz, 2006). Enfin, certains parasites augmentent leur chance de survie à l'intérieur de l'hôte en déprimant son système immunitaire : *Schistosoma mansoni* réduit ainsi l'efficacité du système immunitaire de l'homme en limitant la production de lymphocytes, la libération de produits de défense par les mastocytes et l'activation des plaquettes sanguines dans l'organisme humain (Dajoz, 2006).

1.1.3. Ecologie de la transmission des parasites

Au cours de son cycle de développement, le parasite peut passer successivement par une série de métamorphoses qui lui permettent de survivre dans les différents types de milieu qu'il rencontre. Par exemple, les adultes du nématode *Ascaris lumbricoides*, agent de l'ascaridiose, vivent dans le duodénum de l'homme où ils pondent des œufs. Les œufs du parasite sont évacués, avec les fèces, dans le milieu extérieur, où leur paroi épaisse leur permet de résister à la dessiccation. Il suffit que les oeufs soient ensuite ingérés par l'homme, par exemple avec de l'eau souillée, pour qu'ils puissent contaminer ce dernier et se transformer en parasites adultes dans son organisme. Dans cet exemple, le cycle biologique du parasite ne fait intervenir qu'un type d'hôte (l'homme) et l'environnement : il s'agit d'un cycle monoxène, ou cycle simple. Cependant, dans le cas des cycles plus complexes, jusqu'à quatre types d'hôtes – auxquels correspondent à chaque fois un stade de développement parasitaire –peuvent intervenir, auxquels s'ajoute généralement un stade libre disséminé dans l'environnement (Combes, 2001) : il s'agit de cycles hétéroxènes, ou cycles complexes. Le cycle de transmission des parasites nécessite des voies de transmission qui lui permettent de passer d'un hôte à l'autre. Selon Woolhouse et al. (2001), elles sont essentiellement de trois ordres:

- Transmission par contact direct : c'est le cas par exemple des puces qui peuvent sauter d'un animal à l'autre, ou des aérosols. Ce mode de transmission d'un individu à l'autre peut avoir notamment lieu au cours de l'accouplement, par morsures (par exemple le Virus de l'Immunodéficience Féline chez le chat domestique *Felis catus*) ou de la mère à ses petits. Dans ce dernier cas, on parle de « transmission verticale ». *Toxocara canis*, par exemple, traverse le placenta et infeste les chiots dans l'utérus, tandis que *Toxocara cati* passe de la mère aux chatons par le lait maternel.

- Transmission par consommation : elle se fait lors de la consommation d'un type d'hôte par un autre (consommation de viande contaminée par l'homme, prédation d'un hôte infecté par un carnivore) ou lors de la consommation par un hôte d'un stade libre infectant du parasite (œufs ou oocystes) disséminé dans l'environnement (sol, eau, ou végétaux).
- Transmission par un vecteur : ce mode de transmission fait intervenir un arthropode piqueur, qui véhicule le parasite et l'injecte à un autre hôte. C'est le cas par exemple de la myxomatose, transmise aux lapins par des moustiques ou par des puces.

Euzet et Combes (1980) ont proposé le concept de filtres pour symboliser les contraintes que rencontre un parasite pour s'établir et se maintenir chez un hôte. Ils distinguent deux types de filtre: le filtre de rencontre et le filtre de compatibilité (Figure 1.1). Le filtre de rencontre est ouvert si le parasite et l'hôte cohabitent (dimension écologique) et se rencontrent (dimension éthologique) au sein d'un même biotope. Le filtre de compatibilité, quant à lui, conditionne la possibilité pour le parasite d'accepter les conditions physico-chimiques internes de l'hôte (dimension métabolique) et de se faire accepter par l'hôte (dimension immunologique). Rencontre et compatibilité représentent ainsi deux lignes successives de défense de l'hôte potentiel : il suffit que l'un des deux filtres soit fermé pour que l'hôte soit préservé du parasite (Combes, 1995).

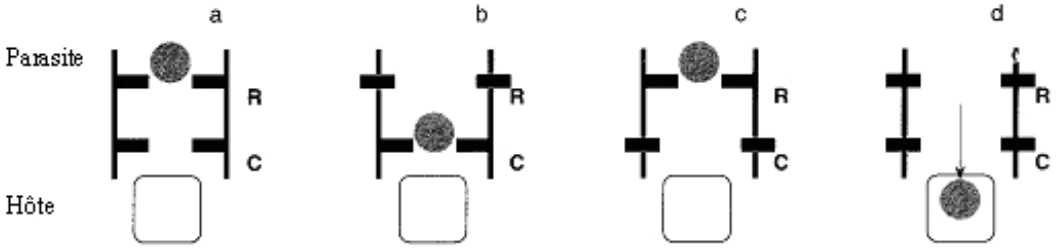


Figure 1.1. Combinaisons d'ouverture/fermeture des filtres de rencontre (R) et de compatibilité (C) (Combes, 1995). La transmission du parasite est efficace seulement lorsque les deux filtres R et C sont ouverts (situation d).

Comme la distribution spatiale de l'hôte et du parasite doivent au moins en partie coïncider pour permettre leur rencontre, l'ouverture du filtre de rencontre est fortement sensible à la densité des hôtes (Altizer et al., 2003). Ce phénomène est connu chez les oiseaux, dont les ectoparasites sont d'autant plus abondants que les colonies d'oiseaux sont importantes (Brown & Brown, 1986). De même, chez le campagnol des champs (*Microtus*

arvalis), les variations de prévalence de l'helminthe *Taenia taeniaeformis* coïncident avec les fluctuations saisonnières d'effectifs de ce petit rongeur (Fichet-Calvet et al., 2003). Le comportement de l'hôte doit également permettre un contact avec le parasite, qu'il s'agisse de prédation dans le cas de la rencontre entre plusieurs hôtes, ou de comportement entraînant l'ingestion de la forme libre du parasite. Enfin, la transmission parasitaire nécessite également que les conditions du milieu extérieur (composition du sol, présence de végétation, conditions physico-chimiques et climatiques, etc.) soient compatibles avec les conditions de survie du stade libre du parasite (Combes, 1995).

La rencontre entre hôte et parasite n'entraîne cependant pas nécessairement l'infection de l'hôte. L'organisme de ce dernier est, en effet, généralement capable de reconnaître le parasite comme un élément étranger (non soi), et de déclencher une variété de mécanismes de rejet, avec plus ou moins de succès (Combes, 2001).

L'ouverture des filtres est ainsi soumise à l'effet de diverses variables (Figure 1.2). D'un point de vue évolutif, les traits adaptatifs qui permettent au parasite de rencontrer son hôte et de survivre dans l'organisme de ce dernier si la rencontre a lieu auront tendance à être sélectionnés au cours de l'évolution du parasite. Inversement, au cours de l'évolution de l'hôte, seront sélectionnés les traits adaptatifs qui permettent à l'hôte de ne pas rencontrer le parasite et de se débarrasser de lui si la rencontre a lieu (Combes, 1995). Le degré d'ouverture des filtres dans le système hôte - parasite (Figure 1.2) dépend ainsi de ce que Combes (op. cité) appelle la « course aux armements ». Il propose le concept « d'interaction durable » pour désigner les systèmes hôte - parasite qui perdurent malgré l'existence des filtres de rencontre et de compatibilité.

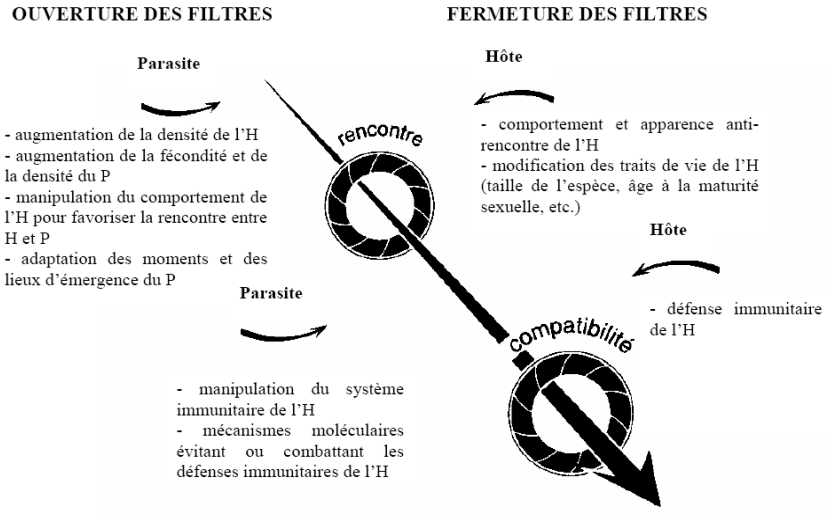


Figure 1. 2. Variables qui conditionnent l'ouverture et la fermeture des filtres de rencontre et de compatibilité entre le parasite (P) et l'hôte (H) (d'après Combes, 1995 ; et Combes, 2001).

1.2. Environnement et transmission parasitaire

1.2.1. Composition du paysage et survie des parasites

La composition du paysage influence les conditions de survie des formes libres des parasites, en conditionnant par exemple le recouvrement végétal, qui peut déterminer le degré d'humidité ou d'ensoleillement à un niveau local. Les formes libres des parasites sont généralement adaptées à résister dans l'environnement à différentes formes de stress, mais résistent peu à la déssication et à la congélation (Robertson et al., 1992). Ainsi, les œufs de *Taenia pisiformis* ne peuvent survivre que 7 jours lorsque le milieu est relativement peu humide (33%) et la température importante (38°C ; Coman, 1975). La dispersion des formes libres parasitaires peut également dépendre de la composition du paysage : la dispersion des oocystes de *Cryptosporidium parvum* est affectée par le recouvrement végétal, la pente, et l'intensité des précipitations (Davies et al., 2004). Enfin, la dissémination des formes libres parasitaires dans le sol peut dépendre de la composition de celui-ci : il semblerait en effet que les oocystes de *Cryptosporidium parvum* se lient aux particules d'argiles du sol, ce qui gênerait la dispersion du parasite (Kuczynska & Shelton, 1999).

1.2.2. Composition du paysage et transmission parasitaire

La composition du paysage influence la dynamique des populations de prédateurs et de petits mammifères ainsi que les relations prédateur-proie, et peut donc influencer les interactions hôte-parasite qui dépendent de ces relations (Giraudoux et al., 2003). En milieu rural, la distribution et l'abondance des micro-mammifères est influencée par la composition de la végétation, le degré de fermeture du milieu et le niveau de fragmentation des habitats (Bowman et al., 2001 ; Le Louarn & Quéré, 2003 ; Butet et al., 2006). En effet, la composition des communautés de rongeurs diffère selon qu'on se trouve en prairie (lieux de

prédilection du campagnol terrestre *Arvicola terrestris*, du campagnol agreste *Microtus agrestis* et du campagnol des champs) ou en forêt (campagnol roussâtre *Myodes glaerolus* et mulots *Apodemus* sp.). Le milieu bocager peut potentiellement accueillir toutes les espèces. Certains rongeurs peuvent être présents dans plusieurs types de milieux, comme c'est le cas pour les mulots (*Apodemus flavicollis* ou *Apodemus sylvaticus*), que l'on peut trouver du milieu forestier au milieu bocager (Figure 1.3). De plus, certaines espèces vivent sous la surface du sol, creusant des galeries pour construire des abris et pour se nourrir des racines, comme c'est le cas pour le campagnol terrestre et le campagnol des champs en prairie (Le Louarn & Quéré, 2003). Le rat brun (*Rattus norvegicus*) et la souris domestique (*Mus musculus*) peuvent, quant à eux, également vivre près des habitations humaines, où ils provoquent des dégâts sur les denrées stockées destinées à la consommation humaine et animale et sur les équipements des bâtiments (Meehan, 1984).

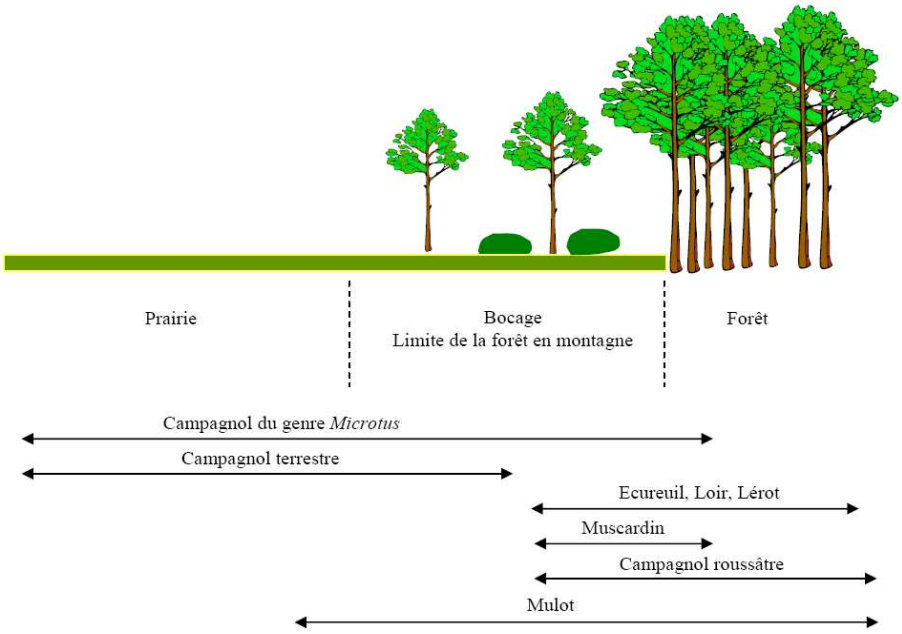


Figure 1. 3. Répartition des rongeurs en fonction de la fermeture du milieu en zones rurales françaises (d'après Le Louarn & Quéré, 2003).

Du fait de leur habitat, leur mode de vie ou leur susceptibilité au parasite, les différentes espèces de rongeurs ne présentent pas un risque identique d'exposition au parasite, ce qui se traduit par une variabilité des niveaux de prévalence d'une espèce à l'autre. Ainsi, Chalmers et al. (1997) rapportent des prévalences de *Cryptosporidium parvum* variant de 13 à

22% selon qu'il s'agit de populations de souris domestiques, mulots sylvestres (*Apodemus sylvaticus*), ou campagnols roussâtres.

La composition de l'habitat peut jouer un rôle direct sur le risque de contamination des hôtes intermédiaires et des prédateurs. Par exemple, la prévalence d'hantavirus varie en fonction du couvert végétal chez le campagnol roussâtre et la souris à pattes blanches *Peromyscus leucopus* (Root et al., 1999 ; Escutenaire et al., 2002). Dans les milieux où la végétation est dense, ces rongeurs ont tendance à effectuer beaucoup de déplacements, et augmentent ainsi leurs chances d'être en contact avec les urines ou les fèces d'un individu contaminé (Root et al., 1999). De plus, ces déplacements peuvent les exposer à des prédateurs qui se contaminent à leur tour en les consommant (Metzgar, 1967).

La densité des micro-mammifères peut expliquer une partie de l'exposition des prédateurs à la transmission de maladies (Ostfeld & Holt, 2004). Les populations de campagnols roussâtres vivant dans des forêts humides sont plus abondantes que dans les habitats plus secs, cette abondance étant reliée à une plus forte prévalence d'hantavirus chez ces rongeurs (Olsson et al., 2005). Il est cependant difficile d'évaluer les densités de rongeurs en milieu rural car elles varient fortement au cours du temps et en fonction du milieu (Butet & Spitz, 2001) : de 0 à 1000 individus par hectare en prairie, 0 à 100 en forêt, et 100 à 10 000 en milieu anthropique (Le Louarn & Quéré, 2003). De plus, l'intensification de l'agriculture peut entraîner la présence de rongeurs commensaux dans les bâtiments agricoles (comme la souris domestique et le rat brun), en forte densité dans le paysage, mais également modifier les densités de rongeurs prairiaux.

En effet, le développement de l'agriculture intensive, accompagné d'un remembrement, a privilégié le maintien de parcelles agricoles de grandes superficies et homogènes, au détriment des mosaïques de petites parcelles diversifiées. Or, ce type de paysage favorise les pullulations de rongeurs. Le campagnol des champs et le campagnol terrestre ont ainsi tendance à pulluler lorsque la proportion de prairie permanente excède 50% et 85% respectivement de la surface agricole utile (Delattre et al., 1992 ; Giraudoux et al., 1997). Le régime alimentaire des prédateurs généralistes, comme le renard roux (*Vulpes vulpes*) ou le chat domestique, varie en fonction de la disponibilité en proies (Weber & Aubry, 1993 ; Turner & Bateson, 2000), ce qui favorise la transmission de parasites quand celles-ci sont des espèces réservoirs. Par exemple, ce sont dans les zones de pullulations de campagnols des champs et campagnols terrestres que l'on trouve généralement les prévalences les plus élevées d'*Echinococcus multilocularis* chez le renard roux (Raoul et al., 2001).

La relation entre les hôtes définitifs et les hôtes intermédiaires est d'autant plus importante que la part de ces derniers dans le régime alimentaire des premiers est importante. Dans les milieux non anthropisés, les hôtes définitifs survivent exclusivement de la prédation, alors que la part de prédation dans le régime alimentaire de ces hôtes peut être variable en milieu rural, car elle est complétée par les déchets liés à l'activité humaine disponibles dans les rues. La situation extrême est celle du milieu urbain, où le régime alimentaire des hôtes définitifs ne dépend pas forcément de la densité des proies présentes en ville, mais surtout des ressources anthropogéniques.

1.2.3. Milieu urbain et écologie de la transmission parasitaire

Dynamique des populations d'hôtes en milieu urbain

L'urbanisation, conversion permanente et drastique des paysages naturels en résidences, voiries, ou bâtiments utilisés pour le commerce ou l'industrie, a entraîné des changements dans la composition du paysage, qui ont altéré la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Niemelä, 1999). L'impact majeur de l'urbanisation sur les écosystèmes réside en un déclin croissant de la richesse spécifique, du milieu rural vers les centres-villes urbains (McKinney, 2002). Cette perte de biodiversité a été observée chez de nombreux groupes taxonomiques, incluant les végétaux (Kowarik, 1995), les oiseaux et les papillons (Blair 2001), les insectes (McIntyre, 2000), et les mammifères (Mackin-Rogalska et al., 1988). Une étude récente, conduite en Amérique du Nord, a montré que la diminution de la richesse spécifique était liée à l'importance de la population humaine et du tissu urbain (Olden et al., 2006). Cette relation est expliquée par l'appauvrissement et la fragmentation des habitats (Shochat et al., 2006), l'augmentation des ressources anthropogéniques qui profite à certaines espèces au détriment d'autres (Marzluff, 2001), et l'altération des réseaux trophiques (Faeth et al., 2005). De nombreuses espèces animales ne sont ainsi plus présentes dans les zones occupées par l'homme, ou s'y trouvent restreintes à la superficie de parcs, fragments forestiers ou aires de loisir (Bradley & Altizer, 2007).

Ainsi, comme l'illustre la figure 1.4, la composition des communautés animales dans les paysages occupés par l'homme dépend, notamment, de la réponse des espèces à

l'urbanisation (McKinney, 2002). Une classification des espèces a ainsi été récemment établie en fonction de critères liés à l'urbanisation (Blair, 2001). Les « espèces urbanophobes » sont celles qui dépendent uniquement de ressources naturelles et sont les plus sensibles aux dérangements dus à la présence de l'homme ou à la fragmentation des habitats. C'est le cas de la belette (*Mustela nivalis*), prédateur spécialiste du campagnol des champs, et qui dépend de la répartition spatiale de ce petit rongeur de prairie (Delattre, 1987). On peut trouver ces espèces urbanophobes en milieu rural ou en marge du milieu sub-urbain, mais elles sont absentes du milieu urbain et sub-urbain. Les « espèces urbano-tolérantes » sont capables d'utiliser les ressources liées à l'activité humaine (déchets, restes de nourriture) mais dépendent également de ressources naturelles. En Amérique du Nord, le raton laveur (*Procyon lotor*) est ainsi présent en plus forte densité en milieu urbain et sub-urbain qu'en milieu rural (Randa & Yunger, 2006). Enfin, les « espèces urbanophiles », généralement commensales, dépendent quasi-exclusivement de ressources anthropogéniques. Ces espèces trouvent des abris dans les habitations humaines et exploitent les ressources en nourriture à l'intérieur ou autour des habitations. Elles sont généralement omnivores et incluent des espèces comme la souris domestique, ou le rat brun.

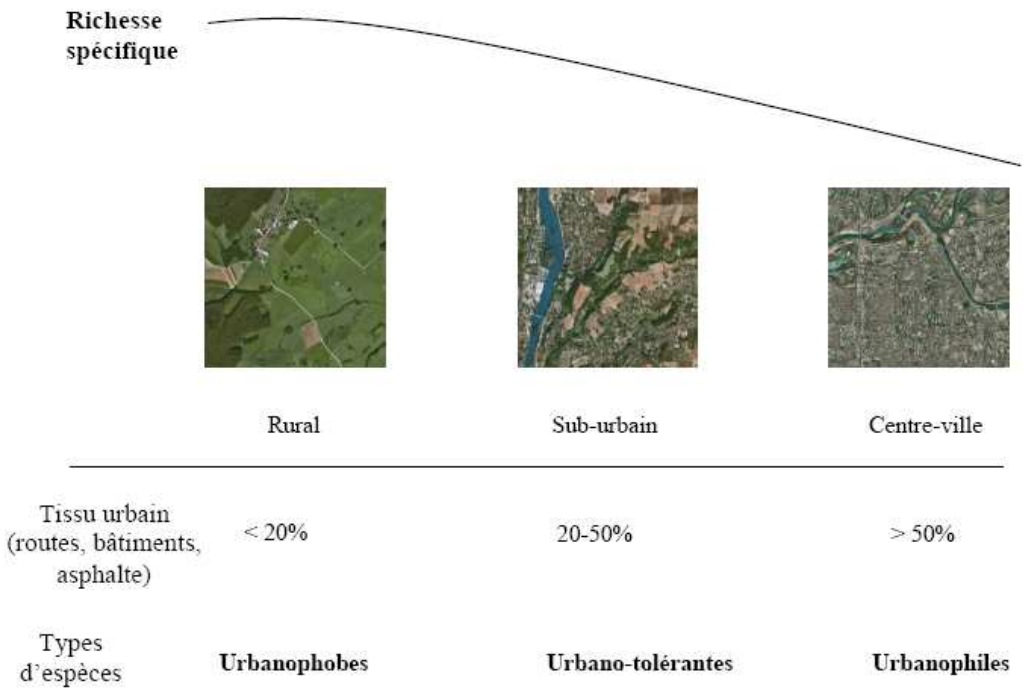


Figure 1. 4. Distribution des catégories d'espèces et richesse spécifique selon le gradient d'urbanisation (McKinney, 2002).

D'autre part, des déchets alimentaires liés à l'activité humaine sont disponibles en abondance dans les villes : renards, chiens (*Canis familiaris*) ou chats errants trouvent leur nourriture dans les poubelles de cantines, d'hôtels restaurants, ou les poubelles individuelles (Haspel & Calhoon, 1989 ; Neville, 1982 ; Page et al., 1992). L'abondance des déchets alimentaires, non soumise à des fluctuations saisonnières, favorise l'installation de populations de ces carnivores, hôtes de nombreux parasites, en fortes densités (Contesse et al., 2004 ; Saunders et al., 1993 ; Turner & Bateson, 2000 ; Figure 1.5).

(a) **(b)**

Figure 1. 5. Présence d'hôtes carnivores en forte densité en milieu urbain. (a) Renards roux (*Vulpes vulpes*) présents à Zürich en Suisse (Bradley & Altizer, 2007). (b) Chat domestique (*Felis catus*) dans l'enceinte de l'hôpital de la Croix-Rousse à Lyon.

Conséquences sur la transmission parasitaire

L'urbanisation influence les conditions physico-chimiques qui permettent la survie des formes libres parasitaires : à l'intérieur des villes, les températures sont généralement un peu plus élevées, les hivers plus doux et les variations saisonnières de climat plus modérées que dans les alentours (Baker et al., 2002). Cependant, les milieux favorables à la survie des oocystes, relativement humides et frais, sont relativement rares en milieu urbain. Ils peuvent se concentrer sur quelques taches d'habitat végétalisées ainsi que quelques zones particulières comme les caves. De plus, ces types de milieux sont dispersés dans le tissu urbain et sont très hétérogènes spatialement. La contamination de l'environnement par les formes libres des parasites pourrait donc concerner quelques zones propices à leur survie, comme par exemple les parcs publics : Thevenet et al. (2004) rapportent la présence d'helminthes et de

protozoaires dans la majorité des parcs publics en Argentine pour lesquels les auteurs avaient entrepris la détection de parasites.

De plus, la distribution agrégée des populations d'hôtes en fonction des ressources disponibles peut augmenter les opportunités de contacts entre individus, qu'ils soient d'espèces différentes ou de la même espèce, et favoriser la transmission de maladies par contact direct ou via les fèces (Bradley & Altizer, 2007). La prévalence de maladies affectant des espèces adaptées à l'environnement urbain, comme la toxoplasmose ou la rage qui touchent des chats et des chiens, peut évoluer selon un gradient d'habitat, avec des prévalences fortes en milieu urbain et sub-urbain (Bradley & Altizer, 2007). Cependant, si de telles conditions peuvent mener à une transmission forte de ces maladies, cela ne devrait se produire que très localement en raison de l'hétérogénéité du milieu urbain, en particulier dans le cas de la toxoplasmose, dont la transmission dépend de plusieurs espèces hôtes et du milieu extérieur. Ainsi, les fortes densités locales de ratons laveurs en milieu urbain en Amérique du Nord sont reliées à des prévalences importantes du nématode *Baylisascaris procyonis* chez cette espèce (Wright & Gompper, 2005).

L'agrégation des ressources entraîne, chez les espèces urbano-tolérantes, la formation de groupes sociaux confinés à des aires géographiques limitées, distribuées dans l'espace sous forme de taches d'habitat : espaces verts, cimetières, parcs et jardins publics, squares ou terrains vagues (Macdonald, 1983 ; Trewhella et al., 1988 ; Niemelä, 1999 ; McKinney, 2002). La grande hétérogénéité de ces taches d'habitat, ainsi que leur faible connectivité (routes, immeubles, constituent des barrières au déplacement des animaux), limitent les déplacements et la dispersion des espèces animales et donc des parasites (Niemelä, 1999).

Pour les maladies à vecteurs, la diminution de la diversité spécifique réduit la variété d'espèces susceptibles d'être piquées par le vecteur, et donc réduit également la variété des réactions à la maladie, tout en augmentant les chances que, faute de diversité de choix, le vecteur pique souvent l'hôte réservoir du parasite. Un exemple bien connu est celui de la maladie de Lyme, causée par la bactérie *Borrelia burgdorferi*, et transmise à une large variété d'espèces animales par la tique (*Ixodes scapularis*). L'abondance de l'hôte réservoir (la souris à pattes blanches) dans des zones sub-urbaines caractérisées par une faible biodiversité, entraîne une prévalence élevée chez cette souris et chez l'homme dans ces zones (LoGiudice et al., 2003 ; Allan et al., 2003).

Densités de rongeurs et transmission parasitaire

La densité des populations de rongeurs en milieu urbain est déterminée par l'abondance, la composition et la richesse spécifique de la végétation dans les taches d'habitat (Dickman & Doncaster, 1987; Croci, 2007). Le mulot sylvestre peut probablement occuper toutes les taches d'habitat, des zones boisées jusqu'aux jardins résidentiels (Yalden, 1980; Dickman & Doncaster, 1987; Baker et al., 2003; Croci, 2007). En revanche, le campagnol roussâtre et le campagnol agreste sont rares en milieu urbain (Yalden, 1980; Baker et al., 2003) même s'ils peuvent occuper des taches d'habitat isolées et caractérisées par une strate herbacée dense (Geuse et al., 1985; Dickman & Doncaster, 1987).

Dans les taches occupées par des populations denses de prédateurs, la densité de rongeurs est fortement liée à la pression de prédation, et peut être quasiment nulle si la densité de carnivores est très élevée (Baker et al., 2003) et/ou si la présence de rongeurs est contrôlée et combattue (piégeages, empoisonnements). La densité de mulot sylvestre peut varier de 0 individu par hectare dans les zones occupées par des populations denses de prédateurs, à 200 individus par hectare dans les taches d'habitat isolées (Dickman & Doncaster, 1987 ; Baker et al., 2003). Les communautés de petits mammifères peuvent persister en forte densité dans des taches d'habitat de petite superficie peu colonisées par des prédateurs (Dickman & Doncaster, 1987).

L'influence de la densité de micro-mammifères et de la présence de prédateurs sur la transmission parasitaire, en particulier en milieu urbain, est mise en évidence par Deplazes et al. (2004) dans le cas d'*Echinococcus multilocularis* (Figure 1.6). Ce parasite, agent de l'échinococcose alvéolaire, est un helminthe dont le cycle sauvage fait intervenir le renard (genres *Vulpes* ou *Alopex*) comme hôte définitif, et différentes espèces de rongeurs (essentiellement le campagnol des champs et le campagnol terrestre) comme hôtes intermédiaires (Eckert & Deplazes, 1999). En Suisse, la densité de renards est maximale au centre des villes, mais la prévalence de l'échinococcose est la plus élevée en périphérie où une densité élevée de renards se combine avec une disponibilité de rongeurs hôtes intermédiaires (Morgan et al., 2004 ; Deplazes et al., 2004).

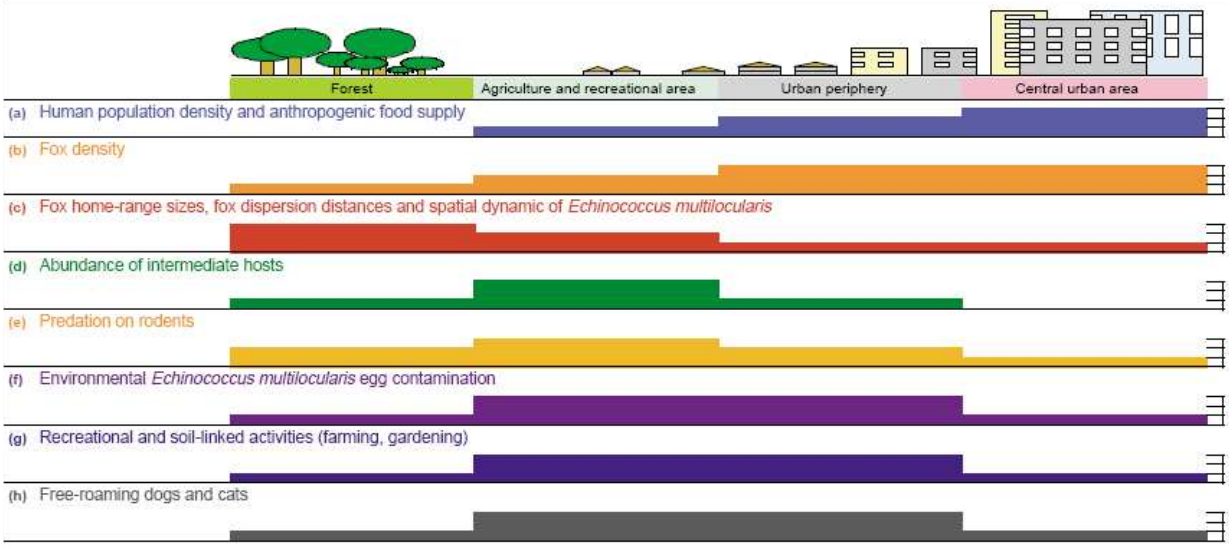


Figure 1. 6. Facteurs affectant le cycle d'*Echinococcus multilocularis* et les risques de contamination de l'homme par les œufs d'*Echinococcus multilocularis* (Deplazes et al., 2004). L'importance relative des différents facteurs en fonction du degré d'urbanisation est indiquée par l'épaisseur des barres.

1.2.4. Variabilité de l'environnement et cycles parasitaires

La variabilité de l'environnement peut entraîner une modification des cycles parasitaires quand les chances de rencontre entre hôtes et parasites, ainsi qu'entre hôtes, sont favorisées par l'abondance des espèces. La dynamique de la transmission entre espèces dépend de la densité combinée des populations de plusieurs espèces. Un milieu dans lequel les hôtes intermédiaires ont une faible densité est peu propice à la transmission parasitaire (par exemple l'échinococcose alvéolaire en milieu urbain) et, si un cycle direct entre l'hôte définitif, l'environnement et l'hôte définitif est possible, il sera relativement fréquent. La transmission des parasites pourrait donc être influencée par l'urbanisation, essentiellement du fait que, en milieu urbain, les populations de prédateurs peuvent atteindre de fortes densités tandis que les populations de micro-mammifères sont restreintes à de petites surfaces et des densités relativement faibles. L'urbanisation pourrait donc favoriser un cycle monoxène où le parasite serait transmis entre les hôtes définitifs et l'environnement, alors qu'un cycle hétéroxène pourrait être favorisé dès lors que le milieu abrite une densité très élevée d'hôtes intermédiaires par rapport à celle des hôtes définitifs.

A plus longue échelle temporelle, les cycles complexes pourraient résulter d'adaptations évolutives qui auraient entraîné l'ajout, dans le cycle, d'hôtes intermédiaires

proies, exploités par des hôtes prédateurs (Ewald, 1995 ; Poulin, 1998). Selon Choisy et al. (2003), l'évolution des cycles simples vers les cycles complexes pourrait augmenter le succès de transmission du parasite pour les raisons suivantes: (i) les prédateurs (hôtes définitifs) sont probablement plus efficaces dans la recherche de proies (hôtes intermédiaires) que le stade infectieux du parasite (œuf ou oocyste) dans la recherche de prédateur ; (ii) les populations de proies sont en général plus abondantes que les populations de prédateurs, le parasite aurait donc plus de chances de contaminer une proie qu'un prédateur ; (iii) enfin, parasiter une proie pourrait permettre au parasite de réduire le temps pendant lequel il est exposé aux conditions climatiques et physico-chimiques de l'environnement (Chabaud, 1954).

Choisy et al. (2003) proposent que la complexification des cycles est liée à la densité relative d'hôtes intermédiaires dans le milieu. Un environnement dans lequel la densité d'hôtes intermédiaires serait relativement faible comparée à celle des hôtes définitifs, favoriserait la persistance d'un cycle simple (hôte définitif - environnement - hôte définitif ; Figure 1.7a). A l'inverse, un environnement qui offrirait assez de ressources et d'abris pour permettre aux populations d'hôtes intermédiaires d'atteindre une densité élevée favoriserait la complexification du cycle par l'ajout d'un ou plusieurs compartiments comprenant la transmission à des hôtes intermédiaires (Figure 1.7b).

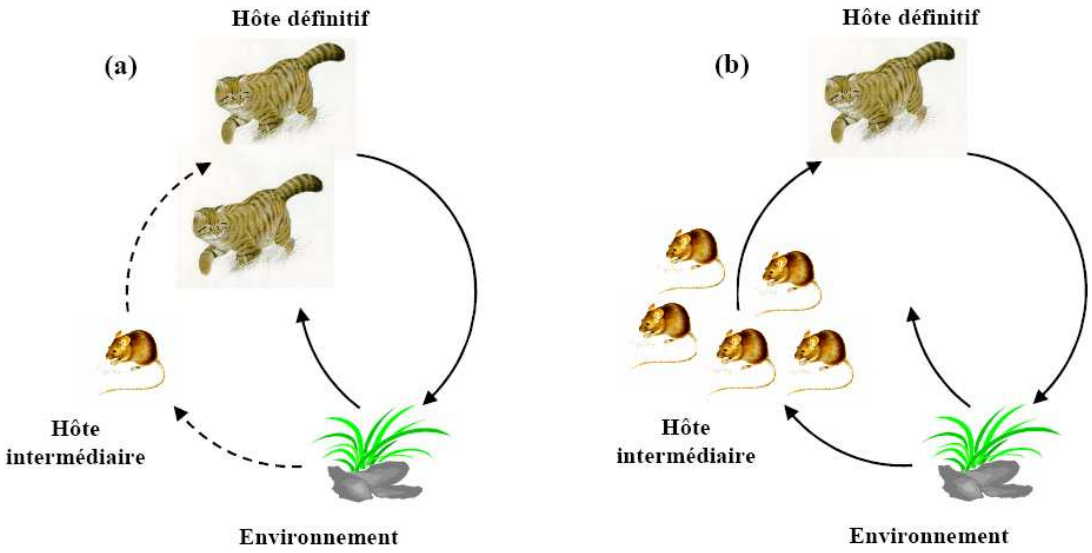


Figure 1.7. Type de transmission parasitaire privilégié en fonction de la densité relative d'hôtes intermédiaires et définitifs. (a) quand la densité d'hôtes intermédiaires est faible comparativement à celle des hôtes définitifs, la transmission des parasites s'oriente vers un cycle simple (hôte définitif-environnement-hôte définitif) ; (b) quand la densité d'hôtes intermédiaires est élevée par rapport à celle des hôtes définitifs, la transmission s'oriente vers un cycle complexe.

Le milieu urbain, caractérisé par un appauvrissement en espèces et une grande hétérogénéité spatiale qui résulte dans une cohabitation moins constante entre espèces, pourrait favoriser la simplification des cycles parasitaires. Au contraire, le milieu agricole dans lequel certaines espèces de rongeurs peuvent proliférer et cohabiter avec des carnivores peut favoriser l'émergence de cycles complexes.

Dans ce contexte, notre étude se propose de déterminer l'importance des différentes voies de transmission dans la dynamique de transmission parasitaire en fonction de l'environnement et, plus précisément en fonction de son degré d'urbanisation. En accord avec les hypothèses de Choisy et al. (2003), nous supposons que l'importance des différentes voies de transmission dans le cycle varie en fonction de la densité relative des hôtes intermédiaires et définitifs. Nous nous sommes intéressés aux facteurs qui modulent l'infection des populations d'hôtes le long d'un gradient qui va du milieu urbain au milieu non anthropisé en passant par le milieu rural. Notre modèle d'étude est un microparasite généraliste : *Toxoplasma gondii*.

1.3. Modèle d'étude : *Toxoplasma gondii*

1.3.1. Cycle et formes parasitaires

Toxoplasma gondii (Figure 1.8) est un protozoaire endoparasite appartenant à l'ordre des Coccidies et qui est responsable de la toxoplasmose, infection très répandue chez de nombreuses espèces animales dans le monde. Chez l'humain, l'infection est souvent bénigne mais peut entraîner des avortements, des maladies congénitales et des signes cliniques sévères chez les individus immunodéprimés (Dubey & Beattie, 1988).

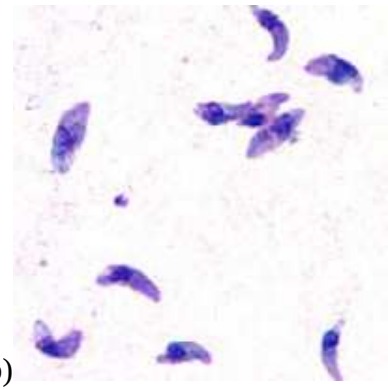
(a) (b) 

Figure 1. 8. Photographies de *Toxoplasma gondii*. (a) Oocyste sporulé (x 100). (b) Tachyzoïtes (x 400). (Source : http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML /Image_Library.htm)

Les Félidés, et en particulier le chat domestique, sont des espèces clé pour la perpétuation du parasite car ils sont les seuls hôtes à excréter la forme sexuée du parasite (oocystes). Elle très résistante dans l'environnement et peut infecter une large variété d'hôtes intermédiaires homéothermes (mammifères et oiseaux), dont les animaux élevés pour la production de viande, qui peuvent infecter les humains (Dubey et Beattie, 1988).

Chez l'hôte intermédiaire, *T. gondii* subit deux phases de multiplication asexuée (Figure 1.9). Dans la première, les tachyzoïtes se multiplient rapidement dans de nombreux

types cellulaires et la dernière génération initie une seconde phase, de laquelle résulte la formation de kystes tissulaires. On retrouve principalement ces kystes dans les tissus nerveux et musculaires : le système nerveux central, la rétine, ainsi que les muscles squelettiques ou cardiaques (Tenter et al, 2000). A l'intérieur des kystes tissulaires, les bradyzoïtes se multiplient lentement : cette étape constitue le stade terminal chez l'hôte intermédiaire, elle peut persister à vie chez la plupart d'entre eux (Dubey, 1998a) et être source de contamination pour un nouvel hôte intermédiaire (mammifères carnivores ou omnivores ou oiseaux carnassiers ; AFSSA, 2005). En effet, la particularité du toxoplasme est la possibilité de transmission par carnivorisme ou cannibalisme entre hôtes intermédiaires, par un processus de multiplication asexuée à l'intérieur de ces hôtes.

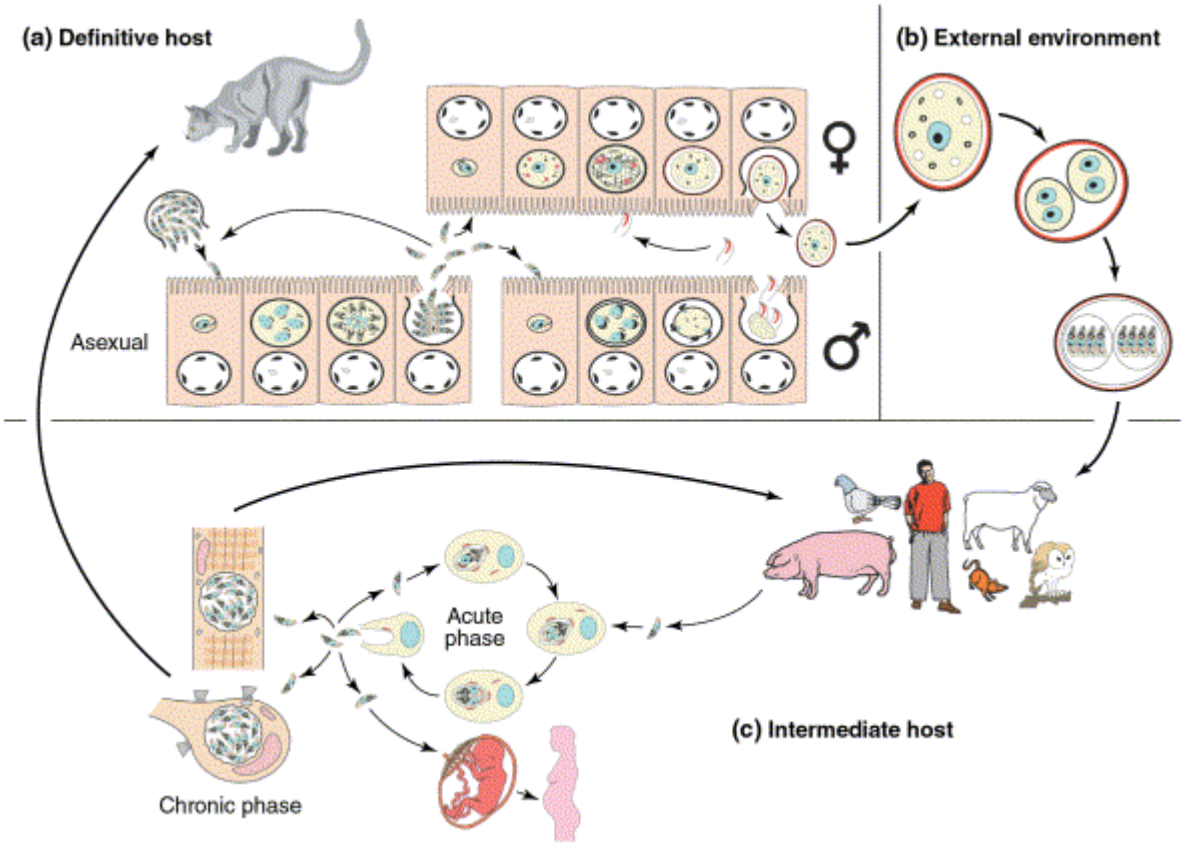


Figure 1. 9. Cycle de *Toxoplasma gondii*. (Ferguson, 2002). (a) Le chat est l'hôte définitif, chez qui une phase de développement sexuée produit des oocystes, qui contaminent l'environnement (b). Après la sporulation, les oocystes peuvent infecter une large variété d'hôtes intermédiaires lorsqu'ils sont ingérés depuis le sol, l'eau, ou les végétaux. Chez l'hôte intermédiaire (c), le parasite se développe de façon asexuée. Les kystes tissulaires qui se forment chez ces hôtes peuvent être transmis à d'autres hôtes intermédiaires (prédation, carnivorisme) ou au chat.

Lorsqu'un Félidé ingère un hôte intermédiaire, les bradyzoïtes initient une phase de prolifération asexuée, puis une phase de développement sexué. La gamogonie et la formation des oocystes se déroulent dans son intestin (Figure 1.9). Le chat domestique excrète pendant une période courte des millions d'oocystes non infectieux dans l'environnement via les fèces (Dubey, 1998a). La sporogonie, phase de sporulation des oocystes, se déroule dans le milieu extérieur (Figure 1.9), en condition d'humidité et d'aération suffisantes, et conduit au développement d'oocystes infectieux (Dubey & Beattie, 1988). Les oocystes peuvent ainsi sporuler en 24h à 25°C (Lindsay et al., 1997). Les oocystes survivent pendant de courtes périodes de chaleur et de déshydratation, mais peuvent demeurer infectieux dans des sols humides pendant 18 mois avant d'infester un hôte intermédiaire ou un Félidé (Frenkel et al., 1975 ; Tenter et al., 2000). Les chats peuvent également être infectés en ingérant des oocystes présents dans l'environnement mais qui sont cependant peu infectieux pour lui : plusieurs millions d'oocystes sont en effet nécessaires pour entraîner une infection chez le chat (Dubey, 2006).

Enfin, les hôtes intermédiaires peuvent acquérir l'infection verticalement (de la mère aux petits) par transmission trans-placentaire de tachyzoïtes (Dubey & Beattie, 1988 ; Dubey et al., 1996b) ou par le lait maternel (Dubey & Beattie, 1988 ; Figures 1.9 et 1.10). Chez le chat domestique, des études expérimentales ont montré que l'infection peut être transmise par voie trans-placentaire (Sato et al., 1993 ; Dubey et al., 1996b) ou pendant la période néonatale par le lait de la mère (Dubey et al., 1995a ; Powell et al., 2001). Cependant, après l'infection expérimentale d'une mère, les chatons sont rarement infectés (Dubey & Hoover, 1977 ; Dubey et al., 1995a). Dubey et Hoover (1977) proposent donc que la transmission verticale ne constitue pas une voie importante dans la perpétuation de *T. gondii* chez le chat en milieu naturel.

Il y a donc trois stades infectieux dans le cycle de *T. gondii*: les tachyzoïtes, les bradyzoïtes (contenus dans les kystes) et les sporozoïtes (contenus dans les oocystes infectieux). Les hôtes peuvent ainsi s'infester par trois voies possibles (Figure 1.10) :

- horizontalement par ingestion d'oocystes infectieux dans l'environnement (voie sexuée);
- horizontalement par ingestion de kystes contenus dans les hôtes intermédiaires (voie asexuée);
- verticalement par transmission intra-utérine de tachyzoïtes (voie asexuée).

La contuinité du cycle de *T. gondii* peut donc passer par plusieurs hôtes d'une manière facultative : si le parasite peut être transmis du chat à l'hôte intermédiaire, il peut également n'être transmis qu'entre chats (ingestion d'oocystes) ou entre hôtes intermédiaires (prédation, carnivorisme, ou transmission verticale).

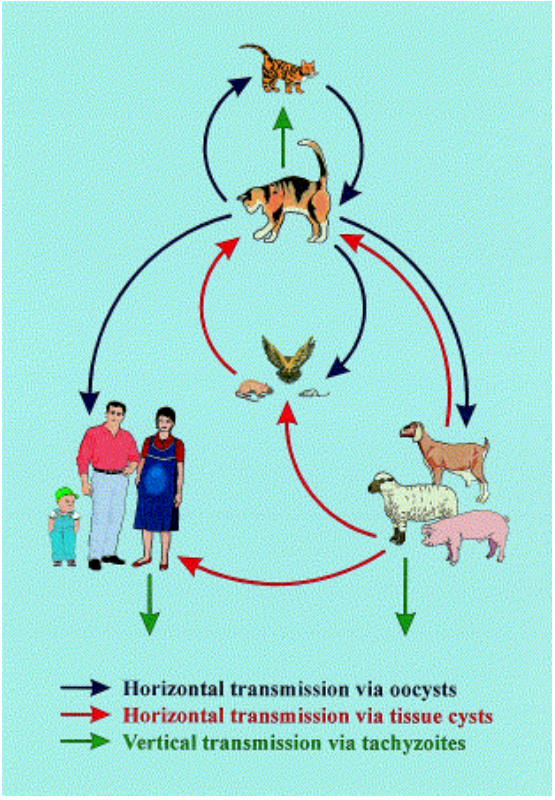


Figure 1. 10. Voies de transmission de *Toxoplasma gondii*. Un hôte peut s'infester horizontalement par ingestion d'oocystes ou de kystes tissulaires, ou encore verticalement par transmission trans-placentaire (Tenter et al., 2000).

1.3.2. Toxoplasmose chez l'hôte définitif : symptômes et immunité

La plupart des éléments connus sur la toxoplasmose chez le chat sont issus de résultats qui concernent le chat domestique. Chez cette espèce, la toxoplasmose passe généralement inaperçue car seules des diarrhées et des vomissements peuvent être observés durant de courtes périodes lors de l'excrétion des oocystes (Dubey & Beattie, 1988). Ces manifestations sont suivies d'une rémission spontanée chez l'adulte mais peuvent néanmoins être fatales chez les chatons (Dubey & Frenkel, 1972). Certains cas de toxoplasmose aiguë se traduisent par une hyperthermie, des adénopathies, une broncho-

pneumonie, des troubles digestifs ou encore une atteinte hépatique, nerveuse et cardiaque, qui peuvent entraîner la mort du chat et, plus particulièrement, du chaton (Dubey et al., 1995a).

Au moment de la première infection, tous les chats domestiques sont susceptibles d'excréter des oocystes. La période prépatente et la durée d'excrétion des oocystes sont variables et dépendent du stade parasitaire ingéré par le chat. Ainsi, jusqu'à 97% de chats ayant consommé un hôte intermédiaire contaminé (bradyzoïtes contenus dans les kystes tissulaires) excrètent des oocystes 3 à 10 jours plus tard (Freyre et al., 1989). Les tachyzoïtes semblent peu infectants pour les chats adultes, n'entraînant pas d'infection, mais peuvent être à l'origine de la transmission du parasite de la mère aux petits (transmission verticale décrite précédemment). Enfin, les oocystes semblent peu infectant pour le chat domestique (Dubey, 2006). En effet, si la majorité des chats excrète des oocystes après ingestion de bradyzoïtes, moins de 30% d'entre eux excrètent après l'ingestion d'oocystes ou de tachyzoïtes après une période prépatente de 13 à 44 jours (Dubey & Frenkel, 1976 ; Freyre et al., 1989 ; Dubey, 1996). Ces éléments sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle *T. gondii* s'est adapté à infecter le chat domestique plus efficacement par carnivorisme que par transmission oro-fécale.

L'infection par *T. gondii* chez l'hôte définitif induit deux sortes d'immunité. D'une part, elle entraîne une immunité intestinale, qui prévient la réexcrétion des oocystes. Lors d'un réinfection, le chat ne réexcrète donc généralement pas d'oocystes, même s'il s'agit d'une souche différente de celle ayant entraîné la primo-infection (Dubey & Frenkel, 1974 ; Frenkel & Smith, 1982). Cependant, cette immunité pourrait perdre en efficacité à long terme : Dubey (1995) a montré que quatre des neufs chats infectés six ans auparavant avaient réexcrété des oocystes de *T. gondii* après avoir été infectés avec une souche différente de celle impliquée dans la primo-infection. De plus, plusieurs cas de réexcrétion d'oocystes de *T. gondii* en condition expérimentale ont été rapportés : une contamination massive par des oocystes d'*Isospora felis* et *Isospora rivolta* peut conduire à une réexcrétion d'oocystes de *T. gondii* 10 jours après l'infection (Chessum, 1972 ; Dubey, 1976). Par ailleurs, un traitement à base de corticoïdes, qui entraîne une baisse de l'immunité chez le chat, peut conduire à une réexcrétion chez un individu ayant déjà eu une primo-infection (Tenter et al., 2000).

L'élimination fécale de *T. gondii* étant limitée dans le temps chez le chat domestique, les études qui rapportent des recherches d'oocystes dans les fèces fournissent peu de renseignements (AFSSA, 2005). Buxton (1998) estime que moins de 1% des chats sont excréteurs d'oocystes à un moment donné de leur vie. C'est pourquoi les études

épidémiologiques chez l'hôte définitif sont très généralement basées sur la mesure des anticorps spécifiques anti-*T. gondii*, témoins d'un contact antérieur avec le parasite.

En effet, un deuxième type d'immunité mis en place après la primo-infection chez le chat est la présence d'anticorps anti-*T. gondii*. La persistance du parasite dans l'organisme du chat permet le maintien de l'immunité et donc de la présence d'anticorps. En effet, après la primo-infection, les kystes tissulaires persistent plusieurs mois et probablement à vie dans des organes possédant des cellules à longue durée de vie comme le cœur ou le cerveau (Dubey & Beattie, 1988). C'est la rupture des kystes tissulaires et la circulation des bradyzoïtes dans le sang, qui entraînent la production d'anticorps chez les espèces hôtes, dont le chat (Dubey et al., 1998a).

Cependant, la cinétique de la réponse sérologique des chats est peu connue. Une étude rapporte que le profil sérologique de chats domestiques infectés pourrait se résumer à deux phases : une montée rapide du titre d'anticorps spécifiques IgG anti-*T. gondii* durant 15 jours, suivie d'une chute sur un à deux mois menant à un titre faible et stable (Pestre-Alexandre et al., 1984). Cependant, Dubey et al. (1995b) montrent que le niveau d'anticorps peut être très variable selon les individus et rester élevé et stable dans le temps durant une période de six ans.

1.3.3. Etat des connaissances épidémiologiques de la toxoplasmose

La toxoplasmose est répandue dans le monde entier, et la séroprévalence chez l'homme varie fortement d'un pays à l'autre (7 à 80% ; Tenter et al., 2000). Chez les patients immunodéprimés (HIV, greffe d'organe ou de moelle), *T. gondii* peut provoquer des atteintes cérébrales (Leport & Remington, 1992 ; Luft et al., 1993), oculaires (Holland, 2003 ; Kuo & Rao, 1999), et pulmonaires (Rabaud et al., 1996 ; Lucet et al., 1993) pouvant entraîner la mort. Chez le fœtus, *T. gondii* peut entraîner des signes cliniques graves, qui dépendent du moment de contamination au cours de la grossesse. Il s'agit d'atteintes neurologiques ou oculaires et d'avortements spontanés (Brézin et al., 2003 ; Wallon et al., 2004). En France, 2,4 à 6 femmes pour 1000 présentent une séroconversion au cours de leur grossesse (AFSSA, 2005). Depuis 1978, les autorités sanitaires françaises ont instauré un programme de prévention de la toxoplasmose congénitale. Un décret de 1992 impose un dépistage systématique lors de l'examen prénuptial et prénatal, une surveillance sérologique des

femmes enceintes non immunisées depuis la déclaration de la grossesse jusqu'à l'accouchement, et la recommandation d'informer toutes les femmes enceintes non immunes sur la prévention (Ancelle et al., 1996). En 2001, l'ensemble des tests sérologiques pratiqués pour le dépistage de la toxoplasmose chez la femme enceinte en France a coûté 13 134 992 euros au régime général de sécurité sociale (Marpeau, 2006). L'étude de la transmission de *T. gondii* présente donc un intérêt, non seulement dans le domaine de la santé publique, mais également sur le plan économique. D'autant plus que cette zoonose serait également responsable de pertes économiques importantes dans le domaine de l'élevage, puisqu'elle entraîne des avortements chez le porc (Lind & Buxton, 2000), le mouton et la chèvre (Nicolas et al., 1993 ; Ducanson et al., 2001).

Plusieurs études ont permis d'identifier des facteurs de risque d'acquisition de la toxoplasmose, essentiellement chez la femme enceinte. Les deux voies principales de contamination pourraient être, d'une part, la consommation de viande peu cuite de mouton ou de bœuf ou, d'autre part, l'ingestion d'oocystes par consommation de crudités mal lavées (Baril et al., 1996). Une étude en Europe identifie la consommation de viande peu cuite (mouton ou bœuf) comme responsable de 30% à 63% des infections chez la femme enceinte, alors que le contact avec le sol (via la consommation de végétaux) en représenterait 6% à 17% (Cook et al, 2000). Le risque de contamination par le contact avec le chat est probablement très faible. Comme celui-ci élimine le parasite dans ses fèces pendant une brève période après sa contamination, il a surtout un rôle épidémiologique indirect, en assurant la reproduction sexuée du parasite et en entretenant le réservoir tellurique (sol, litière, eau ; Tenter et al., 2000). Enfin, l'étude de Cook et al. (2000) montre qu'une part importante des infections ne peut être attribuée à une source particulière, ce qui souligne le manque de connaissances sur les sources d'infection pour l'homme.

1.3.4. Phase clonale et phase sexuée dans le cycle de *Toxoplasma gondii*

Bien que les travaux portant sur *T. gondii* soient nombreux, peu de données sont actuellement disponibles sur l'importance relative des différentes voies de transmission dans le cycle (Tenter et al., 2000 ; Dumètre & Dardé, 2003). Plusieurs arguments s'opposent sur l'importance de la transmission asexuée (par les hôtes intermédiaires) ou de la transmission

sexuée (par les hôtes définitifs), cependant l'étude simultanée des différentes voies de transmission n'a jamais été entreprise.

Phase clonale

Le premier argument en faveur d'un cycle ne faisant pas intervenir la reproduction sexuée du parasite repose sur la structure clonale du parasite. En effet, la plupart des souches de *T. gondii* peuvent être classées en trois lignées clonales (I, II, et III) dont le génome diffère de moins de 2% (Howe & Sibley, 1995). Cette structure génétique limitée à quelque génotypes est également retrouvée chez d'autres protozoaires parasites comme *Trypanosoma cruzi*, ou *Plasmodium falciparum*. Chez l'ensemble des protozoaires parasites, la reproduction asexuée est donc supposée prédominante et responsable du maintien des lignées stables au fil du temps (Tibayrenc et al., 1990). Cette hypothèse n'écarte pas l'existence de phases de développement sexué et de recombinaison génétique, mais les décrit comme plutôt occasionnelles ou pas assez fréquentes pour altérer significativement la structure clonale de la population : la recombinaison génétique de deux souches clonales donne une souche de génotype semblable aux souches dont elle est issue (Grigg et al., 2001). Ajzenberg et al. (2002) montrent que la structure génétique fine des lignées clonales montre des recombinaisons génétiques.

La plupart des souches de *T. gondii* isolées à partir d'infections humaines ou chez des hôtes intermédiaires en Europe et en Amérique du Nord se classent parmi les trois lignées clonales, et plus généralement dans la lignée de type II, avec l'existence de souches atypiques n'appartenant pas à ces lignées (Ajzenberg et al., 2002). Les lignées clonales pourraient être issues d'un croisement unique de deux souches ancestrales, datant d'environ 10 000 ans. Leur apparition coïncide avec le développement de l'agriculture (Hole, 1994) et la domestication du chat comme animal de compagnie (Turner & Bateson, 2000), deux circonstances qui ont créé une concentration d'hôtes potentiels de *T. gondii* sans précédent et des opportunités nouvelles de modes de transmission (Su et al., 2003).

Selon la théorie clonale, la perpétuation du cycle de *T. gondii* pourrait se faire entre hôtes intermédiaires soit par prédation ou cannibalisme, soit par transmission verticale en dehors de la présence de l'hôte définitif (Tibayrenc et al., 1990 ; Johnson, 1997).

Chez les hôtes intermédiaires, plusieurs études suggèrent que les femelles peuvent transmettre le parasite à l'ensemble de leur portée. *T. gondii* a été isolé dans le lait de femelles

expérimentalement infectées chez la souris domestique (Remington, 1961), la vache (Sanger et al., 1953), le porc (Sanger et al., 1955), ou encore le chien (Chamberlain et al., 1953). La transmission verticale a été démontrée expérimentalement chez la souris (Remington, 1961 ; Berverley, 1959) et pourrait même permettre la transmission du parasite sur plusieurs générations (Beverley, 1959). En milieu naturel (Marshall et al., 2004) ou expérimental (Owen & Trees, 1998), la souris domestique ou le mulot sylvestre peuvent montrer des niveaux importants de transmission congénitale. Chez le rat brun, la transmission verticale est considérée par certains auteurs comme une voie importante de transmission du parasite : dans une population de rats maintenus en captivité pendant plus de deux ans, la fréquence de l'infection n'a pas diminué malgré l'absence de contact avec des chats, l'auteur excluant la possibilité que ce résultat soit expliqué uniquement par le cannibalisme entre rats ou les infanticides (Webster, 1994).

De plus, la consommation d'hôtes intermédiaires par d'autres hôtes intermédiaires pourrait contribuer à perpétuer le cycle de *T. gondii* : la consommation de rongeurs contaminés (souris domestique, rat brun, ou souris à pattes blanches) par le porc pourrait être une source importante de l'infection dans les élevages porcins (Lubroth et al., 1983 ; Lehmann et al., 2003).

Phase sexuée

Si, en théorie, la perpétutation du cycle entre hôtes intermédiaires est possible, plusieurs arguments sont en faveur d'une contamination des hôtes intermédiaires par les oocystes de *T. gondii* (reproduction sexuée). En effet :

- la toxoplasmose est quasiment absente chez l'homme dans les zones où les chats sont absents, comme certaines îles du Pacifique (Wallace, 1969 ; Wallace et al., 1972).

- La transmission par oocystes est la seule voie de contamination efficace chez la plupart des herbivores ou granivores (Dubey & Beattie, 1988). Le niveau d'infection chez ces espèces peut être élevé, comme c'est le cas chez le poulet (*Gallus domesticus*) en Argentine (65,5% ; Dubey et al, 2003a).

- La prévalence de la toxoplasmose au sein d'une communauté humaine strictement végétarienne en Inde (les Jains) est similaire à celle d'autres communautés vivant au même

endroit et n'ayant pas ce régime alimentaire (Hall et al, 1999). Ces résultats laissent penser à une voie de contamination commune à tous les individus, toutes habitudes alimentaires confondues, comme par exemple l'ingestion d'oocystes contenus dans l'eau de boisson ou certains végétaux.

- *T. gondii* est responsable d'épidémies liées à la présence d'oocystes dans l'eau de boisson municipale, comme par exemple au Canada en 1995 (Bowie et al, 1997). Une étude menée au Brésil, zone endémique, a montré que l'eau de boisson non filtrée augmentait le risque de contamination des individus des classes socio-économiques basse et moyenne, dont la prévalence était déjà élevée (Bahia-Oliveira et al, 2003).

- La prévalence chez des animaux marins peut être importante (98% chez le Grand Dauphin *Tursiops truncatus* ; Dubey et al., 2003b). Les oocystes peuvent sporuler et survivre dans l'eau de mer durant de longues périodes (Lindsay et al., 2003), et l'infection des animaux marins pourrait se produire par l'intermédiaire d'invertébrés marins jouant un rôle de concentration et de transporteur du parasite.

Chez les Félidés, l'existence d'un cycle basé uniquement sur la transmission entre l'hôte définitif, l'environnement et l'hôte définitif est possible mais n'a jamais été clairement évoquée. Or, les chats domestiques peuvent former des populations vivant en forte densité, sans relation avec la densité des espèces proies puisque les chats sont nourris par l'homme (Turner & Bateson, 2000). L'existence de telles populations expose les chats à un contact avec les fèces de leurs congénères, qui peuvent potentiellement contenir des oocystes infectieux. Cependant, les oocystes de *T. gondii* sont moins infectieux et moins pathogènes chez l'hôte définitif que chez les hôtes intermédiaires (Dubey, 2006). En effet, un chat peut ingérer une dizaine d'oocystes sans être infecté, alors qu'un seul suffit à infecter une souris ou un porc (Dubey et al., 1996a ; Dubey, 2006). La possibilité d'un cycle sexué reposant sur la transmission entre l'hôte définitif et l'environnement ne pourrait donc être favorisée que dans les environnements à forte densité d'hôtes définitifs et faible densité d'hôtes intermédiaires. La possibilité du maintien d'un cycle sans hôtes intermédiaires, comme la possibilité d'un cycle sans chats, n'a cependant jamais été étudiée formellement.

La compréhension de l'importance relative des différentes voies de transmission dans le cycle de *T. gondii* nécessite une approche intégrée prenant en compte la variabilité de la densité des populations d'hôtes et du régime alimentaire des hôtes définitifs. Elle passe notamment par une meilleure compréhension de la dynamique de transmission du parasite

dans les populations de chats, hôtes qui sont responsables de la contamination de l'environnement par les oocystes de *T. gondii*. Dans les environnements où la densité de chats est très élevée par rapport à celles des hôtes intermédiaires, la phase sexuée du cycle pourrait être importante, et complétée par une phase clonale chez les hôtes intermédiaires infectés par les oocystes. Dans les zones où les hôtes intermédiaires sont abondants, l'essentiel des infections des chats pourrait au contraire être lié à la consommation d'hôtes intermédiaires infectés.

1.4. Distribution et contamination des espèces hôtes

En tant que principal hôte définitif de *T. gondii*, le chat domestique joue un rôle particulier dans le cycle du parasite. La distribution cosmopolite de cet hôte semble permettre le maintien de la toxoplasmose chez l'homme et de nombreuses espèces animales partout dans le monde (Tenter et al., 2000). Cependant, la variabilité des populations de chats laisse supposer que la transmission de *T. gondii* diffère selon les milieux, en fonction de la densité d'hôtes et du régime alimentaire des chats.

1.4.1. Chat domestique et chat forestier

Habitats fréquentés

En France, deux Félidés de taxons proches, le chat domestique et le chat forestier européen (*Felis silvestris* Schreber 1777), peuvent être responsables de la majeure partie de la contamination de l'environnement par les oocystes de *T. gondii*.

Bénéficiant d'une très grande capacité d'adaptation, le chat domestique a colonisé des habitats très divers, du cercle polaire à l'équateur (Turner et Bateson, 2000) : forêts (Coman & Brunner, 1972 ; Corbett, 1979 ; Fitzgerald & Karl, 1979), îles tropicales (Marshall, 1961; Dilks, 1979; Konecny, 1983) ou îles à climat froid, humide et venteux (Anderson & Condy, 1974 ; Derenne, 1976; Jones, 1977; Van Aarde, 1980; Pascal, 1980), régions agricoles à climat tempéré froid à tropical où alternent champs cultivés, pâtures et zones boisées (Hubbs, 1951, Laundre, 1977 ; Liberg, 1980), milieux arides (Bayly, 1976), savanes semi-arides (Seabrook, 1990), villages (Fagen, 1978; Izawa et al., 1982; Pontier et al., 1995), ou villes (Page et al., 1993 ; Oppeheimer, 1980; Haspel & Calhoon, 1989; Natoli & DeVito, 1991; Pontier et al., 1995). Tous ces milieux sont propices à la colonisation par des populations

naturelles de chats domestiques, en plus des chats apprivoisés que leurs propriétaires peuvent laisser vagabonder à l'extérieur des maisons. Seuls les chats strictement confinés dans les habitations n'appartiennent pas à ces populations, ce qui n'exclut pas totalement qu'ils puissent constituer un risque de toxoplasmose pour leur propriétaire, en fonction de leur régime alimentaire.

La densité des chats domestiques ainsi que la structure de leurs populations est fortement reliée à l'abondance et à la distribution des ressources (Turner & Bateson, 2000). Dans les zones non anthropisées (subantarctique ou zones arides) où les chats harets survivent exclusivement grâce à la prédation, leurs populations sont très peu denses (1 à 10 chats / km², Derenne, 1976 ; Van Aarde, 1980). A l'inverse, en milieu urbain, les populations de chats errants nourries par l'homme vivent en très forte densité (> 1000 chats / km², Page et al., 1993 ; Calhoon & Haspel, 1989). Le milieu rural représente une situation intermédiaire : le régime alimentaire des chats est basé sur la prédation et l'apport de nourriture par l'homme, la densité de leurs populations est moyenne (10 à 200 chats / km², Liberg, 1980 ; Pontier et al., 1995).

En France, comme sur toute son aire de distribution, le chat forestier, autre hôte définitif, peut représenter un risque non négligeable de contamination de l'environnement. Actuellement, la zone de présence du chat forestier en France est le quart nord-est du pays, ainsi que les Pyrénées (Stahl & Léger, 1992). Son milieu de vie habituel est constitué par de grands massifs forestiers de plaine, de colline, de basse et moyenne montagne ainsi que par leurs bordures, dans un paysage où la densité de la population humaine est faible et où l'habitat rural est regroupé (Stahl et Léger, 1992). Le chat forestier peut également fréquenter des milieux diversifiés lors de la chasse, comme des lisières de prairies, des parcelles de recolonisation forestière ou des clairières de régénération (Stahl & Léger, 1992). La densité des chats forestiers semble être assez homogène, allant de 1 à 5 pour une surface de 10 km² (Stahl et al., 1988). Elle est donc proche des densités observées chez le chat domestique en milieu non anthropisé (1 à 3 chats/km² dans les îles Kerguelen ; Say et al., 2002).

Compte-tenu de la diversité de la distribution et de la structure des populations de chats, le rôle respectif du chat forestier et du chat domestique dans le cycle de *T. gondii* varie probablement en fonction de l'environnement. La structuration et le fonctionnement des populations de chats en relation avec la transmission de *T. gondii* feront notamment l'objet de la suite de ce mémoire.

Epidémiologie de la toxoplasmose chez le chat

L'estimation de la séroprévalence chez le chat domestique a fait l'objet de nombreux travaux (revue *in* Tenter et al., 2000). Cependant, la comparaison des résultats est difficile car les tests sérologiques employés et les modalités de recrutement des animaux diffèrent d'une étude à l'autre, tandis que les informations concernant le mode de vie et d'alimentation des individus testés sont le plus souvent approximatives (AFSSA, 2005). Il apparaît cependant que la séroprévalence dans les populations de chats domestiques est très variable géographiquement, de 5 à 10% dans les populations étudiées en Asie (Lin et al., 1990 ; Nogami et al., 1998) à plus de 70% dans certaines populations étudiées au Brésil (Garcia et al., 1999) ou en Amérique du Nord (Lappin et al., 1992). En France, la séroprévalence était de 43% lors d'une étude conduite en Gironde et portant sur 549 chats issus de la clientèle de cliniques vétérinaires testés par immunofluoresence indirecte, au seuil de 1:50 (Cabannes et al., 1997). Chez le chat forestier, une seule étude a permis d'estimer la séroprévalence (100%) sur un petit nombre d'individus échantillonnés en Ecosse (N = 23 ; McOrist et al., 1991), mais cette forte valeur n'a pas été confirmée par l'étude d'autres populations.

Comme les anticorps anti-*T. gondii* persistent pendant au moins six ans et probablement même à vie (Dubey et al., 1995b, Tenter et al., 2000), la séroprévalence des populations de chats est, a priori, d'autant plus élevée que la population est composée d'individus âgés, les chats les plus vieux ayant le plus de chance d'avoir été en contact avec le parasite au cours de leur vie. Par ailleurs, la séroprévalence varie selon le mode de vie des chats et est ainsi généralement plus élevée chez les chats errants que chez les chats vivant chez un propriétaire. Cette différence est mise en relation avec le régime alimentaire des individus : les chats errants qui chassent activement montrent généralement une prévalence plus forte que les chats de propriétaire qui consomment essentiellement de la nourriture commerciale (Tenter et al, 2000). La séroprévalence diffère également en fonction de l'environnement et de la disponibilité des hôtes intermédiaires : les chats domestiques vivant en milieu rural sont plus souvent porteurs d'anticorps anti-*T. gondii* que ceux vivant en milieu urbain ou suburbain (Tenter et al, 2000).

Par ailleurs, Gauss et al (2003) rapportent que les chats vivant dans un groupe de plus de cinq individus ont une séroprévalence plus importante que ceux vivant seuls. Les auteurs attribuent cette différence à la proximité entre les chats du groupe social et la possibilité d'être exposé aux fèces possiblement contaminés d'un autre chat du groupe social. De plus, plusieurs études montrent que des chats infectés par le Virus d'Immunodéfience Féline (FIV)

ou le Virus Leucémogène Félin (FeLV) pourraient avoir plus de risque d'acquérir la toxoplasmose que des chats sains (Lin et al., 1992 ; D'Amore et al, 1997 ; Dorny et al, 2002). Enfin, Nogami et al (1998) envisagent une variation inter-annuelle de la séroprévalence chez le chat domestique, sans pour autant disposer de données sur ce sujet.

1.4.2. Hôtes intermédiaires

Hôtes composant le régime alimentaire des chats

Toutes les études de régime alimentaire chez le chat domestique et le chat forestier s'accordent sur le fait qu'ils sont principalement des prédateurs de petits mammifères (revue *in* Turner & Bateson, 2000). Les proies les plus fréquemment consommées sont les mulots (mulot sylvestre et mulot à collier) et les campagnols : campagnol des champs, campagnol agreste, campagnol roussâtre, ou campagnol terrestre (Turner & Bateson, 2000 ; Artois et al., 2002 ; Biró et al., 2005). Cependant, la souris domestique, le rat noir, et le rat brun peuvent représenter des proies importantes quand ils sont présents près des habitations humaines, et le lapin de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) peut également constituer une proie très fréquente (Artois et al., 2002). D'autres mammifères, comme la taupe européenne (*Talpa europaea*), les musaraignes (*Sorex* sp.), les écureuils (*Sciurus* sp.) ou les lièvres (*Lepus* sp.), peuvent être consommés de façon ponctuelle (Artois et al., 2002). Enfin, les oiseaux ne représentent généralement qu'une part faible de l'alimentation des chats domestiques et forestiers (Liberg, 1980 ; Stahl & Léger, 1992).

Chats domestiques et forestiers sont ainsi des prédateurs généralistes, exploitant un grand nombre de proies (Turner & Bateson, 2000). De plus, les chats domestiques s'accommodent volontiers de la nourriture distribuée par l'homme, facilement accessible et qui ne demande pas d'effort de prédation. La présence d'une telle ressource peut diminuer la motivation du chat à chasser, entraînant un changement dans son régime alimentaire (Calhoon & Haspel, 1989 ; Turner & Bateson, 2000). Par ailleurs, le régime alimentaire des chats domestiques et forestiers peut varier en fonction de l'abondance relative de leurs proies (Stahl & Léger, 1992 ; Turner & Bateson, 2000). Par exemple, Liberg (1984) montre que, dans une zone rurale de Suède, les chats domestiques consomment plus de lapins de mai à septembre,

période d'accroissement numérique des populations de ce lagomorphe, que le reste de l'année. De même en Ecosse, les lapins peuvent représenter plus de 90% des fréquences d'apparition dans les fèces des chats forestiers dans les régions où ils sont présents en abondance (Corbett, 1979), tandis qu'ils sont très rarement consommés dans les régions où ils sont présents mais en faible densité relativement aux autres types de proies disponibles (Malo et al., 2004). Enfin, le campagnol terrestre peut représenter 89% des proies consommées par le chat en période de pullulation (Weber & Aubry, 1993).

Epidémiologie de la toxoplasmose chez les hôtes intermédiaires

Chez les rongeurs, les manifestations cliniques de toxoplasmose sont connues à partir d'expériences sur des animaux de laboratoire (AFSSA, 2005). Elles varient en fonction de la souche chez la souris domestique : une souris infectée avec des oocystes de type I peut mourir des suites d'atteintes pulmonaires, digestives ou encéphaliques (Dubey & Frenkel, 1976). Le campagnol des champs apparaît plus résistant que la souris : sa mortalité due à l'ingestion d'oocystes est faible en condition expérimentale même après l'ingestion de fortes doses d'oocystes (souche K1, 1 à 1000 oocystes), alors que toutes les souris infestées avec la même souche meurent si elles ingèrent au moins 100 oocystes (Sedlák et al., 2001). Le rat brun est considéré comme étant un hôte résistant au parasite et développant une immunité durable (Dubey & Frenkel, 1998). Chez cette espèce, *T. gondii* pourrait induire des changements de comportement en transformant l'aversion innée des rats envers l'odeur des chats en une attraction vers les zones sentant l'urine de chat, ce qui pourrait accroître leurs chances de rencontrer un chat et d'être consommés (Webster, 2001).

La prévalence chez les rongeurs en milieu naturel excède rarement 10%. Plusieurs études ont rapporté des prévalences de 0 à 10% chez le Mulot sylvestre (Kapperud, 1978; Jackson et al., 1986), de 0 à 9% chez le campagnol roussâtre (Kapperud, 1978; Jackson et al., 1986), et de 0% chez le campagnol agreste (Kapperud, 1978). En milieu naturel, la prévalence chez la souris domestique et le rat brun varie entre 0 et 13% (Mir et al., 1982 ; El Nahal et al., 1982 ; Dubey et al., 1995c). Elle est plus élevée pour les individus vivant dans des milieux anthropiques : 13% à 67 % (Jackson et al., 1986 ; Webster, 1994).

1.4.3. Méthodes de diagnostic de la toxoplasmose chez l'animal

Le diagnostic de la toxoplasmose chez l'animal peut être effectué par la recherche du parasite dans l'organisme des animaux (revue *in* AFSSA, 2005) : examen direct (étude histologique de prélèvements de tissus animaux), bio-essai (inoculation de tissus animaux infectés à des souris afin d'isoler des toxoplasmes viables), culture cellulaire ou biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction pour la détection d'ADN dans les tissus animaux). Cependant, nous décrirons ici plus en détail les techniques de diagnostic sérologique de la toxoplasmose chez l'animal. En effet, elles sont largement employées actuellement pour la recherche étiologique d'avortement survenant dans des élevages, dans les études de séroprévalence et l'identification de l'infection chez de nouvelles espèces animales. Néanmoins, il existe de nombreuses techniques qui présentent chacune certains avantages et inconvénients dans leur réalisation ou leur interprétation.

D'une façon générale, le diagnostic sérologique de la toxoplasmose chez l'animal est basé sur la détection d'anticorps spécifiques anti-*T. gondii*, généralement des IgG. Les IgG sont en effet impliqués dans la réponse immunitaire secondaire et persistent dans le sang après l'immunisation. Le principe général des tests sérologiques est de mettre en présence des dilutions croissantes du sérum étudié et un réactif (Figure 1.11). Le titre d'anticorps sériques est déterminé comme l'invesre de la dernière dilution ayant permis la réalisation du phénomène attendu à hauteur de 50% et plus (lyse des toxoplasmes, agglutination d'un voile, etc…).

Les tests sérologiques les plus employés actuellement sont décrits brièvement ci-dessous :

- Dye test (ou test de lyse de Sabin & Feldman ; SFDT) :

- Principe : ce test met en évidence la lyse des toxoplasmes (tachyzoïtes entiers vivants) en présence du sérum étudié et d'un facteur accessoire (éléments du complément et magnésium). L'observation se fait au microsope optique et le pourcentae de tachyzoïtes lysés est ainsi déterminé.
- Avantages : ce test est considéré comme un test de référence chez de nombreuses espèces grâce à une sensibilité élevée.
- Inconvénients : la réalisation de ce test nécessite d'obtenir, de manipuler et d'entretenir des toxoplasmes vivants, ce qui peut représenter une contrainte logistique lourde (infection de chats, entretien de souris de laboratoire, cultures cellulaires). De plus, des faux-négatifs dus à la dispsersion rapide des anticorps lytiques sont

régulièrement observés, ainsi que des faux-positifs dus à la présence d'anticorps naturels IgM (Dubey et al., 1985).

- Test d'agglutination directe modifiée (MAT) :

- Principe : des tachyzoïtes entiers trypsinés puis formolés sont mis en présence du sérum étudié. La lecture des résultats se fait par observation d'un voile d'agglutination dû à la présence d'anticorps anti-*T. gondii* dans le sérum (Figure 1.11).
- Avantages : le MAT a une bonne sensibilité et une bonne spécificité, et sa réalisation est simple. Il est ainsi utilisé chez de nombreuses espèces animales (Dubey et al., 1985a ; 1985b).
- Inconvénients : l'existence de faux-positifs a déjà été rapportée pour les plus petites dilutions (Dubey et al., 1995b).

Figure 1. 11. Séries de dilutions de sérum dans une plaque pour une analyse sérologique des anticorps anti-*Toxoplasma gondii*.

- Test d'hemagglutination indirecte (IHAT) et test d'agglutination sur latex (LAT)

- Principe : ces tests mettent en présence des globules rouges de moutons formolés (ou des particules de latex dans le cas du LAT) et sensibilisés avec des antigènes de *T. gondii* et le sérum étudié. S'ils sont présents, les anticorps anti-*T. gondii* se lient aux globules rouges et il se forme une voie de fond des cupules des plaques.
- Avantages : ces tests sont faciles à mettre en place, et peuvent se présenter sous la forme de kits commerciaux.

- Inconvénients : des problèmes de sensibilité et de spécificité font que ces tests sont de moins en moins utilisés.

- Immunofluorescence indirecte (IFAT)

- Principe : des toxoplasmes formolés et fixés sur une lame de verre sont mis en présence avec le sérum étudié. Un conjugué marqué permet d'observer les toxoplasmes liés à des anticorps anti-*T. gondii* au microscope par fluorescence.
- Avantages : ce test est réputé pour sa sensibilité et sa spécificité, et sa réalisation est simple.
- Inconvénients : la fiabilité du test est variable selon la qualité du conjugué, le seuil de positivité utilisé, ainsi que selon les espèces dont le sérum est testé (AFSSA, 2005).

- Technique ELISA (Enzyme liked immunosorbent assay)

- Principe : le sérum étudié est mis en contact avec un support où sont présents des antigènes spécifiques anti-*T. gondii*. Il se forme alors des complexes immuns (antigènes - anticorps). Une immunoglobuline marquée par une enzyme est mise en présence du sérum, et permet une réaction colorimétrique. La lecture du résultat est déterminée par l'observation de la coloration lorsque la réaction est terminée. Le titre d'anticorps est ainsi obtenu en comparant la densité optique dans le puits contenant le sérum étudié à celle dans les puits contenant les témoins négatifs.
- Avantages *:* ce test peut être facile à mettre en place grâce à la commercialisation de kits de détection.
- Inconvénients : ce test s'avère coûteux et nécessite l'utilisation d'un conjugué spécifique pour chaque espèce animale.

Pour conclure, le MAT est actuellement le test le plus employé dans les études de séroprévalences de nombreuses espèces animales (Tenter et al., 2000). Dubey et al. (1995d) ont montré que cette technique présentait la meilleure sensibilité, bien que des toxoplasmes aient été détectés par bio-essai chez plusieurs animaux (chats et oiseaux) dont la séologie était négative (Dubey et al., 2003c). C'est pourquoi les études épidémiologiques réalisées dans nos travaux se sont appuyées sur l'utilisation de ce test.

1.5. Contamination de l'environnement par les oocystes de *Toxoplasma gondii*

La structure des populations de chats et d'hôtes intermédiaires conditionne les relations prédateurs-proies et la dynamique de contamination des chats. Cependant, il est également possible qu'en fonction du type de milieu et du comportement de défécation des chats, la contamination environnementale soit différente et probablement hétérogène. Or, le niveau de contamination des matrices environnementales (eau, ou sol) est encore peu connu en conditions naturelles. Son étude est limitée par le manque de méthodes sensibles permettant d'isoler le parasite dans les échantillons. Nous exposons dans la suite de ce mémoire les données connues actuellement sur la contamination de l'environnement par les oocystes de *T. gondii*.

Après leur première infection par *T. gondii*, les Félidés excrètent des millions d'oocystes dans leurs fèces durant une courte période (Dubey & Beattie, 1988). Ces oocystes peuvent être disséminés dans l'environnement par le vent et l'eau (Dubey & Beattie, 1988), ou par des vers de terre (Ruiz & Frenkel, 1980 ; Bettiol et al., 2000) ou des arthropodes (Wallace, 1973 ; Smith & Frenkel, 1978). En conditions naturelles, on retrouve des oocystes dans les eaux de surface (Villena et al., 2004), ou dans le sol (Ruiz et al., 1973). En conditions expérimentales, on les retrouve dans les fruits et légumes (Kniel et al., 2002). En raison de la dilution des oocystes dans l'environnement par des facteurs biotiques et abiotiques, leur détection dans des matrices environnementales par échantillonnage aléatoire donne généralement peu de résultats (Dumètre & Dardé, 2003 ; AFSSA, 2005).

1.5.1. Présence et survie des oocystes dans l'eau

Jusqu'à des études récentes, la présence d'oocystes dans l'eau était suspectée en raison du fait que des épidémies de toxoplasmose humaine étaient associées à la consommation

d'eau de boisson (Aramini et al., 1999 ; Benenson et al., 1982 ; Bowie et al., 1997 ; Taverne et al., 2002) et car il semble y avoir un lien entre la prévalence humaine et la consommation d'eau non filtrée (Bahia-Oliveira et al., 2003). Cependant, la recherche directe d'oocystes dans l'eau a été rarement effectuée, les méthodes de détection nécessitant des protocoles lourds (inoculation à la souris ; Isaac-Renton et al., 1998) et peu efficaces (AFSSA, 2005). Le développement de techniques moléculaires a cependant permis cette recherche avec une meilleure efficacité que l'inoculation sur souris (Villena et al., 2004). Il a ainsi été permis d'isoler une souche virulente de *T. gondii* lors d'une épidémie de toxoplasmose humaine reliée à la consommation d'eau de boisson au Brésil (de Moura et al., 2006).

De plus, la présence d'ADN de *T. gondii* dans des eaux de surface et de consommation a été récemment mise en évidence en dehors d'un contexte épidémique. Villena et al. (2004) l'ont rapportée dans 10/139 (7 %) échantillons d'eau de consommation, de surface ou souterraines en Champagne-Ardenne et Sroka et al. (2006) l'ont mise en évidence en zone rurale dans 31/114 (27%) des échantillons d'eau. La présence de *T. gondii* était particulièrement fréquente dans les eaux de surface à proximité des fermes d'élevage, elles-mêmes fréquentées par des chats.

Les conditions de survie des oocystes ont été étudiées expérimentalement en reproduisant les températures et les niveaux de salinité observés en milieu naturel. Les oocystes sporulés peuvent ainsi survivre jusqu'à 15 mois à température ambiante dans l'eau douce (Hutchison, 1967) et au moins 54 mois à 4°C (Dubey, 1998b). Ils peuvent également survivre six mois dans de l'eau de mer à température ambiante ou à 4°C (Lindsay et al., 2003). La découverte de fortes prévalences chez des mammifères marins (Holshuh et al., 1985 ; Dubey et al., 2003b) et la concentration d'oocystes dans des mollusques (Lindsay et al., 2001 ; Arkush et al., 2003) suggèrent d'ailleurs une présence non négligeable des oocystes dans l'eau de mer ou dans les invertébrés marins, qui pourraient jouer un rôle de transporteurs du parasite (AFSSA, 2005). En revanche, les oocystes sporulés perdent leur capacité infectieuse dès qu'ils séjournent au moins une minute dans l'eau douce à 60°C (Dubey, 1998b).

1.5.2. Présence et survie des oocystes dans le sol

La présence d'oocystes dans le sol en conditions naturelles est variable selon les études car, en raison de la probable dilution des oocystes dans l'environnement, la proportion d'oocystes trouvés dans les études à but exploratoire est faible. Frenkel et al. (1995) rapportent la présence d'oocystes dans 10/924 (1%) des échantillons de sol obtenus dans des jardins ou des aires de jeux pour enfants au Panama. Dubey et al. (1995c) montrent la présence d'oocystes dans 1/79 (1%) des échantillons de sol prélevés dans des fermes d'élevage dans l'Illinois. La présence d'oocystes de *T. gondii* a été mise en évidence en plus grande quantité (un échantillon sur cinq) lors d'une épidémie de toxoplasmose humaine au Brésil (Coutinho et al., 1982). De même, Ruiz et al. (1973) ont détecté des oocystes dans 4/15 (27%) échantillons de sol récoltés dans un jardin très fréquenté par des chats.

L'étude de la présence des oocystes de *T. gondii* dans le sol est limitée par le peu de connaissances de la répartition spatiale du parasite et de sa diffusion dans le sol, que ce soit par l'intermédiaire des vers de terre, du drainage, de l'activité des arthropodes ou d'autres facteurs non connus. Compte-tenu de l'habitude des chats d'enterrer leurs fèces, les oocystes pourraient être présents jusqu'à 10 cm de profondeur dans le sol (Frenkel et al., 1975). Par ailleurs, les conditions de survie des oocystes pourraient déterminer leur répartition spatiale, puisqu'on en retrouve plus fréquemment dans des zones humides et ombragées que dans des zones plus sèches (Frenkel et al., 1975). Enfin, il est probable que la distribution spatiale des oocystes soit conditionnée par le comportement de défécation des chats, qui détermine la distribution spatiale des fèces, à partir desquelles les oocystes diffusent dans le sol. Aucune étude n'a cependant analysé la relation entre contamination environnementale et comportement d'élimination du chat.

Les oocystes sporulés peuvent survivre jusqu'à 18 mois dans des sols ensemencés expérimentalement et soumis à des températures allant de -20°C à +35°C (Frenkel et al., 1970 ; Frenkel et al., 1975). La survie des oocystes est surtout affectée par des périodes de chaleur (>35°C pendant plusieurs jours) ou de déshydratation (Dubey et al., 1970 ; Frenkel et al., 1975 ; Dubey 1998b).

Les méthodes de récupération des oocystes dans les échantillons de sol s'appuient sur le protocole développé par Dubey et al. (1972) pour leur détection dans les fèces de chats. Ces méthodes reposent sur la succession de plusieurs étapes après la récolte des échantillons : homogénéisation de l'échantillon, filtration, flottaison (sucrose de densité 1.15) et inoculation

à la souris (Ruiz et al., 1973 ; Coutinho et al., 1982 ; Dubey et al., 1995c ; Frenkel et al., 1995). L'étape d'inoculation à la souris peut être remplacée par une détection de l'ADN parasitaire par une méthode moléculaire (PCR). Or, les méthodes de concentration des oocystes et les techniques de PCR et d'inoculation peuvent être gênées par la présence de nombreux débris (causes d'inhibition dans le cas des méthodes moléculaires et de mortalité non spécifique dans celui de l'inoculation).

1.5.3. Survie des oocystes et variations spatio-temporelles de la prévalence

La sporulation ou la survie des oocystes étant affectées par des températures fortes et/ou un niveau d'humidité faible, la variabilité des conditions climatiques joue probablement un rôle lors de la phase libre de *T. gondii* dans l'environnement (AFSSA, 2005). Bien que les variations de prévalence chez l'homme à large échelle géographique puissent en partie être expliquées par des différences de structure d'âge, d'habitudes culturelles ou alimentaires (Tenter et al., 2000), elles sont généralement rapportées comme dues à des différences climatiques. Ainsi, au niveau mondial, la toxoplasmose est plus fréquente chez l'homme dans les régions à climat tempéré ou chaud et humide que dans les régions à climat froid et sec (Tenter et al., 2000). Aux Etats-Unis, les séroprévalences les plus faibles sont relevées dans les populations humaines vivant dans les zones les plus arides (Vollaire et al., 2005). En France, les différences nationales de séroprévalence chez l'homme pourraient en partie être expliquées par les variations géographiques et climatiques. Les plus faibles séroprévalences sont observées dans des régions de montagne à climat hivernal rude (Est, Vosges, et Jura, 35%), alors que dans les régions à hiver plus doux (Méditerranée, sud-ouest et nord-ouest), les séroprévalences dépassent 55% (Ancelle et al., 1996). En Guadeloupe, la séroprévalence chez l'homme est également associée à de fortes valeurs de pluviométrie (Barbier et al., 1983).

L'indice NAO (North Atlantic Oscillations) mesure les différences de pression atmosphérique entre l'anticyclone des Açores et l'Islande (Hurrell, 1995). Cet indice résume, à une large échelle géographique, les variations inter-annuelles du climat. Hubálek (2005) a mis en relation les valeurs de cet indice avec la séroprévalence relevée chez l'homme en république Tchèque de 1951 à 2003. Les valeurs de NAO associées à des hivers doux (fortes températures hivernales et forte pluviométrie) sont reliées à des augmentations des

séroprévalences observées chez l'homme. Les auteurs expliquent cette relation par la probabilité d'une meilleure survie des oocystes durant les hivers les plus doux.

Chez le chat domestique, quelques études ont montré des variations temporelles de la prévalence, sans évoquer la possibilité de fluctuations des conditions de survie des oocystes : Salant & Spira (2004) rapportent une prévalence plus élevée en été que durant les autres saisons dans une population de chats domestiques errants à Jérusalem. Frenkel et al. (1995) relèvent une variation interannuelle de la prévalence chez le chat au Panama (29 à 61% sur 5 ans), mais les auteurs ont obtenus trop peu d'échantillons de sol positifs pour faire le lien entre ces variations de prévalence et la contamination du sol par les oocystes. Comme chez l'homme, la prévalence chez le chat est régulièrement décrite comme variant entre régions, que ce soit entre différentes villes du Brésil (São Paulo, Guarulhos et Breeder, 10 à 40%, Silva et al., 2002), ou de l'Ohio (14 à 79% ; Dubey et al., 2002).

L'étude de la contamination de l'environnement par les oocystes de *T. gondii* doit tenir compte, d'une part, des difficultés d'analyse en laboratoire pour lesquelles des améliorations sont possibles et, d'autre part, de la difficulté de trouver des oocystes de manière exploratoire. Nous supposons que cette contamination est reliée au comportement de défécation des chats. Par ailleurs, la possibilité des variations des conditions de survie des oocystes en fonction du climat doit être prise en compte dans l'étude de la transmission du parasite.

1.6. Objectifs de l'étude et hypothèses testées

L'objectif de cette thèse est de caractériser la variabilité de la dynamique de transmission du cycle de *T. gondii* en fonction de l'environnement. Cette étude ne se veut pas comparative, mais elle vise à caractériser la dynamique de transmission du cycle dans des environnements contrastés, choisis pour leurs différences dans la structure et le fonctionnement des populations d'hôtes. L'ensemble de nos travaux a été conduit sur la base du suivi sérologique de populations naturelles de chats, composées de groupes d'individus vivant en un lieu défini et pouvant se rencontrer et interagir, par exemple pour la reproduction (Courchamp, 1996). Nous nous sommes ainsi placés à deux échelles d'étude : celle d'une population de chats, et celle de plusieurs populations de chats ou d'hôtes intermédiaires (Figure 1.12). Ce mémoire s'articule autour de deux parties construites sur la base de publications scientifiques : dans la première, nous nous sommes placés à l'échelle d'une population de chats domestiques errants en milieu urbain où la densité d'hôtes intermédiaires est faible comparée à celle des chats ; dans la deuxième partie, nous avons étudié la dynamique de transmission de *T. gondii* en milieu rural, en milieu forestier et en milieu non anthropisé où, dans les trois cas, la densité d'hôtes intermédiaires est bien plus élevée que celle des hôtes définitifs.

1.6.1. Milieu avec faible densité d'hôtes intermédiaires

A Lyon, dans le site de l'hôpital de la Croix-Rousse, une population de chats domestiques errants vit en très forte densité dans les parcs et les sous-sols de l'hôpital, où ils sont nourris par des volontaires. Les rues et les avenues fortement empruntées qui entourent l'hôpital limitent la dispersion des chats (Say et al., 1999), ce qui peut contribuer à concentrer la transmission du parasite dans ce site de 7,5 hectares.

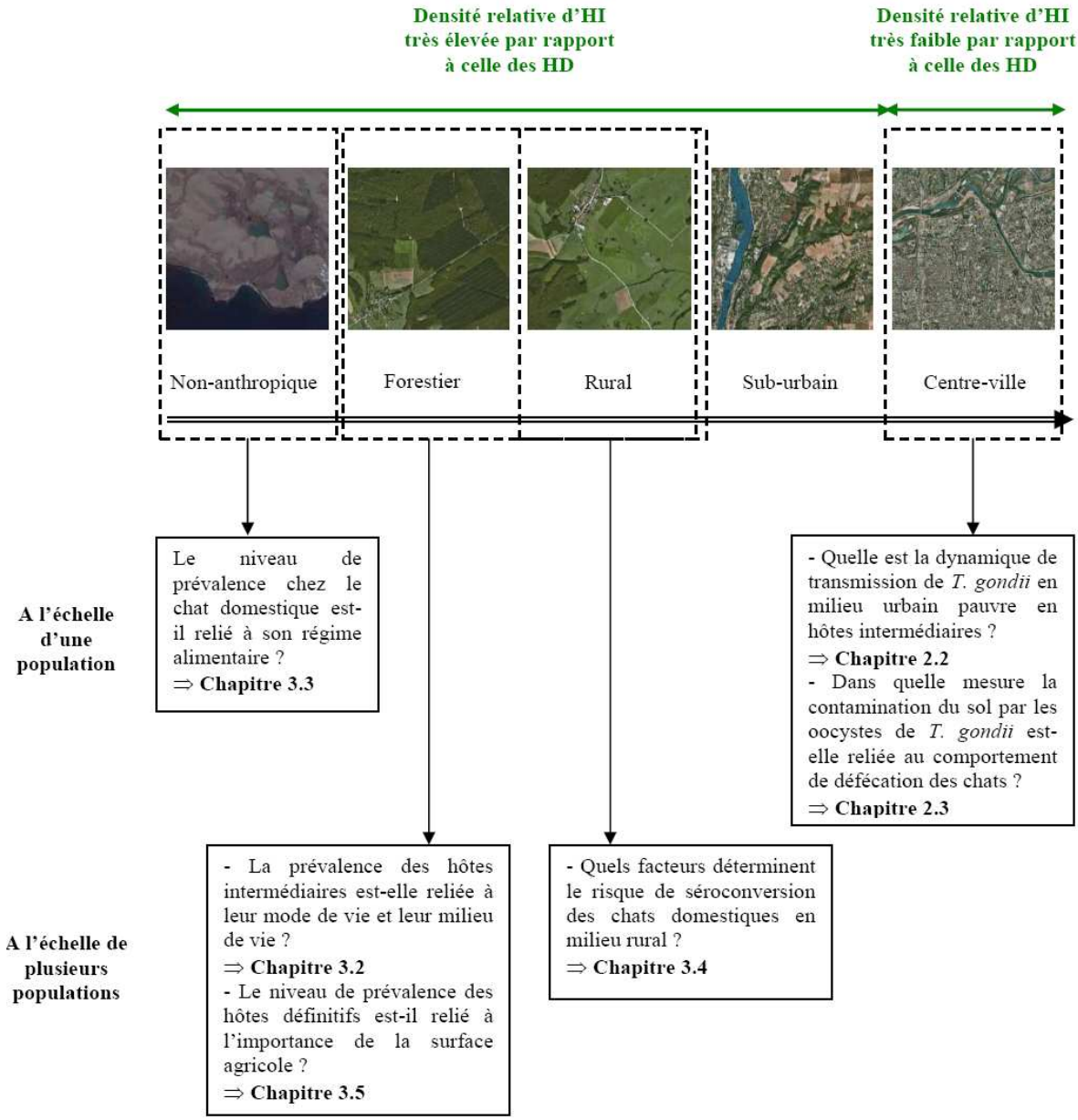


Figure 1. 12. Objectifs de l'étude aux différentes échelles de perception. HI = hôte intermédiaire, HD = hôte définitif.

En accord avec les hypothèses de Choisy et al. (2003), nous supposons que, dans ce type d'environnement, le cycle de *T. gondii* est simplifié et repose essentiellement sur la transmission du parasite des chats à l'environnement et de l'environnement aux chats. Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux était :

- d'analyser la variabilité temporelle et spatiale de la dynamique de la transmission de *T. gondii* dans la population de chats errants de l'hôpital de la Croix-Rousse

(**Chapitre 2.2**). Nous avons supposé que la transmission du parasite dans cet environnement dépend essentiellement de la contamination du sol par les oocystes. Nous nous attendions donc à ce que la variabilité spatiale et temporelle de la prévalence de *T. gondii* chez les chats soit liée aux conditions de survie des oocystes.

- de caractériser la contamination spatiale du sol par les oocystes de *T. gondii* (**Chapitre 2.3**). Nous supposions que, dans une telle population de chats, les zones de défécation étaient limitées à quelques points dans le domaine vital, utilisées par plusieurs individus. De plus, nous avons considéré que, si l'excrétion des oocystes par les chats nouvellement infectés se fait dans ces zones de défécation, ces dernières devaient être plus souvent contaminées que le reste du site.

1.6.2. Milieux avec forte densité d'hôtes intermédiaires

Nous avons également étudié la dynamique de transmission de *T. gondii* dans un milieu avec forte densité relative d'hôtes intermédiaires par rapport à celle des hôtes définitifs. Cette situation prévaut dans des milieux contrastés, depuis les zones périurbaines jusqu'au milieu non anthropisé, en passant par le milieu rural, les forêts ainsi que des milieux spécifiques comme les îles ou les déserts. La variabilité de la structure des populations de chats, des habitudes des individus pour ce qui est du régime alimentaire et des lieux de défécation, de la composition de la végétation ou des communautés de micro-mammifères d'un type de milieu à l'autre, peuvent influencer le cycle de *T. gondii* à différents niveaux. Nous supposions donc que la prévalence dans les populations d'hôtes intermédiaires varie elle aussi d'un type de milieu à l'autre et, par conséquent, que celle des populations d'hôtes définitifs soit elle aussi variable en fonction de l'environnement. La composition du paysage, et l'importance des hôtes intermédiaires dans le régime alimentaire des chats, sont alors déterminants dans la dynamique de propagation du parasite. C'est pourquoi l'objectif de nos travaux était :

- d'estimer la prévalence de *T. gondii* dans des populations d'hôtes intermédiaires vivant dans différents habitats (milieu ouvert / milieu forestier) et ayant un mode de vie différent (fouisseur / vivant au sol) (**Chapitre 3.2**). Nous avons notamment supposé que les animaux vivant sous la surface du sol et creusant des galeries étaient plus exposés aux oocystes que ceux vivant en surface.

- d'étudier le lien entre la prévalence de *T. gondii* dans les populations de chats domestiques et la composition du régime alimentaire de ces chats (**Chapitre 3.3**). Cette étude a été conduite sur une population de chats vivant en très faible densité et territoriaux, dans un environnement extrême où ils survivent uniquement par la prédation. Nous nous attendions à ce que le cycle de *T. gondii* dans cet environnement privilégie le carnivorisme et que la prévalence soit plus élevée que dans la population de la Croix Rousse où les chats consomment relativement peu d'hôtes intermédiaires.

- de mettre en évidence des facteurs caractérisant des chats domestiques « à risque » (**Chapitre 3.4**). En effet, en milieu rural, le mode de vie des chats peut être fortement variable : errants, chats de propriétaires autorisés à sortir ou non, chats vivant en groupe ou solitaires. L'objectif était ici de déterminer les facteurs comportementaux, populationnels et climatiques qui modulent le risque de transmission de *T. gondii*, chez des chats vivant dans le même environnement.

- de relier le niveau de prévalence des chats domestiques et chats forestiers vivant à l'écart de l'homme, principaux hôtes définitifs de *T. gondii* en milieu forestier, à l'importance de la surface agricole dans le paysage et au nombre d'exploitations agricoles (**Chapitre 3.5**). La proportion de milieux ouverts et, notamment, de prairies permanentes dans le paysage a un effet sur la densité des campagnols, tandis que la présence de fermes d'élevage est synonyme d'une abondance de rongeurs commensaux, les uns comme les autres étant des hôtes intermédiaires potentiels.

Enfin, en raison des variations temporelles et spatiales qui peuvent influencer la dynamique des populations d'hôtes intermédiaires et d'hôtes définitifs, ainsi que la survie des oocystes, nous avons recherché des variations spatio-temporelles dans le niveau d'infection de toutes les populations de chats étudiées.

Deuxième partie

Dynamique de la transmission de la toxoplasmose dans une population urbaine de chats domestiques

Les yeux de la chatte, fixés sur l'oiseau avec une intensité fascinatrice, disaient dans un langage que le perroquet entendait fort bien et qui n'avait rien d'ambigu : «Quoique vert, ce poulet doit être bon à manger ».

Théophile Gautier
Ménagerie intime

2.1. Introduction

Dans cette partie de nos travaux, nous analysons la dynamique de la transmission du cycle de *T. gondii* dans un site particulier urbain. En ville, les populations de chats domestiques peuvent atteindre de très fortes densités locales, et exposer particulièrement l'homme à des risques de transmission de zoonoses.

2.1.1. Le chat en milieu urbain

Des populations naturelles de chats domestiques errants sont présentes en zone urbaine depuis plusieurs siècles dans des sites variés (Turner & Bateson 2000). On les retrouve essentiellement dans les jardins des hôpitaux (Zaunbrecher & Smith, 1993), les parcs (Neville & Remfry, 1984 ; Natoli, 1985), les cimetières (Chagot, 1993), ou encore les squares (Haspel & Calhoon, 1989). Profitant des déchets alimentaires liés à l'activité humaine et disponibles en abondance, ou de la nourriture fournie par les amis des chats (Haspel & Calhoon, 1989 ; Arois et al., 2002), certaines populations peuvent atteindre des densités importantes, allant jusqu'à 20 chats/ha dans des parcs urbains en Italie (Natoli, 1985). Il n'est pas rare que dans des sites où les ressources anthropogéniques sont disponibles en abondance, elles constituent la principale source d'alimentation des chats : d'une part l'abondance de rongeurs peut être limitée par la présence de chats (Dickman, 1987), et d'autre part l'apport de nourriture peut réduire la motivation à chasser chez le chat (Turner & Batseon, 2000).

L'abondance des ressources favorise l'installation de groupes de femelles profitant des éléments favorisant la survie de leurs portées, ainsi que de mâles (Macdonald, 1983 ; Turner & Bateson, 2000). Les populations urbaines de chats errants sont ainsi souvent caractérisées par de grands groupes sociaux ayant une importante promiscuité sexuelle (Turner & Bateson, 2000; Say et al., 1999) : mâles et femelles partagent en partie leur territoire et chacun peut avoir plusieurs partenaires sexuels au cours d'une même période de reproduction.

2.1.2. Les risques de zoonoses dues aux chats urbains

De tels groupes de chats, vivant dans des zones limitées à quelques hectares, augmentent localement les risques de contact et de transmission de maladies à l'homme, notamment celles qui se transmettent via les fèces des chats (Altizer et al., 2003 ; Young & Thackston, 1999). L'importance de ces dernières dans la contamination de l'environnement par des parasites n'est pas négligeable : dans une étude menée aux Etats-Unis, les auteurs estiment que les chats errants répandent chaque année près de 30 tonnes de fèces dans une commune de 2940 ha (Dabritz et al., 2006). La quantité de parasites qui peuvent être répandus par les fèces des chats en milieu urbain doit donc être importante. De plus, la répartition spatiale des chats doit entraîner une présence fortement hétérogène des parasites transmis par leurs fèces dans l'environnement.

Ainsi, le comportement de défécation des chats pourrait déterminer la distribution spatiale de la contamination environnementale : une étude dans un parc urbain au Japon rapporte l'existence de zones de défécation communes à 24 chats, et qui seraient contaminées par la présence d'œufs de *Toxocara canis* et *Toxocara cati* (Uga et al., 1996). Ces zones de défécation réparties sur le territoire des chats pourraient constituer des sites propices à la concentration de nombreuses formes libres de parasites dans des lieux très localisés et à proximité de l'homme. L'étude de la dynamique de la transmission des maladies parasitaires dans les populations de chats est donc d'un intérêt majeur pour la compréhension du niveau d'exposition de l'homme en milieu urbain.

2.1.3. La toxoplasmose en milieu urbain

L'estimation de la prévalence de toxoplamose chez les chats urbains est très variable d'une étude à l'autre : elle varie entre 5 et 71 % de séropositifs selon les études (Tableau II.1). Une telle variabilité peut être expliquée par de nombreux facteurs, parmi lesquels l'âge (Dubey & Beattie, 1988 ; Maruyama et al., 2003 ; Gauss et al., 2003), le mode de vie (errant ou chat de propriétaire ; Lucas et al., 1999 ; Gauss et al., 2003), le sexe (Dorny et al., 2002 ; Jittapalapong et al., 2006), l'année ou la saison de capture (Salant & Spira, 2004). La difficulté d'interprétation de telles études réside dans le fait que la plupart d'entre elles ne

considèrent pas tous ces facteurs simultanément, ceci pouvant entraîner des biais dans l'interprétation. Ainsi, dans l'étude de Salant & Spira (2004) les chats de propriétaire sont plus souvent positifs que les chats errants, mais comme ils sont aussi plus vieux, il est difficile de savoir si la différence de prévalence est due au mode de vie des individus ou à leur âge. Cependant, des méthodes statistiques, comme la régression logistique, permettent de prendre en compte toutes les variables simultanément pour estimer l'effet de chaque variable ajusté sur les autres variables prises en compte, ce qui permet d'éviter les biais de confusion (Bouyer, 1991).

Tableau II.1. Prévalence des anticorps anti-*Toxoplasma gondii* chez le chat domestique urbain.

Pays	Années du suivi	Prévalence (%)	Effectif	Méthode sérologique[a]	Seuil de positivité	Provenance[b]	Référence
Argentine	1993	20	169	IHAT	1:32	1	Fernandez et al., 1995
Australie	< 1999	40	103	ELISA	Non précisé	1	Sumner & Auckland, 1999
Bangladesh	1995	33	24	LAT	1:4	1	Samad et al., 1997
Brésil	1996-1997	18	248	IFAT	1:40	1	Lucas et al., 1999
Brésil	1999-2000	40	100	ELISA	Non precisé	1	Meireles et al., 2004
Espagne	< 2003	45	220	MAT	1:25	1	Gauss et al., 2003
France	< 1997	43	519	IFAT	1:50	1	Cabannes et al., 1997
France	< 1998	43	506	IFAT	1:50	1	Cabannes et al., 1998
Iran	2002	63	100	IFAT	1:64	1	Haddadzadeh et al., 2006
Israel	1999-2000	14	934	ELISA	1:80	1	Salant & Spira, 2004
Japon	1994-1995	9	471	LAT	1:64	1	Maruyama et al., 1998
Japon	1994-1999	5	1447	LAT	1:64	1	Maruyama et al., 2003
Japon	< 1998	6	800	LAT	1:64	1	Nogami et al., 1998
République Tchèque	1995-1997	61	390	IFAT	1:10	1	Svobodova et al., 1998
Belgique	1998-2000	70	346	DAT	1:40	2	Dorny et al., 2002
Brésil	1993-2000	26	132	MAT	1:20	2	Silva et al., 2002
Italie	< 1997	33	490	ELISA	1:32	2	D'Amore et al., 1997
Panama	1987-1992	46	241	DAT	Non précisé	2	Frenkel et al., 1995
Thaïlande	2001-2002	11	592	LAT	1:64	2	Jittapalapong et al., 2006
USA (Floride)	1999-2000	9	553	ELISA	1:64	2	Luria et al., 2004
USA (Ohio)	<2002	39	151	MAT	1:25	2	Dubey et al., 2002
Espagne	< 2004	32	585	IFAT	1:80	Non précisé	Miró et al., 2004
France	2003	39	26	DAT	1:64	Non précisé	Meunier et al., 2006
Mexique	< 1999	71	24	ELISA	Non précisé	Non précisé	Galvan Ramirez et al., 1999

[a] DAT, direct agglutination test; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFAT, indirect immunofluorescent antibody test; IHAT, indirect haemagglutination test; LAT, latex agglutination test; MAT, modified agglutination test. [b] 1 : cliniques vétérinaires, organismes de protection des animaux, refuges, centres d'étude, facultés de médecine vétérinaire ; 2 : chats errants capturés pour les besoins de l'étude ou par des organismes pratiquant des captures-stérilisation-relâché.

La grande majorité des études relatives à la toxoplamose féline en milieu urbain vise à estimer la séroprévalence d'échantillons de chats sans aucune relation entre eux, constitués par des individus collectés dans des cliniques vétérinaires, des organismes de protection des animaux, des refuges, des centres d'étude ou des facultés de médecine vétérinaire. Par ailleurs, peu d'études sont basées sur la prise en compte des populations naturelles. Ce biais d'échantillonnage peut entraîner un biais dans l'estimation de la prévalence, notamment car les individus sélectionnés ne sont pas représentatifs des populations étudiées : moins de 10% des chats vivant en population naturelle sont soignés chez un vétérinaire (estimation dans les populations suivies par notre équipe ; Courchamp, 1996) ; de plus, ces chats peuvent déjà présenter des signes cliniques (raison de leur visite chez un vétérinaire) ; ou dans le cas des chats capturés, la structure d'âge peut être biaisée vers des animaux jeunes et naïfs. L'âge des individus est d'ailleurs rarement pris en compte dans l'étude des facteurs de risque chez le chat, alors qu'il apparaît clairement que les chats âgés ont plus de chances que les jeunes chats d'avoir été en contact avec le parasite au cours de leur vie (Dubey & Beattie, 1988).

Une deuxième difficulté dans l'analyse de la prévalence des anticorps anti-*T. gondii* chez le chat réside dans le fait que les tests sérologiques utilisés dans les différentes études sont nombreux et leur seuil de positivité est fixé par les auteurs (Tenter et al., 2000). En effet, il n'existe pas de standardisation du seuil de significativité des différentes techniques sérologiques employées dans le diagnostique de la toxoplasmose (Derouin et al., 1994). L'intérêt d'une étude comparative de la dynamique de la transmission de *T. gondii* dans plusieurs populations de chats prend donc ici tout son sens : l'utilisation du même test sérologique et du même seuil de positivité sur un échantillon représentatif de plusieurs populations peut permettre d'émettre des hypothèses sur les différentes voies de transmission de la toxoplasmose chez le chat.

2.1.4. Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est d'étudier le cycle de *T. gondii* dans une population urbaine de chats errants peu dépendante de la prédation. Notre étude est conduite sur la population de chats de l'hôpital de la Croix-Rousse à Lyon caractérisée par une densité de population élevée (9,7 ± 0,5 chats/ha ; Devillard et al., 2003). Les chats vivent dans les jardins et les parkings de l'hôpital, dont la superficie est d'environ 7,5 ha. L'hôpital est

entouré de rues à forte circulation, ce qui limite la dispersion des individus. Les chats sont nourris quotidiennement par des volontaires (retraités ou personnels de l'hôpital) avec des restes de la cantine de l'hôpital ou de la nourriture commerciale, répartis en abondance dans quatre à huit points de nourrissage distribués sur toute la surface de l'hôpital. Les mesures de dératisation et la forte densité de chats sur le site entraînent une faible densité de rongeurs. Ces derniers ne doivent constituer qu'une partie mineure du régime alimentaire des chats. Le site de l'hôpital de la Croix-Rousse apparaît donc comme très approprié pour étudier la perpétuation d'un éventuel cycle direct de transmission du parasite entre le chat, l'environnement, et le chat. On s'attend donc à ce que la prévalence des chats de l'hôpital de la Croix-Rousse soit reliée à leur possibilité de contact avec les oocystes de *T. gondii*, que l'on suppose importante sur le site d'étude. La forte densité de chats implique en effet une possibilité de contamination, entraînant une contamination des autres chats qui utilisent ces zones.

Dans un premier temps, l'objectif de nos travaux était de déterminer les facteurs qui influencent la transmission de *T. gondii* dans la population de chats de l'hôpital de la Croix-Rousse. Un suivi sérologique des anticorps anti-*T.gondii* a été entrepris chez des chats capturés de 1994 à 2004, grâce au test d'agglutination direct modifié. Une partie préliminaire de nos travaux était de fixer un seuil de positivité qui serait utilisé pour ce test dans les autres populations de chats suivis par l'équipe.

Ce chapitre est basé sur la publication suivante :

Eve AFONSO, Philippe THULLIEZ, and Emmanuelle GILOT-FROMONT. 2006. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *International Journal for Parasitology*, 36: 1373-1382.

Dans un second temps, nous avons cherché à caractériser la contamination du sol par les oocystes de *T. gondii* en mettant en pratique une nouvelle technique de détection d'ADN de *T. gondii* par la méthode de Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitative (Romand et al., 2003). Nous avons couplé une étude du comportement de défécation des chats de l'hôpital à un échantillonnage du sol pour caractériser la distribution spatiale de la contamination par les oocystes de *T. gondii*.

Ce chapitre est basé sur la publication suivante :

Eve AFONSO, Mélissa LEMOINE, Marie-Lazarine POULLE, Marie-Caroline RAVAT, Stéphane ROMAND, Philippe THULLIEZ, Isabelle VILLENA, Dominique AUBERT, Muriel RABILLOUD, Benjamin RICHE, and Emmanuelle GILOT-FROMONT. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *International Journal for Parasitology*, In press.

2.2. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*).

Eve AFONSO, Phillipe THULLIEZ et Emmanuelle GILOT-FROMONT.

International Journal For Parasitology 36 (13), 1373-1382 (2006).

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite that infects humans and animal species worldwide. The relative importance of each potential transmission route in the complex life cycle of this coccidia is largely unknown, due to the lack of studies taking into account all routes simultaneoulsy. In this study, we analyzed the transmission of *T. gondii* in an urban population of stray cats captured between 1993 and 2004. Analyzing prevalence, our aim was to determine which factor influence transmission in this population. Specific *anti-T.gondii* IgG antibodies were detected using the modified agglutination test. Firstly, we analyzed the kinetics of antibody titers in cats captured several times, using mixed linear models and correspondence analysis. We showed that antibody titers did not vary significantly with time and that titer 40 was the best threshold to separate individuals into two serological groups. Overall, prevalence was only 18.6%, thus transmission of *T. gondii* is unfrequent in this population. As expected, a highly significant association was detected between age and presence of IgG antibodies. Prevalence was lowest in kittens aged 3-4 months old, suggesting that newborn kittens may carry maternal antibodies and that vertical transmission is rare. After taking into account the effect of age, logistic regression showed that antibody carriage was related to factors that possibly related to the survival of oocysts: localization in the study site, origin of the cats, maximal temperatures and rain. Our results suggest that in this population, vertical transmission is rare, low predation limits prevalence, and oocysts survival is a determining factor in the risk of infection. We discuss the more general importance of conditions determining oocyst survival in the life cycle of *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, epidemiology, feral cat, oocyst.

2.2.1. Introduction

Toxoplasma gondii is a worldwide spread protozoan parasite that can probably infect a variety of animal species. In humans, infection may cause abortions or severe clinical signs on foetus, neonates and immunocompromised individuals (Dubey and Beattie, 1988). The domestic cat *Felis catus* is a key species for the maintenance of this parasite. Cats excrete environmentally-resistant oocysts that may infect various intermediate hosts. These hosts include small mammals and birds, which complete the life cycle of the parasite when they are preyed upon by cats, or meat-producing animals that may infect humans (Dubey and Beattie, 1988). Cat may also be contaminated vertically: experimental studies documented that infection may occur transplacentally (Sato et al., 1993; Dubey et al., 1996) or during the neonatal period via the milk of the mother (Dubey et al., 1995b; Powell et al., 2001). However, after experimental infection of mothers, kittens appear to be rarely infected (Dubey and Hoover, 1977; Dubey et al., 1995b). Dubey and Hoover (1977) propose that vertical transmission is thus not an important route in perpetuation of the disease under natural conditions. Finally, cats may be infected by ingesting oocysts from the environment. Oocysts survive short periods of heat and dehydration, but may remain infectious in moist soil for at least 18 months (Frenkel et al., 1975; Tenter et al., 2000). However, oocysts were shown to be less infective to cats than to mice: a high number of oocysts are required to determine infection in cats (Dubey, 1996).

Natural populations of domestic cats are present worldwide, from non-anthropized to urban areas. As for other carnivores, the density and spatial organization of cats depend on the abundance and distribution of resources. Cats developed highly variable population structures, from solitary-living individuals living in low-density populations of cats fed on predation in non anthropized areas, to social grouping in high-density populations fed by humans (Macdonald, 1983; Liberg and Sandell, 1988). Such variability may affect the opportunities for toxoplasmosis transmission and maintenance. Transmission dynamics in a given environment may thus be elucidated by considering all relevant elements, including physical characteristics, the presence of possible intermediate hosts and the structure of cat populations.

We analyze the transmission of *T.g.* in one urban population of stray cats taking into account these elements. We detect specific antibodies in cats captured, marked, and recaptured between 1993 and 2004 in the Croix-Rousse hospital of Lyon (France). Cats live

in a 7.5 ha site partly isolated by walls and busy traffic roads (Say et al., 1999). The population is stable and comprises a mean of 70 cats living at high density (9.7 ± 0.5 cats/ha, Devillard et al., 2003).

In the hospital, rodents are rare and cats are fed abundantly, thus we predicted that predation would not be an important route of transmission in this population. As described above, vertical transmission would not be a major component of toxoplasmosis incidence. In contrast, infection due to oocysts should be facilitated by high cat density and by social behaviour: for example, cats use common places to defecate (Fromont et al., unpublished observations). We predicted that infection due to predation should be rare and that oocysts survival should be an important factor in the perpetuation of the life cycle of the parasite in the Croix-Rousse site.

2.2.2. Materials and methods

Population and sampling

The studied population is located in the parks and grounds of the Croix-Rousse hospital of Lyon city (France). Cats are fed daily by volunteers, with canteen waste and canned food deposited at four to eight feeding points distributed throughout the hospital grounds. The population was monitored between January 1993 and October 2004 by visual observations along a pre-defined circuit and trapping sessions were organized twice yearly in the hospital. Trapping periods lasted on average 5 days. Baited two-doors traps were spread over the areas where cats had been observed. Although dispersal is limited (Devillard et al., 2003), regular observation allowed us to identify individuals that entered the population as adults, probably from surrounding stray populations or houses. The experimental protocol was approved by the Director of Veterinary Services, Rhone Department.

Cats were individually identified by coat colour patterns recorded through visual observation or subcutaneous transponders (Courchamp et al., 2000). Captured cats were anaesthetised and a blood sample was taken from the jugular vein and faeces were sampled when feasible. We recorded the age, gender, health condition, origin and localization of each captured cat. Age (*Age*) was known to the nearest month for cats born in the population

during the study (70.4% of all cats) and was estimated for other cats according to teeth development and body mass (Courchamp et al., 2000). We tested the influence of the gender (variable *Gender*), although no relationship was found with prevalence (Fernandez et al., 1995; Miró et al., 2004). Health condition (*Health*) was assessed as good or bad from clinical examination during capture: individuals presenting any observable pathology were recorded as in bad condition. Origin (*Origin*) was recorded either as born within (if the cat has been seen before 6 months old in the hospital) or without (outside) the hospital. Under the hypothesis that oocyst survival determines the risk of infection, cats originating from other areas may have different risk factors from cats that have always lived on the site.

Finally, the site is divided into two separated areas that contain genetically distinct cats, as shown by microsatellite analysis (Devillard et al., 2004). This genetic structure reflects the spatial structure of the population. Among cats that were visually observed in 2003, 34.7% were observed only in the northern part, 53.1% in the southern part and 12.2% were observed in both areas. The northern and southern parts of the hospital also differ in vegetation cover. The northern part of the hospital covers 3.3 ha, of which 39.7% (1.3 ha) is not covered by buildings and can be used by cats, while the southern part covers 4.2 ha, of which 74.8% (3.1 ha) can be used by cats. In the area not covered by buildings, we used a grid of 9 m x 9 m squares. In squares where at least one cat had been visually observed during the year 2003, we recorded the main cover of the square as vegetation or hard surface. In the northern part, 84.9% of the surface used by cats has vegetation, compared with 76.9% for the southern part. Finally, there were regular attempts made to poison rodents in all buildings, but no rodent was observed during the study period. We thus have no information on the respective density of rodents in northern and southern part of the site. However, observations of cats hunting are rare: from 6,820 visual observations where activity was reported, hunting was reported only 26 times (20 times in the northern part and six times in the southern part). We thus expected that living in the northern or southern part of the site would affect risk exposure to infection or cat immune response. Localization (*Loca*) was the area where the cat was visually observed: North or South. The few cats that used both areas were not considered in the analysis.

We tested the effect of the capture season, which was analyzed previously (Salant et al., 2004). Capture sessions were classified as realized in spring (March or April, except one session in July) or in autumn (September or October, except one session in December and one in January) (variable *Season*). To test the effect of cat density, which may determine environmental contamination, we estimated cat population size at each capture session

(*Popsize*), as the total number of distinct cats that were visually observed during the capture period.

We tested the effect of temperature by considering the mean of maximal daily values per decade. Because we hypothesized that the intensity of heat periods was more important than their duration, we took the maximal value observed during the 12 months preceding the capture (*Tmax*). Concerning precipitations, we hypothesized that moisture was determinant for oocysts survival all year round, we thus used mean rain per decade over the 12 months preceding the capture (*Rain*). Meteorological data for the city of Lyon were obtained from MétéoFrance (Bron, France). Between 1993 to 2004, rainfall have varied from 40 to 140mm during the rainy season (Avril to October), and from 2 to 10mm during the drier season (November to March). For the same period (1993-2004), temperatures varied between –5°C and 18°C during the rainy season and between 5°C to 37°C during the drier season.

Serological methods

Blood samples were centrifugated and stored at -20°C. Sera were diluted twofold starting at 1:20 dilution and tested for IgG antibodies to *T.gondii* using the modified agglutination test (MAT; Dubey and Desmonts, 1987). The MAT is recorded as the most sensitive and specific test available (Dubey et al., 1995a; Dubey et al., 1995c; Dubey, 1997). Results were recorded as titers, *i.e.*, the inverse of the highest positive dilution. Sera that did not react at dilution 1:20 were quoted as titer < 20.

We tested whether carrying the Feline Immunodeficiency Virus (FIV) or the Feline Leukemia Virus was correlated to *T. gondii* antibody prevalence, as reported previously (FeLV, D'Amore et al., 1997; Dorny et al., 2002). Sera were screened for FIV antibodies and FeLV p27 antigen using the ELISA method with a commercial kit (Snap-test FeLV-FIV, IDEXX, Cergy Pontoise, France). The sensitivity and specificity of the Fiv ELISA equal 93 and 98%, respectively, while these values approach 100% for FeLV tests (McCaw, 1994). Cats were recorded as positive or negative for FIV (*FIV*) and FeLV (*FeLV*).

Antibody kinetics

Taking advantage of individuals that were captured several times, we first described the evolution of antibody titer with time and searched for factors influencing antibody response. Seroconversion was estimated to have occurred when a cat aged less than six months had a titer of 40 or more (see below for definition) or when an older cat showed a titer of 40 or more after having a lower titer 6 months before. In all cats that seroconverted, the first positive test was used as the immune response at time = 0, and further tests were characterized by time since the first positive test. We used a linear mixed model on the logarithmic transformed antibody titer (base 2; Dohoo et al., 2003) to analyse these kinetics.

The random effect of an individual was tested both on the antibody titer at seroconversion and on its evolution with time. As fixed effects, we introduced *time since seroconversion* and variables that may reflect cat's immune capacity: *Health* represents health status that may affect immunity, *FIV* and *FeLV* test the influence of retroviral infections on immune response. We also tested whether immune response differed between cats originating from inside or outside the site (*Origin*) and between cats living in the northern or southern area (*Loca*). These groups differ both genetically and spatially, and thus may either have different exposure or unequal immune capacities.

Random effects were introduced in the model and successively removed when non-significant, using likelihood-ratio tests (LRT > 0.20). Fixed effects and their first-order interactions were introduced in the model using a stepwise procedure: the most statistically significant variables according to the likelihood-ratio test (LRT, $P \leq 0.20$) were put into a maximal model. This model was then simplified by taking non-significant terms out using LRT (Stram and Lee, 1994). Residuals of the final model were tested for normality using the Shapiro-Wilks test.

Determination of a threshold

Determining a cut-off titer generally requires a gold standard of the infection status, which is only available in laboratory studies. In the field, only serological information is available and using results from laboratory investigations may raise difficulties if the immune

response differs from laboratory conditions. Previous studies using the MAT test considered cut-off titers between 25 (Dubey et al., 1995a) and 40 (Salant et al., 2004). Because antibody titers did not vary significantly over time for a given individual (P=0.999, see results), we searched for a threshold, either 20 or 40, that would allow us to consistently classify a given individual based on repeated values. The threshold had to be such that "seropositive cats" should rarely show titers lower than the threshold, and "seronegative cats" would rarely show titers above the threshold. This process ensured the internal coherence of the data set and the subsequent analysis.

Fuzzy correspondance analysis (FCA) was used to investigate affinity of cats for the different titers. FCA is an ordination method that uses eigenanalysis to investigate difference between samples. Here the analysis was based on antibody titers exhibited by cats weighted by their abundance (Chevenet et al., 1994). The distribution of titers in the serological profile of each individual was coded as frequency distribution per cat per titer, using a fuzzy coding procedure. A two-axes representation of the individuals for each class of antibody titers was performed. Each cat was located at the average of titers in its serological profile. In the same way, classes of antibody titers were positioned at the average of cats carrying this titer. The distribution of points representing individuals around class-labels show the average transitions between antibody titers observed in serological profiles.

Prevalence and variables associated to seropositivity

Using the threshold, we estimated antibody prevalence in the population from 1993 to 2004 and we searched for factors explaining prevalence. We random selected a single measurement per individual, to ensure the independence of data. We estimated prevalence as the proportion of cats whose titer was above the threshold.

We examined the relationship between age and infection in young cats, to assess whether infection may have been transmitted vertically. We first described this relationship using a locally weighted polynomial regression (loess) curve that provides a smoothed curve (Cleveland et al., 1992). We used logistic regression to test for the linear or quadratic effect of age. Comparison was performed using the Akaike Information Criterion (AIC): the model with lowest AIC is the best compromise between residual deviance and number of parameters

(Burnham and Anderson 2001). When two AIC values differed by less than 2, we selected the most parsimonious model, *i.e.*, with less parameters.

We also used logistic regression to search for factors associated with seropositivity in the whole sample. Because antibody response persists during several years, positive cases are expected to accumulate with age (Dubey and Beattie, 1988; Maruyama et al., 1998; Gauss et al., 2003), thus we considered age before testing the effect of any other factor. We tested for the effects of *Gender*, *FIV* and *FeLV* to test whether individual characteristics were related to infection. As previously, the variables *Origin* and *Loca* were included because cats originating from or living in different areas may differ as for their genetic background or exposure. Specifically, cats originating from outside of the site may have been infected before entering the population and may thus have specific risk factors. Finally, we tested the influence of variables describing the environment of each cat (localization and physical conditions), which were expected to reflect oocyst exposure: *Popsize* was expected to reflect environmental contamination, whereas *Season*, *Tmax* and *Rain* represented physical conditions influencing oocysts survival.

To build the model, we first examined the relationship between age and prevalence and compared several models to account for this relationship. Based on AIC values, we chose to introduce age as a continuous variable, as were *Popsize*, *Tmax* and *Rain*. Other variables were dichotomous. We tested for the effect of each variable and interaction separately, after taking into account the effect of age. We included all variables and interactions that tended to influence seroprevalence (LRT, $P < 0.2$) in a maximal model. We then simplified this model by removing terms that most decreased the AIC value. The final model was interpreted by calculating adjusted odds ratios and 95% confidence intervals to measure the strength of association between each variable and serological status. Overall fit of the final logistic equation was assessed using the Pearson goodness-of-fit test (Agresti, 1996). All statistical procedures were performed using the R 2.0.1 software (R Development Core Team, 2005. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Stastistical Computing, Vienna, Austria, 2005. http://www.R-project.org).

2.2.3. Results

Since 1993, population size varied between 37 to 94 cats, with significant variations during the study (Chi-2 = 102.7, df = 21, P < 0.001, Figure 1). Previous investigations showed that, although a capture bias toward dominant cats occurred at the beginning of the study (Courchamp et al., 2000), capture probabilities were estimated to be constant in the population (Devillard et al., 2003). A total of 656 serological tests concerning 301 individuals were carried out (1-10 tests per individual).

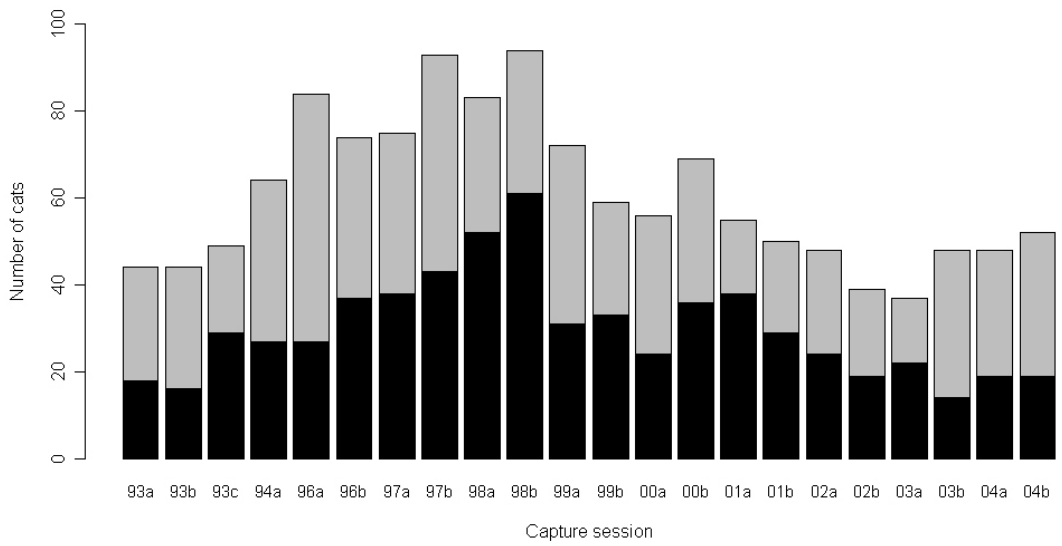


Figure 1. Population size and number of captures for each capture session. Population size is divided between captured cats (in black) and other observed cats (in grey).

Antibody kinetics

One to seven measurements per individual were realised on the 60 individuals that seroconverted during the course of the study. The evolution of titers with time was not significantly different among individuals (LRT, P = 0.999) and, for a given individual, the titer did not vary with time (LRT, P = 0.654). On the contrary, the level of antibody titer depended on the individual considered (LRT, P < 0.001). The only significant fixed factor was *Origin* (LRT, P<0.001): cats born out of the hospital had higher titers than individuals

native from the site (Table I). *Age*, *FIV*, *FeLV*, *Loca* and *Health* had non-significant effects (LRT, all P ≥ 0.300). Residuals of the selected model were normally distributed (Shapiro-Wilks test, P = 0.144).

Table I. Selected model to explain antibody titers from 60 individuals that seroconverted between 1993 and 2004.

Effects	Estimate	95% CI	P
Fixed			
Intercept	6.55	[6.02;7.08]	< 0.001
Origin (Out/In)	1.85	[0.87;2.83]	< 0.001
Random			
Individual random effect on intercept	-	[1.17;1.91]	<0.001

Threshold

Figure 2 shows the factorial map of the first two axes of the FCA, taking into account 38.54% of total inertia. The graph a gradient in the titers observed in serological profiles. Class <20 lies at the center of the axes, reflecting that a majority of cats may have a titer <20 during their life. The first axis isolates individuals having only high titer (800 and 1600) during the study. The second axis describes individuals that presented a transition between <20 and 40-400 titers. On this axis, class 20 was isolated and only related to class <20, suggesting that most cats with titer 20 only had affinities with 20 or <20. We thus placed the positive limit at titer 40.

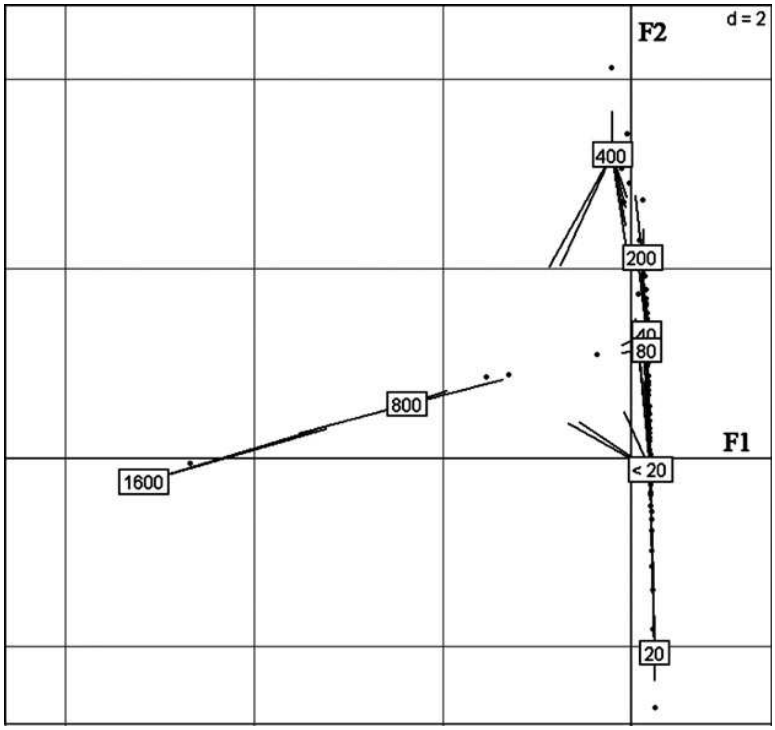


Figure 2. Factorial map of the first two axes of the fuzzy correspondence analysis. The distribution of antibody titers is indicated by value labels. Each cat is represented by a point. Each class of antibody titer is positioned at the weighted average of the coordinates of cats presenting this titer in their serologic profile. Lines represent 50% of point-cats around each titer.

Prevalence

Fifty-six of the 301 tested individuals had titers of at least 40, the crude overall prevalence thus equalled 18.6% (95% CI: 14.6 - 23.4). Of the 128 cats that were negative at first sampling, 36 seroconverted during a cumulative follow-up period of 212.42 years. The observed incidence was thus 0.169 infections per cat-years. In accordance with this low incidence, we found no oocysts in the 322 faeces samples that were examined microscopically after using the iodomercurate potassium flotation method (Bussiéras and Charmette, 1991). Seroprevalence varied across time, with a trend to increase from 1993 and 1998 and a decrease at the end of the period (Figure 3). We aimed to test whether factors explaining prevalence would account for this temporal variation.

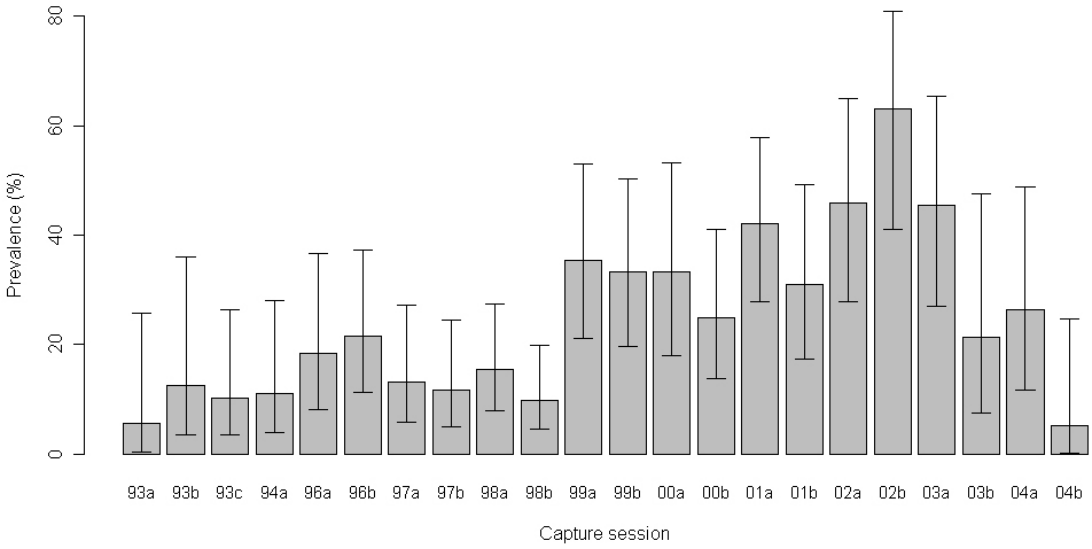
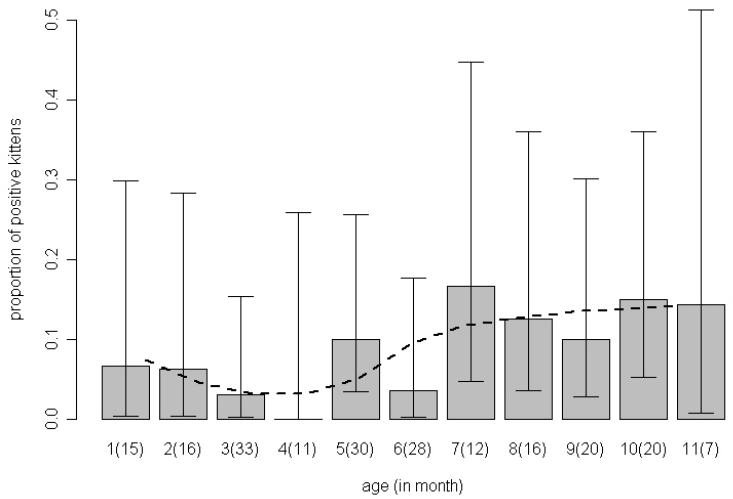


Figure 3. Prevalence of *Toxoplasma gondii* for each capture session. Lines represent 95% confidence intervals. a, b, and c represent the order of the different trapping session which were conducted each year.

Vertical transmission

The prevalence of antibodies in 208 kittens aged from 1-11 months old varied from 0 to 10% (Figure 4A). The logistic regression showed that neither a linear (AIC = 118.69) nor a quadratic effect of age (AIC = 120.64) were better adjusted than the null model (AIC = 119.72). The effect of age was thus not well described by simple functions. For that reason, we simply described the relationship between age and prevalence using a non-parametric adjustment, which showed that prevalence is lowest at 3-4 months of age (Figure 4A).

A



B

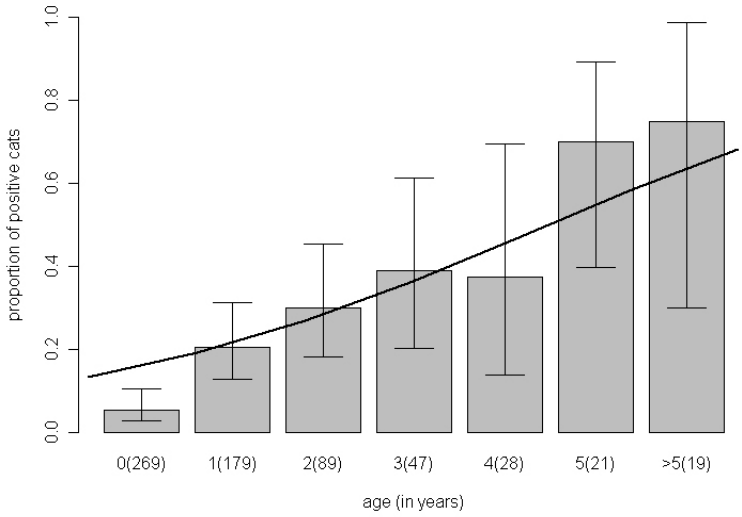


Figure 4. Relationship between age of cats and seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Croix-Rousse population. Lines represent 95% confidence intervals and numbers in brackets indicate sample sizes. (A) Cats aged less than one year old (dotted line: non-parametric adjustment) (B). All cats (full line: predicted prevalence according to the logistic model).

Variables associated to antibody carriage

A highly significant association was detected between *Age* and *T.gondii* seropositivity. This relationship was most significant when *Age* was considered as a continuous variable (LRT, P < 0.001, Figure 4B). After taking into account the effect of *Age*, several variables and interactions tended to influence antibody carriage. After simplifying the model, the significant terms included *Age* (0R = 2.15, LRT, P < 0.001) (Table II and Figure 4B). The effect of *Loca* showed that cats living in the northern part of the hospital carried more often antibodies (OR = 8.90, LRT, P = 0.016).

Table II. Variables associated with positivity for *Toxoplasma gondii* in domestic cats and parameters of the chosen model.

Variable	Group	Adjusted odds ratio	95% CI	P-value (Wald test)
Age (year)	-	2.15	[1.83;2.53]	< 0.001
Rain (mm)	-	0.92	[0.85;0.99]	0.264
Tmax (° C)	-	1.51	[1.29;1.77]	0.012
Ori (Out/In)	Out	18.99	[7.22;49.98]	0.004
Loca (North/South)	North	8.90	[4.17;19.00]	0.006
Rain*Tmax	-	1.10	[1.05;1.14]	0.028
Origin*Loca	Out/North	0.08	[0.02;0.22]	0.020
Origin*Tmax	Out	0.57	[0.47;0.68]	0.005

The effect of climatic conditions showed an interaction between *Tmax* and *Rain* (LRT, P = 0.024, Figure 5). The maximal values of temperatures and the mean rain per decade observed during the 12 months preceding the capture ranged from 27.8 to 37.2 °C and from 20.6 to 36.7 mm, respectively. The predictions of the selected model for *Tmax* and *Rain* observed values are represented Figure 5. Prevalence was highest when the weather was both hot (*Tmax* ≥ 32°C) and moist (*Rain* ≥ 22 mm), or moderate (*Tmax* 27°C) and drier (*Rain* 20 mm).

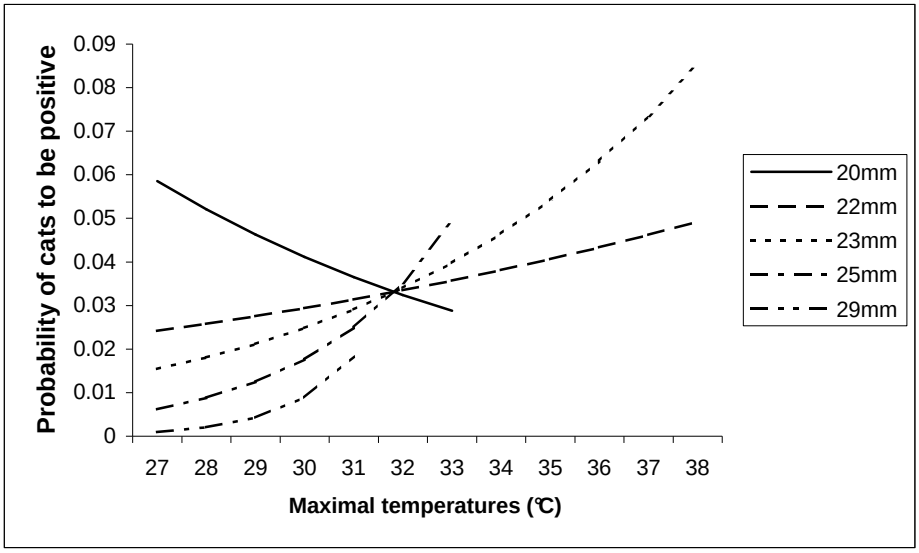


Figure 5. Influence of maximal temperature (*Tmax*) and rain (*Rain*) on the probability of cats being antibody-positive for *Toxoplasma gondii*. The figure represents the probability of cats, living in the southern part of the site and originating from the population, to have antibodies for *T. gondii*. The curves display the predictions of the model for observed values of temperature and rain. Each curve represents the predictions of the model according to *Tmax* for a value of *Rain* (legend on the right).

Finally, as expected, cats originating from outside of the hospital were different from cats born within the site: they had higher prevalence and did not experience the effect of *Tmax* (interaction *Origin***Tmax*, LRT, P = 0.006), nor the effect of *Loca* (LRT, P = 0.022). As expected, cats originating from outside of the population did not have the same risk factors than cats that always lived in the site, which supports the hypothesis of distinct circumstances of infection. The Pearson goodness-of-fit test indicated a good fit of the model (P = 0.210).

We assessed whether temporal variability was accounted for by the factors included in the selected model: after considering age only, the temporal variability was significant and was best represented by a third degree polynomial (LRT, P = 0.002). When considering other variables, this effect was no longer significant (LRT, P = 0.154).

2.2.4. Discussion

The kinetics of antibodies showed that antibody titers after seroconversion were highly variable and depended on the individual considered. This heterogeneity was already observed experimentally: after ingesting the same number of bradyzoites, cats showed 4-8 fold variation among maximal titers observed (Dubey et al., 1995a), thus individual cats have different abilities to preduce anti-*T. gondii* antibodies. The selected model also showed that antibody titers did not vary significantly with time after seroconversion, as already observed after experimental infection (Dubey et al., 1995a). We have no indication that antibody titer decreased with time, as observed in humans (Dubey and Beattie, 1988), nor significantly increased. Increasing antibody titers may have been related to re-shedding of oocysts after a second infection with a different strain (Dubey, 1995).

The correspondence analysis of the serologic profile of individuals showed that cats with titer < 20 had affinities for titer 20. Although 20 is often considered as a cut-off, the potential interference with IgM antibodies or the existence of false-positives was already evoked about the interpretation of this intermediate antibody titer (Dubey et al., 1995a). We considered 40 as the most appropriate threshold in this population because it classifies cats into two well-separated categories.

The seroprevalence of *T. gondii* antibodies in the Croix-Rousse population is particularly low (18.27%). This low value is not due to the choice of threshold: considering 20 as the threshold, the crude prevalence would have been 25.33%, whereas seroprevalences reported from European urban stray cats are generally higher than 30% (D'Amore et al., 1997, direct agglutination test (DAT), ≥ 1:32; Miró et al., 2004, indirect immunofluorescent antibody test (IFAT), ≥ 1:80). Moreover, stray cats generally have higher prevalences than owned cats (Dubey et al., 2002; Gauss et al., 2003; Miró et al., 2004), possibly due to the frequent consumption of contaminated intermediate hosts (Tenter et al., 2000). In the Croix-Rousse population, the low prevalence may be due to several elements limiting predation. Rodents are rare and regularly poisoned and only remains of birds (principally pigeons *Columbia livia*) and rats *Rattus norvegicus* have been occasionally observed in the grounds of the hospital (Courchamp, 1996). Even if prey are present on the site, the rate of predation for each cat is likely low, given the high density of cats. Moreover, cats are fed abundantly, which may prevent cats from hunting (Robertson, 1998). This raises the question wether supplemental feeding in urban stray cat populations may reduce cat exposure to

toxoplasmosis. However, feeding may also lead to increase cat density: if rodents are densely present, supplemental feeding may allow for the installation and growing of cats colonies in urban localized areas. Such moderate density cat populations may have a significant impact on native rodents and birds (Hawkins, et al., 2004). Supplemental feeding may thus have both positive (limitation of predation) and negative (growth of cat populations and intense predation) effects on the risk of toxoplasmosis, depending on the density of cats and prey.

Non-parametric adjustment displayed a significant presence of IgG antibodies in kittens aged 1 month old, followed by a decrease in prevalence at 3-4 months old. These results are in agreement with Omata et al. (1994) who showed that antibodies present in newborn kittens were no longer detectable at 2-3 months old. The authors proposed that this phenomenon would correspond to the transfer of antibodies from mothers to the kittens, essentially via the colostrum. In our population, a few kittens (6.7% of one-month-old) may present maternal antibodies. The decrease of prevalence at 3-4 months of age confirms that vertical transmission is not a usual route of infection (Dubey and Hoover, 1977). Seroprevalence in kittens increased at 5-6 months of age, corresponding to the beginning of territory exploration behaviour and hunting activity.

As expected, antibody carriage was highly related to age, due to the accumulation of cases across ages. This effect was linear for the whole sample, thus infection risk was constant over the life of the cats, and did not interact with other variables. After considering age, several variables that were found to influence prevalence in previous studies (FIV, FeLV) were no longer significant. This illustrates the need to consider the effect of age before studying any other risk factor.

Prevalence varied spatially: individuals living in the northern part of the site were more often positive than those from the southern part. Moreover, cats originating outside the hospital had higher antibody titers and prevalence than individuals born in the hospital population, taking age into account. Although we cannot exclude the hypothesis that genetic differences between cats of distinct areas may explain different antibody response and susceptibility, the most parsimonious explanation is that exposure to toxoplasmosis differs among areas. Cats originating from outside the population may be infected before entering the population, resulting in higher antibody level and prevalence. Cats from outside the population may be infected more often by ingestion of contaminated food, like rodents or remains given by owners. The difference in immune response may be explained by a different route or dose of infection, and/or by repeated contacts with the parasite that would enhance immune response. The difference between northern and southern parts of the hospital may be

explained by local composition of the landscape or by the use of the area by cats, determining different and localised risks of infection, including through a different predation rate between north and south.

Prevalence was also related to the interaction between temperature and rain. Here, with only 10 years of study, the magnitude of the effect of temperature and rain may not be estimated accurately, however, the interaction indicates that the risk of infection increased when the weather was both warm and moist, or moderated and less moist. The prediction concerning high temperatures suggests that moisture increases oocysts survival during periods of heat. Actually, for maximum temperatures of 35°C, occysts persist longer in moist than in dry areas (Frenkel et al., 1975). Climatic factors may be related to the risk of infection in cats: in the nationwide survey by Vollaire et al (2005), the lowest prevalences of *T. gondii* antibodies were recorded in the moist arid regions of the USA. Concerning years when temperatures remain moderate, we have no explanation for the higher prevalence during dry compared with moist years. During years with no intense period of heat, other factors may determine infection risk in cats.

Finally, we conclude that, as expected, vertical transmission is rare in this population? The low rate of predation probably contributes to the low prevalence, and prevalence depends on variables influencing the survival of oocysts (maximal temperatures, rain and localization of the animals). We also show that cats originating from surrounding areas had specific risk factors, thus the importance of oocysts transmission may vary according to local conditions.

Beside their role in the life cycle of *T. gondii*, environmental oocysts are a possible source of human infection through contact with soil, water, fruits and vegetables. The frequency of transmission by oocysts has rarely been estimated. However, several recent findings highlighted the role of oocysts in human contamination. Recent outbreaks of clinical toxoplasmosis have been related to the contamination of drinking water (Bowie et al., 1997; Aramini et al., 1999; Bahia-Oliveira et al., 2003). Case-control and cohort studies also found risk factors related to environmental characteristics: living in a moderately urbanized or rural area at the time of the study or during childhood, living in a specific area within a country, owing cats or gardening were found to be related to seroconversion or antibody carriage (Baril et al., 1999; Cook et al., 2000; Kortbeek et al., 2004; Nash et al., 2005), whereas, in the last study, only a weak association was found with diet. The relative importance of oocyst transmission may be more apparent only due to the appearance of improved detection methods (Dumètre and Dardé, 2003), but it could also be increasing because the level of meat infection is declining, for example in pigs, due to intensive farm management (Tenter et al.,

2000). Overall, variability in risk factors among geographical areas shows that a detailed attention must be given to the direct environment of human populations, specifically on the dynamics of infection in cats and on environmental conditions affecting the survival of oocysts. We now plan to estimate soil contamination by oocysts in this and other populations living in different environments.

Acknowledgements

The authors thank Dominique Pontier, Marc Artois, Franck Courchamp, Ludovic Say, Sébastien Devillard, François Debias and all persons who participated to the population survey. The Hospices Civils de Lyon permitted the access to the cat population. Thanks to Christiane Leprince for performing serological tests and to Sylvain Dolédec for help in data analysis. This study is supported by the French Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale. EA received grants from Grünenthal France Laboratory and the Région Champagne-Ardenne.

REFERENCES

Agresti, A. 1996. An introduction to categorical data analysis. Wiley, New York.

Aramini, J.J., Stephen, C., Dubey, J.P., & Engelstoft, C. 1999. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology and Infection* 122, 305-315.

Bahia-Oliveira, L.M.G., Jones, J.L., Azevedo-Silva, J., Alves, C.C.F., Oréfice, F., & Addiss, D.G. 2003. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 9, 55-62.

Baril, L., Ancelle, T., Thulliez, P., Goulet, V., Tirard, V., & Carme, B. 1996. Facteurs de risque d'acquisition de la toxoplasmose chez les femmes enceintes en France (1995). *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 16, 73-75.

Bowie, W.R., Kng, A., 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 Lancet* 350, 173-177.

Burnham, K.P., & Anderson, D.R. 1992. Data-based selection of an appropriate model: the key to modern data analysis. *In*: D.R. McCullough and Barrett R.H. Wildlife 2001, Populations. Elsevier Applied Science, London, pp. 16-30.

Bussiéras, J., & Chermette, R. 1991. Parasitologie vétérinaire I – parasitologie générale. Ecole vétérinaire, Maisons-Alfort, 75 pp.

Chevenet, F. Doledec, S., & Chessel, D. 1994. A fuzzy coding approach for the analysis of long-term ecological data. *Freshwater Biology* 31, 295-309.

Cleveland, W.S., Grosse, E., & Shyu, W.M. 1992. Local regression models. *In*: Chambersand, J.M., Hastie, T.J. (Eds), Statistical Models in S. Wadsworth et Brooks/Cole (Chapter 8).

Cook, A.J.C., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., & Dunn, D.T. 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *British Medical Journal* 321, 142-147.

Courchamp, F., 1996. Epidemiological study of Feline Immunodeficiency Virus in domestic cat populations (*Felis catus*). University Claude Bernard Lyon-1 Ph. D. Thesis.

Courchamp, F., Say, L., & Pontier, D. 2000. Transmission of Feline Immunodeficiency Virus in a population of cats (*Felis catus*). *Wildlife Research* 27, 603-611.

D'Amore, E., Falcone, E., Busani, L., Tollis, M., 1997. A serological survey of Feline Immunodeficiency Virus and *Toxoplasma gondii* in stray cats. *Veterinary Research Communications* 21, 355-359.

Devillard, S., Say, L., & Pontier, D. 2003. Dispersal pattern of domestic cats (*Felis catus*) in a promiscuous urban population: do female disperse or die? *The Journal of Animal Ecology* 72, 203-211.

Devillard, S., Say, L., & Pontier, D. 2004. Molecular and behavioural analyses reveal male-biased dispersal between social groups of domestic cats. *Ecoscience* 11, 175-180.

Dohoo, I., Martin, W., & Stryhn, H. 2003. Mixed models for continuous data. Veterinary epidemiologic research. Prince Edward Island: AVC Inc., pp. 473–498.

Dorny, P., Speybroeck, N., Verstraete, S., Baeke, M., De Becker, A., Berkvens, D., & Vercruysse, J. 2002. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *The Veterinary Record* 151, 626-629.

Dubey, J.P. 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *The Journal of Parasitology* 81, 410-415.

Dubey, J.P. 1996. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *The Journal of Parasitology* 82, 957-961.

Dubey, J.P. 1997. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. *Veterinary Parasitology* 71, 307-310.

Dubey, J.P., & Beattie, C.P. 1988. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton.

Dubey, J.P., & Desmonts, G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal* 19, 337-339.

Dubey, J.P., & Hoover, E.A. 1977. Attempted transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kittens. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 170, 538-40.

Dubey, J.P., Lappin, M.R., & Thulliez, P. 1995a. Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *The Journal of Parasitology* 81, 887-893.

Dubey, J.P., Lappin, M.R., & Thulliez, P. 1995b. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207, 179-185.

Dubey, J.P., Mattix, M.E., & Lipscomb, T.P. 1996. Lesions of neonatally induced toxoplasmosis in cats. *Veterinary Pathology* 33, 290-295.

Dubey, J.P., Saville, W.J.A., Stanek, J.F., & Reed, S.M. 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. *The Journal of Parasitology* 88, 802-803.

Dubey, J.P., Thulliez, P., Weigel, R.M., Andrews, C.D., Lind, P., & Powell, E.C. 1995c. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *American Journal of Veterinary Research* 56, 1030-1036.

Dumètre, A., & Dardé, M.L. 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? FEMS Microbiology Reviews 27, 651-661.

Fernandez, F., Ouvina, G., Clot, E., Fernandez Guido, R., & Codoni, C. 1995. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats in the western part of Great Buenos Aires, Argentina, 1993. *Veterinary Parasitology* 59, 75-79.

Frenkel, J.K., Ruiz, A., & Chinchilla, M. 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24, 439-443.

Gauss, C.B., Almeria, S., Ortuno, A., Garcia, F., & Dubey, J.P. 2003. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. *The Journal of Parasitology* 89, 1067-1068.

Hawkins, C.C., Grant, W.E., & Longnecker, M.T. 2004. Effect of house cats, being fed in parks,on California birds and rodents. *In*: Sahw et al. (Eds). Proceedings 4th International Urban Wildlife Symposium.

Kortbeek, L.M., De Melker, H.E., Veldhuijzen, I.K., & Conyn-Van Spaendonck, M.A.E. 2004. Population-based *Toxoplasma* seroprevalence study in the Netherlands. *Epidemiology and Infection* 132, 839-845.

Liberg, O., & Sandell, M. 1988. Spatial organisation and reproductive tactics in the domestic cat and other felids. *In*: The Domestic Cat, the Biology of its Behaviour (ed. D.C. Turner et P. Bateson), Cambrigde University Pres, pp. 83-98.

Macdonald, D.W. 1983. The ecology of carnivore social behavior. *Nature* 301, 379-389.

Maruyama, S., Hiraga, S., Yokoyama, E., Naoi, M., Tsuruoka, Y., Ogura, Y., Tamura, K., Namba, S., Kameyama, Y., Nakamura, S., & Katsube, Y. 1998. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* Infections among pet cats in Kanagawa and Saitama prefectures. *The Journal of Veterinary Medical Science* 60, 997-1000.

McCaw, D. 1994. Diagnosis of retroviral diseases in cats. *Feline Practice* 22, 19-20.

Miró, G., Montoya, A., Jimenez, S., Frisuelos, C., Mateo, M., & Fuentes, I. 2004. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. *Veterinary Parasitology* 126, 249-255.

Nash, J.Q., Chissel, S., Jones, J., Warburton, F., & Verlander, N.Q. 2005. Risk factors for toxoplasmosis in pregnant women in Kent, Unnited Kingdom. *Epidemiology and Infection* 133, 475-484.

Omata, Y., Oikawa, H., Kanda, M., Mikazuki, K., Dilorenzo, C., Claveria, F.G., Takahashi, M., Igarashi, I., Saito, A., & Suzuki, N. 1994. Transfer of antibodies to kittens from mother cats chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology* 52, 211-218.

Powell, C.C., Brewer, M., Lappin, M.R., 2001. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentaly infected lactating cats. *Veterinary Parasitology* 102, 29-33.

R Development Core Team 2005. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2005. http://www.R-project.org.

Robertson, I.D. 1998. Survey of predation by domestic cats. *Australian Veterinary Journal* 76, 551-554.

Salant, H., & Spira, D.T. 2004. A cross-sectional survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Jerusalem cats. *Veterinary Parasitology* 124, 167-177.

Sato, K., Iwamoto, I., & Yoshiki, K. 1993. Experimental toxoplasmosis in pregnant cats. *The Journal of Veterinary Medical Science* 55, 1005-9.

Say, L., Pontier, D., & Natoli, E. 1999. High variation in multiple paternity of domestic cats (*Felis catus*) in relation to environmental conditions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 266, 2071-2074.

Stram, D.O., & Lee J.W. 1994. Variance components testing in the longitudinal mixed effects model. *Biometrics* 50, 1171-1177.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., & Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30, 1217-1258.

Vollaire, M.R., Radecki, S.V., & Lappin, M.R. 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in clinically ill cats in the United States. *American Journal of Veterinary Research* 66, 874-877.

2.3. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area.

Eve AFONSO, Mélissa LEMOINE, Marie-Lazarine POULLE, Marie-Caroline RAVAT, Stéphane ROMAND, Philippe THULLIEZ, Isabelle VILLENA, Dominique AUBERT, Muriel RABILLOUD, Benjamin RICHE, et Emmanuelle GILOT-FROMONT.

International Journal for Parasitology, In Press (2008).

ABSTRACT

In urban areas, there may be a high local risk of zoonosis due to high densities of stray cat populations. In this study, soil contamination by oocysts of *Toxoplasma gondii* was searched for, and its spatial distribution was analysed in relation to defecation behaviour of cats living in a high-density population present in one area of Lyon (France). Sixteen defecation sites were first identified. Cats were then repeatedly fed with marked food and the marked faeces were searched for in the defecation sites. Of 260 markers, 72 were recovered from 24 different cats. Defecation sites were frequented by up to 15 individuals. Soil samples were also examined in order to detect *T. gondii* presence using known concentrations of oocysts and real-time PCR. The entire study area was then sampled according to cat density and vegetation cover type. Only three of 55 samples were positive and all came from defecation sites. In a second series of observations, 16 defecation sites were sampled. Eight of 62 samples tested positive, originating in five defecation sites. Laboratory experiments using experimental seeding of soil showed that the inoculated dose that can be detected in 50% of assays equals 100 to 1,000 oocysts per gram, depending on the strain. This study shows that high concentrations of oocysts can be detected in soil samples using molecular methods and suggests that spatial distribution of contamination areas is highly heterogeneous. Positive samples were only found in some of the defecation sites, signifying that at-risk points for human and animal infection may be very localized.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Soil; Oocysts; PCR; Cat defecation behaviour; Spatial heterogenity

2.3.1. Introduction

Populations of stray cats (*Felis catus*) can reach high local densities in urban areas by making use of available resources and shelters (Macdonald, 1983; Liberg and Sandell, 1988). Areas such as parks and gardens are particularly likely to be settled by large social groups of cats (Piccoli, 1995). Because these same areas are also used for recreational activities, the proximity between humans and cats entails a significant risk of transmission of zoonoses, especially for faeces-transmitted diseases (Kumar and Smith, 2000).

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite that infects humans, many mammals and birds. In humans, toxoplasmosis can cause abortion or severe clinical signs in foetuses, neonates and immunocompromised individuals (Dubey and Beattie, 1988). Felids, and particularly domestic cats (*F. catus*), are the definitive hosts of *T. gondii*. After primary infection, hosts excrete millions of environmentally resistant oocysts that may infect intermediate hosts such as small mammals and birds. The life-cycle of the parasite is completed when intermediate hosts are preyed upon by the definitive host (Dubey and Beattie, 1988; Tenter et al., 2000). Contamination of the environment by oocysts of *T. gondii* is responsible for outbreaks of acute toxoplasmosis in humans (Stagno et al., 1980; Coutinho et al., 1982; Bowie et al., 1997), and is suspected to be associated with high seroprevalence in some communities (Bahia-Oliveira et al., 2003).

Local risk of soil contamination by oocysts should depend on the initial concentration of infected cat faeces and the survival and diffusion of oocysts in the soil. The defecation behaviour of stray cats is generally structured: faeces are usually buried in the main living area but can also be exposed as scent marks around the border of a territory (Turner and Bateson, 2000). Cats often use the same place to defecate (Corbett, L. K., 1979. Feeding ecology and social organization of wildcats (*Felis silvestris*) and domestic cats (*Felis catus*) in Scotland. Ph. D. thesis, University of Aberdeen, Scotland) and a single location may be used by several cats when cat density is high (Uga et al., 1996). Oocysts shed by newly infected cats can survive and remain infectious in moist soil or sand for up to 18 months (Dumètre and Dardé, 2003). Detection of oocysts in soil samples has previously been described (Ruiz et al., 1973; Coutinho et al., 1982; Dubey et al., 1995; Frenkel et al., 1995) but never related to the space used by the cats. Isolation of oocysts from naturally infected soil samples has been performed via inoculation in mice and positive results range from 10/924 samples from children’s outdoor play areas in Panama City (Frenkel et al., 1995) to 4/15 samples from a yard frequented by cats (Ruiz et al., 1973). Although transport hosts have been identified

(Ruiz and Frenkel, 1980), the importance of oocyst diffusion in the soil to toxoplasmosis infection is unknown.

The aim of this study was to estimate the level of contamination of *T. gondii* oocysts in the grounds of the Croix-Rousse Hospital in Lyon (France) and to relate oocyst presence to cat defecation behaviour. At this site, a population of domestic cats lives at high density (Devillard et al., 2003) and infection by *T. gondii* has been serologically measured at 18.6% (Afonso et al., 2006). This paper first presents results from laboratory experiments elaborated to estimate the sensitivity of a new molecular method for oocyst detection in soil (Romand S., Fromont, E., Pontier, D., Thulliez, P. 2003. Détection par PCR en temps réel de *Toxoplasma gondii* dans les prélèvements de sol. Congrès de la Société Française de Parasitologie, 16-18 December 2003, AFSSA, Maisons-Alfort). Then, results from a description of both the presence of oocysts in soil samples and cat defecation behaviour in the Croix-Rousse site are presented. We predicted that soil contamination should be higher in defecation sites than in the rest of the study area and should be highest in sites most frequently used by cats.

2.3.2. Materials and methods

Detection of oocysts

Detection of oocysts was carried out according to a molecular method modified from Dubey et al. (1972; Romand S., Fromont, E., Pontier, D., Thulliez, P. 2003. Détection par PCR en temps réel de *Toxoplasma gondii* dans les prélèvements de sol. Congrès de la Société Française de Parasitologie, 16-18 December 2003, AFSSA, Maisons-Alfort). First, 10 g of soil were mixed with 5 mL of 2% sulfuric acid. After 1 h, mixtures were filtered through four layers of gauze and centrifuged at 500 *g* for 5 min. The sediment was suspended in a sucrose solution (specific density of 1.15). After centrifugation (400 *g* for 5 min), the supernatant (1.5 mL) was collected and submitted to three cycles of freezing/thawing for at least 4 h at +20°C and –80°C. DNA extraction was made with the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions, including a treatment with proteinase K. DNA was subjected to real-time quantitative PCR targeting the 529 bp repeated element on a LightCycler instrument (Roche Diagnostics), according to the method previously described (Reischl et al., 2003) and using 50 cycles.

Laboratory experiments were performed to estimate the sensitivity of *T. gondii* oocyst detection in soil samples. Three strains of sporulated oocysts that had been obtained from

experimentally infected cats were used. Five-year-old oocysts of strain GUI (RMS/99/GUI; type II) were obtained from the Laboratoire de Parasitologie – Mycologie, EA 3800 at Reims (France), and produced as described by Villena et al. (2004). Oocysts of strain VEG (type III, 13-months-old) and strain PIG3 (type II, 5-months-old) were provided by J.P. Dubey of Beltsville, Maryland (Dubey et al., 1996). All oocysts were kept in 2% H_2SO_4 and stored at 4°C until used in inoculation experiments.

First, 1-mL samples of distilled water were inoculated with 10,000, 1,000, 100, or 10 oocysts. Each inoculation was repeated four times (4 concentrations x 3 strains x 4 repetitions = 48 inoculations). Next, oocysts were inoculated in soil samples. The soil came from an area that was chosen to be representative of defecation sites in the study area but was negative for oocysts during a field study (site M; see below), it was not tested again at the time of the experiments. We inoculated 10 g of soil with 10,000, 1,000, 100 or 10 oocysts. For both water and soil experiments, the proportion of positive samples for each strain was compared using Cochran-Mantel-Haenszel tests (Agresti, 1990). We calculated $D_{0.5}$ as the inoculation dose that was detected in 50% of assays.

Study area and cat population

Cats live in gardens and underground areas of the Croix-Rousse Hospital in Lyon (France). Underground areas are basement levels under the hospital buildings. They are used for technical materials and have mud floors. A large group of cats lives at high density (9.7 ± 0.5 cats/ha; Devillard et al., 2003) in the 7.2-ha site, including 3 ha not covered by roads or buildings. The population ranged between 37 and 94 cats, depending on the time of year (Devillard et al., 2003), with four to eight feeding points maintained throughout the grounds (Fig. 1). Feeding points consisted of canteen waste and canned food that was regularly deposited by volunteers from the hospital.

The cat population had been monitored visually between 1993 and 2004. We also recorded information and took blood samples from individuals during trapping sessions twice a year (Say et al., 1999; Courchamp et al., 2000; Devillard et al., 2003; Afonso et al., 2006). Cats were identified by coloured collars and coat colour combinations. In a previous study (Afonso et al., 2006), antibodies for *T. gondii* were detected in 56/301 trapped cats (18.6%), so the number of susceptible cats in the population was estimated between 30 and 76 ((1-0.186) x 37 and (1-0.186) x 94). Incidence was also estimated as 17 for 100 cat-year (cat-year

is defined by the cumulative follow-up period for all the cats), so 5 to 13 cats on average could have been infected in any 1 year and excreted oocysts in the study area.

The area was first searched systematically to locate sites used by cats for defecation, which were systematically cleared before the experiment. Pre-defined walking surveys were carried out in February 2005 to identify all cats that were present. Next, individual cats were fed with bait containing eight small coloured plastic markers on a daily basis, according to Ikeda et al. (1979). Faeces were then collected daily from each defecation site during February 2005 (1 month), March and April 2005 (6 weeks) and August 2005 (1 month). Plastic strips were removed from faeces by dilution in water and filtering the mixture. The location of faecal deposits was thus recorded, as well as the identity of cats producing them. The experimental protocol was approved by the Director of Veterinary Services, Rhone Department.

Soil contamination

The first soil sampling session assessed contamination across the entire study site. This was done in April 2004 by sampling two square meters of quadrats in a regular grid pattern. Each quadrat (87 m^2) was described for the presence of cats (number of cats observed in the quadrat during the previous year) and vegetation cover. Three categories of cat density were defined: (i) more than five cats observed in the quadrat, (ii) one to five cats observed and (iii) no cat observed. Four categories of vegetation cover were also defined: (i) grass, (ii) bushes, shrubs and trees, (iii) flowerbeds and (iv) gravel and sand. Five quadrats were randomly sampled for each combination of cat density and cover type.

For each sample, 20 sub-samples were taken from all over the surface of the sampling unit (to a depth of 2 cm), in order to be representative of the whole quadrat. From each quadrat, 200 to 300 g of soil were thus collected and kept in plastic boxes at ambient temperature (22°C). All samples were collected in the field on the same day and laboratory analysis was carried out over the next few days**.**

Because few samples were positive for *T. gondii* during the first sampling (see Results), a second sampling session focused on the identified defecation sites. In November 2005, four randomly selected square meters were thus sampled from each defecation site. For the two areas less than 4 m^2 in size, the number of squares sampled was equal to the sampled surface area (3 m^2). Soil samples were collected and kept as described above.

Each soil sample was thoroughly mixed in the laboratory and then we removed 100 g of soil for detection of DNA of *T. gondii* (see above), adjusting the detection method to the soil quantity.

2.3.3. Results

Sensitivity of the detection method

Oocysts of the oldest strain (GUI) were only detected in water inoculated with 10,000 oocysts, while more recently produced oocysts were detected at lower concentrations (Table 1). $D_{0.5}$ values were 10,000, 100 and 10,000 oocysts in 1 mL of distilled water for strains GUI, VEG and PIG3, respectively.

Results of soil seedings are shown in Table I. Although *T. gondii* DNA was not detected in the soil used for experiments, we cannot preclude the hypothesis that a small quantity of DNA was present in this soil and that it explained part of the variability in further tests. Results obtained for the three strains in soil samples tended to be different. Results for GUI and VEG strains did not differ significantly (Mantel-Haenszel test, $P = 0.580$), while results differed significantly between GUI and PIG3 strains, or VEG and PIG3 strains (Mantel-Haenszel test, $P = 0.025$ and $P = 0.014$, respectively). Oocysts that were produced earliest (strain GUI) gave inconsistent results and the $D_{0.5}$ was not estimated in this case. *Toxoplasma gondii* DNA was detected repeatedly when soil samples were inoculated with 10,000 oocysts for strains VEG and PIG3 (Table I). $D_{0.5}$ value equalled 10,000 oocysts per 10 g of soil for strains VEG (shed 13 months before the experiments) and 1,000 oocysts per 10 g of soil for PIG3 (shed 5 months before the experiments).

Table I. Number of distilled water (1 mL) or soil (10 g) samples found to be positive for three strains of *Toxoplasma gondii* using PCR, following experimental inoculation.

	Number of oocysts seeded (mean cycle threshold for positive results)							
	10,000		**1,000**		**100**		**10**	
Strain (time since oocyst production)	**water**	**soil**	**water**	**soil**	**water**	**soil**	**water**	**soil**
GUI (5 years)	3/4 (33.7)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/1	0/4	0/2
VEG (13 months)	4/4 (27.2)	3/4 (41.9)	3/4 (36.1)	1/4 (40.8)	2/4 (37.8)	1/4 (41.6)	0/4	-
PIG3 (5 months)	3/4 (32.1)	4/4 (36.5)	1/4 (37.8)	3/4 (37.5)	0/4	0/4	0/4	-

Defecation behaviour of cats

During preliminary observations, 16 defecation sites were identified in the study area. Fourteen sites were located in areas with soil and two sites were underground (Fig. 1). Total surface area of defecation sites was 189 m^2 (between 3 and 60 m^2 each), representing less than 1% of the total surface area of the hospital grounds (Table 2).

A total of 51 cats was observed, of which 45 individuals (88.2%) could be fed with marked bait. Marked cats were representative of the population in terms of sex and age. Of the 260 markers used in baits, 72 were found in the faeces of 24 different cats (Table II). Cats that were identified as producing faeces used one to four different defecation sites. The 16 defecation sites were not used equally. No markers were found in five sites (B, D, E, K and L), nine sites were used by five cats or less (A, C, F, I, J, M, N, O and P), while sites G and H were frequented by 15 and seven cats, respectively (Figure 1).

Table II. Characteristics of cat defecation sites and number soil samples positive for *Toxoplasma gondii*.

Defecation site	Surface area (m^2)	Number of faecal markers found	Number of different cats found defecating	Positive samples
A	20	1	1	1/4
B	4	0	-	0/4
C	6	1	1	0/4
D	5	0	-	0/4
E	17	0	-	0/4
F	8	9	5	0/4
G	10	24	15	0/4
H	5	9	7	0/4
I[a]	3	6	3	2/3
J[a]	3	2	2	3/3
K	20	0	-	1/4
L	5	0	-	1/4
M	4	4	3	0/4
N	60	1	1	0/4
O	4	6	3	0/4
P	15	9	3	0/4
Total	189	72	24	8/62

[a]located underground.

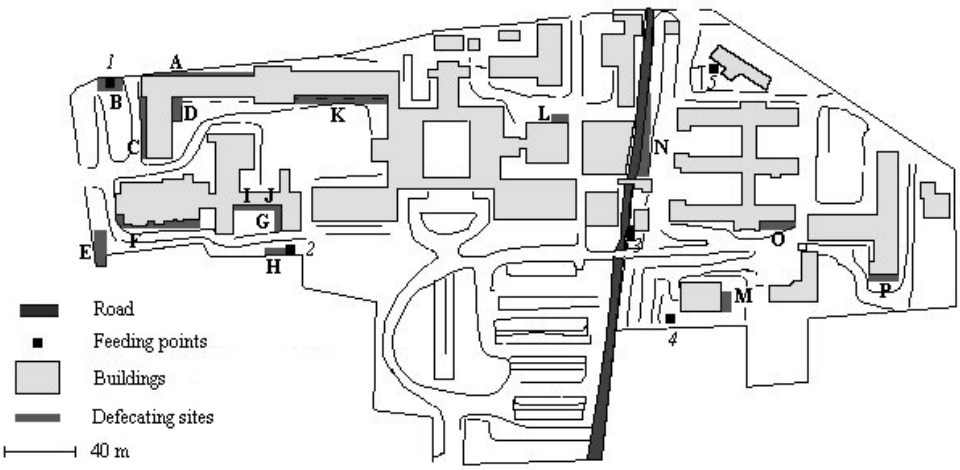


Figure 1. Location of feeding (1-5) and defecation (A-P) sites recorded at the Croix-Rousse Hospital in November 2005. Defecation sites I and J were located underground.

Contamination of soil

A total of 354 quadrats of 87 m^2 were described in the study area, among which 55 were sampled. No analysis was performed for the combination of high cat density and flowerbed vegetation because this combination did not occur. *Toxoplasma gondii* DNA was detected in three samples. The first was located in a lawn where cat density was high, the second was located in a flowerbed where cat density was intermediate, and the third was under a tree where no cat had been observed. Taking into account the frequency of these three types of quadrats across the study area, the estimated prevalence of positive samples in the entire site was 4.8%. All three positive samples were located in defecation sites. *Toxoplasma gondii* DNA was thus found significantly more often in defecation sites (3/15) than in other parts of the study area (0/40; Fisher's exact test, $P = 0.017$).

During the second soil sampling session, DNA of *T. gondii* was detected in 8/62 samples. The positive samples were collected from five different defecation sites, either on the ground surface (3/14 sites) or underground (2/2; Table II). Underground sites were located in shaded, warm and moist zones and were often infected (5/6 positive results). Contrary to expectations, infected areas were not located in sites used most frequently by cats. The five infected sites were observed to be used by only zero to three cats.

The frequency of positive samples was twice as high in defecation sites (8/62) than across the study area in general (3/55; McNemar chi-squared test, $P < 0.001$). In addition, two of the three areas where DNA was found in 2004 were also positive in 2005 (A and K). The third area was not sampled in 2005 because it was no longer accessible.

2.3.4. Discussion

Here we present the use of a newly described molecular method to estimate soil contamination by *T. gondii*. Laboratory experiments showed that three different concentrations of oocysts were not detected with equal likelihoods. Concentrations of 100 oocysts/mL of distilled water and 100 to 1,000 oocysts/g of soil resulted in positive identification for recently shed oocysts, while 5-year-old oocysts were not detected, except at very high concentration in water (10,000 oocysts/mL). The older oocysts had previously been detected at a dose of 100 oocysts in 100 L of deionised water when 2 years old (Villena et al., 2004). We assume that the decrease in sensitivity of the detection method may have resulted from a breakdown of the oocysts. The sensitivity that was measured is comparable to other

techniques proposed to detect oocysts in cat faeces (Salant et al., 2007), however our method has the advantage of being more feasible since there is no bioassay. Because a newly infected cat may excrete millions of oocysts per day (Dubey and Beattie, 1988), local soil concentrations should be at least in the order of magnitude of hundreds/g, thus this method is sensitive enough to detect recent contamination. Improving the sensitivity of the detection method through more efficient DNA extraction would allow us to detect lower levels of concentration due to spatial diffusion. Finally, although oocysts are known to remain infectious for long periods, only a proportion of detected oocysts is likely to be infectious and biological assays are necessary to determine this proportion.

Although the seroprevalence of *T. gondii* was low in the studied cat population, the high density of cats living in the study area was expected to result in high levels of contamination. In the field, we first found that the overall proportion of soil that was recently contaminated was relatively low (4.8%). This result was related to the low proportion of the study area that was actually used by cats for defecation (< 1%). The spatial distribution of soil contamination thus appears to be highly heterogeneous, with a limited role for diffusion of oocysts in the soil.

During feeding experiments, 28% of the markers distributed to cats were subsequently found in faeces, which is a high proportion compared with previous studies (Ishida and Shimizu, 1998). The Croix-Rousse site is surrounded by walls and busy roads and the rates of dispersal to/from the site are low (Devillard et al., 2003), thus the use of defecation areas outside the grounds is probably uncommon and we assume that we identified most defecation sites used by the studied population. A few cats were too shy to be fed with marked food. This may partly explain why no cats using defecation sites B, D, E, K and L were identified.

Defecation sites were the places most often found to be positive for *T. gondii* DNA. The proportion of samples from defecation sites testing positive was relatively high and similar for the two sampling sessions: 3/15 versus 8/62. The five positive defecation sites were located either underground or in the margin of the distribution range of the cats. Contrary to expectations, positive sites were not those most frequented. The two areas that were positive in April 2004 were also contaminated in November 2005, however, suggesting that they were regularly used by newly infected cats. Because toxoplasmosis can induce severe clinical signs in cats, such as diarrhoea or vomiting (Dubey and Beattie, 1988), we cannot preclude the hypothesis that primary infected cats adapt their defecating behaviour to defecate in unusual areas, particularly in areas away from humans (underground) or other cats. Another possible explanation is that the soil showed favourable conditions for the survival of oocysts, such as consistent shade and moisture underground. Oocyst survival is

known to be affected by moisture (Frenkel et al., 1975), temperature (Dumètre and Dardé, 2003) and u.v. radiation (Wainwright et al., 2007). Here, we have no information on the physical characteristics of the sampled sites, thus we can only hypothesize that the relationship between cat behaviour and soil contamination is modulated by local conditions that may influence the survival of oocysts.

Beside these high-risk sites are caused by dense cats populations using common defecation sites, other places contaminated at an intermediate level are expected to occur. Such areas were not detected here because of the sensitivity of the detection method, so we have no information on their spatial distribution. Specifically, intermediate levels of contamination are expected to be frequent in rural environments where cat density is intermediate and territoriality is more pronounced (Turner and Bateson, 2000). Human contact with soil is more frequent in rural than urban environments so even low contamination in the landscape may become risky if exposure is high. Our detection method should now be improved to characterize the risk of toxoplasmosis in less-infected areas, particularly the rural environment.

Studying the spatial distribution of soil contamination by *T. gondii* will be useful in understanding the risk of toxoplasmosis in both intermediate hosts and humans. Gardening and consumption of raw vegetables have been demonstrated to be significant risk factors for toxoplasmosis in humans (Bobic et al., 1998; Cook et al., 2000; Kortbeek et al., 2004). Here we showed that only a few areas were highly contaminated by *T. gondii* in a dense cat population. No rodent has been observed on the studied site (Afonso et al., 2006), however rodents are often abundant in urban areas, so the defecation sites may play a significant role in the perpetuation of the cycle of *T. gondii*, by creating a risk for rodents and/or cats. These highly contaminated points may be viewed as “hot spots” of risk, where the level of contamination was at least 100 oocysts/g of soil. Contact with these areas is expected to result in a high risk of infection but because contaminated sites represent a low proportion of the area, only a few humans are likely to be directly exposed. These persons include those feeding the cats, gardeners, maintenance workers in these sites and also dog owners who allow pets to roam in these sites and become indirectly exposed through contact with dogs (Frenkel et al., 1995).

The management of zoonotic risk in urban areas often relies on control of the demography or sanitary status of host populations: for example, reducing fox and/or rodent density, or treating foxes have been proposed as methods to control the urban cycle of

Echinococcus multilocularis (Deplazes et al., 2004). However, this approach often presents practical difficulties and/or raises ethical concerns. Direct interventionsin the environment, either to decrease contamination or to limit contact between high-risk areas and hosts or people, may constitute a valuable alternative when parasites are localized, for example in sandpits contaminated by eggs of *Toxocara* sp. (Uga et al., 1996). In the case of toxoplasmosis, characterizing the determinants of environmental contamination opens the possibility of targeted interventions towards the contaminated areas. Such measures would be facilitated if high-risk areas are localized and can be practically detected.

Acknowledgements

The authors thank F. Marnef, E. Pisano and Y. Solé for help in the laboratory, C. Morton and D. Semaska for participating in fieldwork and J.P. Dubey for kindly providing *Toxoplasma* oocysts. The authors also sincerely thank W.J. King for improving the English, and two anonymous referees for helpful comments. The Hospices Civils de Lyon permitted access to the cat population. This study is supported by the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET) and the Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise. Eve Afonso received grants from the Grünenthal France Laboratory and the Région Champagne-Ardenne.

REFERENCES

Afonso, E., Thulliez, P., & E. Gilot-Fromont. 2006. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *International Journal for Parasitology* 36, 1373-1382.

Agresti, A. 1990. *Categorical data analysis*. New York: Wiley. Pages 230–235.

Bahia-Oliveira, L.M.G., Jones, J.L., Azevedo-Silva, J., Alves, C.C.F., Oréfice, F., & Addiss, D.G. 2003. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 9, 55-62.

Bobić, B., Jevremović, I., Marinković, J., Šibalić, D., & Djurković-Djaković, O. 1998. Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *European Journal of Epidemiology* 14, 605-610.

Bowie, W.R., King, A., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B., & Marion, S.A. 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 350, 173-177.

Cook, A.J.C., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., & Dunn, D.T. 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women : European multicentre case-control study. *British medical journal* 321, 142-147.

Courchamp, F., Say, L., & Pontier, D.. 2000. Transmission of Feline Immunodeficiency Virus in a population of cats (*Felis catus*). *Wildlife Research* 27, 603-611.

Coutinho, S.G., Lobo, R., & Dutra, G. 1982. Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area in Brazil. *Journal of Parasitology* 68, 866-868.

Deplazes, P., Hegglin, D., Gloor S., & Romig, T.. 2004. Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology* 20, 77-84.

Devillard, S., Say, L., & Pontier, D. 2003. Dispersal pattern of domestic cats (*Felis catus*) in a promiscuous urban population: do females disperse or die? Journal of Animal Ecology 72, 203-211.

Dubey, J.P., Swan, G.V., & Frenkel, J.K. 1972. A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* from the feces of cats. *Journal of Parasitology* 58, 1005-1006.

Dubey, J.P., & Beattie, C.P. 1988. Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton.

Dubey, J.P., Weigel, R.M., Siegel, A.M., Thuilliez, P., Kitron, U.D., Mitchell, M.A., Mannelli, A., Mateus-Pinilla, N.E., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., & Todd, K.S. 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *Journal of Parasitology* 81, 723-729.

Dubey, J.P., Lunney, J.K., Kwok, O.C.H., Ashford, D.A., & Thulliez, P. 1996. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *Journal of Parasitology* 82, 438-443.

Dumètre, A., & Dardé, M.-L. 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiology Reviews* 27, 651-661.

Frenkel, J.K., Ruiz, A., & Chinchilla, M. 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 24, 439-443.

Frenkel, J.K., Hassanein, K.L., Hassanein, R.S., Brown, E., Thulliez, P., & Quintero-Nunez, R. 1995. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 53, 458-468.

Ikeda, H., Eguchi, K., & Ono, Y. 1979. Home range utilization of a raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides viverrinus*, Temminck, in a small islet in western Kyushu. *Japanese Journal of Ecology* 29, 35-48.

Ishida, Y., & Shimizu, M.1998. Influence of social rank on defecating behaviors in feral cats. *Journal of Ethology* 16, 15-21.

Kortbeek, L. M., H. E. De Melker, I. K. Veldhuijzen, and M. A. E. Conyn-Van Spaendonck. 2004. Population-based *Toxoplasma* seroprevalence study in the Netherlands. *Epidemiology and Infection* 132, 839-845.

Kumar, G.S., & Smith, H. 2000. Pets, poop and parasites. Microbiology Today 27, 84-86.

Liberg, O., & Sandell, M. 1988. Spatial organisation and reproductive tactics in the domestic cat and other felids. In *The Domestic Cat, the Biology of its Behavior* (ed. D.C. Turner & P. Bateson), Cambridge University Press, pp. 83-98.

MacDonald, D.W. 1983. The ecology of carnivore social behavior. *Nature* 301, 379-389.

Piccoli, L. 1995. Les chats de Venise. Résultat du premier recensement des colonies félines, pp. 95-100. In "I gratti di Venezia" L. Farina, S. Marangon, L. Piccoli, M. Scatolin Eds. Arsenale Editrice, Venice.

Reischl, U., Bretagne, S., Kruger, D., Ernault, P., & Costa, J.M. 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infectious Diseases* 2, 3-7.

Ruiz, A., and J. K. Frenkel. 1980. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 29, 1161-1166.

Ruiz, A., Frenkel, J.K., & Cerdas, L. 1973. Isolation of *Toxoplasma* from soil. *Journal of Parasitology* 59, 204-206.

Salant, H., Markovics, A., Spira, D.T., & Hamburger, J. 2007. The development of a molecular approach for coprodiagnosis of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology* 146, 214-220.

Say, L., Pontier, D., & Natoli, E.. 1999. High variation in multiple paternity of domestic cats (*Felis catus*) in relation to environmental conditions. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character 266, 2071-2074.

Stagno, S., Dykes, A.C., Amos, C.S., Head, R.A., Juranek, D.D., & Walls, K. 1980. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. *Pediatrics* 65: 706-712.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., & Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30, 1217-1258.

Turner, D.C., & Bateson, P.B. 2000. The Domestic Cat, the Biology of its Behaviour. Cambridge University Press.

Uga, S., Minami, T., and Nagata, K. 1996. Defecation habits of cats and dogs and contamination by *Toxocara* eggs in public park sandpits. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 54, 122-126.

Villena, I., Aubert, D., Gomis, P., Ferté, H., Inglard, J.-C., Denis-Bisiaux, H., Dondon, J.M., Pisano, E., Ortis, N., & Pinon, J.-M. 2004. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma*

gondii oocyst detection in water. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4035-4039.

Wainwright, K.E., Lagunas-Solar, M., Miller, M.A., Barr, B.C., Gardner, I.A., Pina, C., Melli, A.C., Packham, A.E., Zeng, Z., Truong, T., & Conrad, P.A. 2007. Physical Inactivation of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Water. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5663–5666.

2.4. Conclusions

2.4.1. Méthodes utilisées

2.4.1.1. Diagnostic sérologique

L'utilisation du MAT a nécessité de décider d'un seuil de positivité pour différentier les chats séronégatifs et séropositifs. Les méthodes employées généralement pour fixer le seuil des tests sérologiques reposent sur le principe du choix du titre d'anticorps qui présente la meilleure sensibilité (proportion d'animaux positifs parmi les animaux ayant réellement la maladie) et la meilleure spécificité (proportion d'animaux négatifs parmi les animaux n'ayant pas la maladie). Cependant, elles n'ont pas encore été expérimentées dans le cas du MAT. Le seuil de ce test est habituellement fixé à 1:25 (ou 1:20) dans l'étude de la séroprévalence de la toxoplasmose chez le chat (Silva et al., 2002 ; Dubey et al., 2002 ; Gauss et al., 2003). Cette valeur a été fixée d'une façon arbitraire (Dubey et al., 1995a), bien que Thulliez (1995) ait trouvé que la spécificité du test était optimale au titre 1:40 et que l'existence de faux-positifs ait déjà été rapportée avec un seuil à 1:25 (Dubey et al., 1995b).

Notre analyse mathématique a permis de mettre en évidence la discrimination de deux profils sérologiques de chats à partir du titre 1:40 (chapitre 2.2). Plus particulièrement, notre approche a montré que les chats négatifs (ayant un titre inférieur à 1:20) avaient également le titre 1:20 dans leur profil sérologique. A l'inverse, les chats ayant un titre supérieur ou égal à 1:40 n'ont presque jamais de résultats négatifs dans la suite de leur suivi. Ces résultats permettent de conduire l'analyse de la prévalence de la toxoplasmose dans les populations étudiées en gardant la cohérence interne des jeux de donnés et de comparer les résultats obtenus dans les différentes populations.

2.4.1.2. Méthode de détection des oocystes dans le sol

Aucune donnée n'étant disponible sur la sensibilité de la méthode de détection des oocystes de *T. gondii* à partir de l'inoculation sur souris, la comparaison entre la méthode que nous avons utilisé ici et les quelques études disponibles concernant la détection des oocystes dans le sol s'avère difficile. Notre méthode permet de détecter 100-1000 oocystes dans 1g de sol (chapitre 2.3). Elle paraît donc aussi sensible que les dernières méthodes développées pour la détection des oocystes dans les fèces (1-2 oocystes dans 200µg de fèces ; Salant et al., 2007). Cependant, la décomposition des fèces et la dissémination des oocystes dans le sol n'étant pas connue, nous n'avons pas d'indication sur les quantités d'oocystes contenues dans le sol en milieu naturel. Cependant les chats excrètent des millions d'oocystes après leur première infection (Dubey & Beattie, 1988), et nous avons montré que dans une population telle que celle de la Croix-Rousse, l'excrétion doit probablement se faire dans des zones de défécation. Comme notre technique n'a permis de mettre en évidence une contamination par les oocystes de *T. gondii* que dans ces zones de défécation, sa sensibilité pourrait ne la rendre efficace que pour détecter la présence d'oocystes dans les zones fortement contaminées, peu de temps après leur contamination. Nous estimons qu'elle ne permet pas de détecter les contaminations plus faibles dues à une excrétion d'oocystes plus ancienne ou une contamination due à la dissémination d'oocystes à partir d'un point d'excrétion de fèces.

La méthode de détection des oocystes utilisée dans notre étude a cependant permis de décrire d'une manière qualitative la présence de zones fortement contaminées par les oocystes dans un site urbain, ainsi que leur localisation par rapport aux aires utilisées par les chats. L'amélioration du protocole de détection des oocystes dans le sol est une des perspectives consécutives à ce travail. Le développement d'un protocole avec une meilleure sensibilité permettrait d'estimer la distribution spatiale du parasite à un niveau plus fin, notamment en quantifiant l'ADN contenu dans les échantillons de sol.

2.4.2. Séroprévalence et incidence chez les chats de l'hôpital de la Croix-Rousse

La séroprévalence de toxoplasmose des chats de l'hôpital de la Croix-Rousse est faible (18,6% ; chapitre 2.2). Bien que d'autres études aient estimé la séroprévalence de chats errants urbains (Tableau II.1), aucune mention n'a été faite sur la présence d'hôtes intermédiaires sur les sites de capture. Il est donc difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature. Dans l'étude de Lucas et al. (1999), les chats errants qui mangent exclusivement de la nourriture commerciale ou des restes de repas préparés ont une séroprévalence de 18,4% (49 chats testés), alors que ceux qui mangent également de la viande crue ont une séroprévalence de 30,3% (66 chats testés). Une telle différence pourrait être observée entre la population de l'hôpital de la Croix-Rousse et une population installée dans un site où les hôtes intermédiaires sont disponibles en abondance. L'étude gagnerait donc à être répétée dans d'autres sites en milieu urbain avec un niveau variable de densité d'hôtes intermédiaires.

Bien que la séroprévalence soit faible dans la population de chats errants de l'hôpital de la Croix-Rousse, la densité de cette population étant élevée, la contamination potentielle de l'environnement est loin d'être négligeable : nous avons estimé que 5 à 13 chats sont contaminés dans le site chaque année (chapitre 2.2). Seize zones de défécation ayant été identifiées dans l'enceinte de l'hôpital (chapitre 2.3), on peut imaginer que, à raison d'une fèces contaminée par jour pendant la période d'excrétion des oocystes (1 à 3 semaines, quelques jours après la première infection dans le cas de l'ingestion d'une proie contaminée, et moins de 3 semaines, 13 à 18 jours après l'infection dans le cas de l'ingestion d'un nombre important d'oocystes ; Dubey, 1998a ; 2006), les chats pourraient contaminer une large partie des zones de défécation. Cette contamination pourrait être entretenue dans le temps, non seulement parce que le parasite peut résister de longues périodes dans l'environnement (Frenkel et al., 1975), mais également parce que chaque année, plusieurs chats sont de nouveau contaminés et excrètent des oocystes. Ainsi, nous avons pu détecter des oocystes dans 5 des 16 zones de défécation (chapitre 2.3).

2.4.3. Facteurs associés à la séroprévalence

Nos travaux ont montré que dans un site où les chats exercent peu la prédation, la transmission du parasite est influencée par des variables reflétant la survie des oocystes (températures et précipitations) : la prévalence est plus élevée après une année pluvieuse et chaude (chapitre 2.2). En laboratoire, la survie des oocystes est affectée au dessus de 35°C (Frenkel et al., 1975). Ainsi, de nombreux auteurs évoquent la variabilité du climat pour expliquer les variations de prévalence observées dans les populations humaines entre les différentes régions du monde (AFSSA, 2005). Dans l'étude de Vollaire et al. (2005), les prévalences les plus faibles sont relevées dans les populations humaines vivant dans les zones les plus arides des Etats-Unis. Hubálek (2005) rapporte une corrélation entre l'augmentation du niveau de prévalence humaine en République Tchèque et les années clémentes (climat doux et pluvieux).

Notre étude est la première à montrer que la toxoplasmose du chat ne se propage pas de manière constante au fil du temps mais dépend au contraire des conditions de température et d'humidité et donc que la contamination environnementale par les chats n'est pas non plus un phénomène constant.

Enfin, il est intéressant de noter que parmi les facteurs associés à la séroprévalence dans la population urbaine étudiée, il n'apparaît hormi l'âge que des variables reflétant la distribution spatio-temporelle du parasite (chapitre 2.2) : la localisation des chats dans l'hôpital, et leur origine dans ou hors de la population de chats. Ces premiers résultats suggèrent que la séroprévalence chez le chat serait plus associée à un type d'environnement qu'à un profil de chat à risque. L'abondance des ressources alimentaires anthropogéniques et la composition du paysage local (et donc la structuration des populations de chats, ainsi que la présence de zones humides et ombragées favorisant la survie des oocystes) constituent des déterminants de la circulation du parasite entre les hôtes. Cela n'exclut pas la possibilité que certains chats soient plus sensibles que d'autres. Cependant la population de Lyon, fortement homogène génétiquement, n'est pas un site propice pour mettre en évidence une telle variabilité.

2.4.4. Titres en anticorps

La cinétique d'anticorps anti-*T. gondii* au cours du temps chez le chat n'était jusqu'à présent connue que grâce à des études effectuées en laboratoire (Pestre-Alexandre et al., 1984 ; Dubey et al., 1995b). Notre étude a montré qu'en milieu naturel, les chats gardent des anticorps anti-*T. gondii* durant toute leur vie (chapitre 2.2) : l'immunité acquise après la première infection est donc durable. De plus, contrairement aux observations réalisées en laboratoire pour lesquelles le titre d'anticorps diminue avec le temps (Pestre-Alexandre et al., 1984), nous avons montré que le taux d'anticorps restait stable dans le temps dans une population naturelle de chats errants. Il est cependant possible que pour certains chats, la présence d'anticorps à taux élevé au bout de plusieurs années soit due à une relance de l'immunité causée par une recontamination ou une réactivation (Dubey, 1995 ; Tenter et al., 2000). Nos résultats montrent que, comme chez l'humain (Cimon et al., 2002), il apparaît difficile de déduire le délai depuis l'acquisition de l'infection en considérant uniquement la valeur du titre d'anticorps IgG au moment de la prise de sang.

2.4.5. Distribution spatiale de la contamination environnementale

Notre étude sur la contamination du sol du site de l'hôpital de la Croix-Rousse par les oocystes de *T. gondii* (chapitre 2.3) a montré que la présence d'oocystes dans le sol entourant l'hôpital est principalement détectée dans des zones de défécation communes à plusieurs chats (chapitre 2.3). La probabilité de contamination de ces zones ne semble pas dépendre de leur fréquence d'utilisation par les chats. La présence d'oocystes dans le sol est en effet très hétérogène et limitée à des zones de quelques mètres carrés ou moins : dans toutes les zones de défécation, elle a été détectée dans un ou deux quadrats d'échantillonnage de 1 m^2 parmi 4 quadrats échantillonnés. La prévalence est elle aussi distribuée d'une façon très localisée (chapitre 2.2) : les chats venant de l'extérieur de l'hôpital sont plus souvent positifs que les chats nés dans l'hôpital, et les chats vivant au nord de l'hôpital montrent également une prévalence plus importante que les chats du sud de l'hôpital.

Cette disparité spatiale est intéressante à remarquer : dans l'étude de la contamination du sol, toutes les zones de défécation trouvées positives (5/16) étaient situées dans le sud de

l'hôpital. Le fait que les chats soient moins souvent contaminés au sud laisse à penser que les zones de défécation y sont contaminées parce que le nombre de chats qui y défèquent est plus important. De plus, les zones de défécation pour lesquelles de l'ADN de *T. gondii* a été retrouvé présentaient des caractéristiques communes : elles étaient toutes dans des secteurs ombragés, protégés par la végétation, et deux de ces zones se trouvent dans les sous-sols de l'hôpital, humides et protégées du soleil. La présence d'ADN dans ces zones de défécation peut être expliquée en supposant que la survie des oocystes y soit bonne. Une des perspectives de ce travail pourrait être d'approfondir cette disparité nord/sud : si on retrouve plus d'individus contaminés au nord de l'hôpital, on peut se demander pourquoi les zones de défécation ne contiennent pas d'oocystes. Une hypothèse peut être que le niveau de contamination du sol est directement relié à la composition du paysage et du sol dans les zones de défécation, à une échelle très locale (quelques mètres carrés) : proximité d'un mur, présence de végétation, durée d'exposition au soleil au cours de la journée, humidité, d'où une disparité très locale des conditions de survie et, dans notre cas, l'absence d'oocystes serait la conséquence d'une mauvaise survie des oocystes à une échelle très locale et/ou de la sensibilité moyenne de la méthode de détection. Une autre explication à la répartition particulièrement hétérogène du parasite pourrait également être la position des zones de défécation par rapport au domaine vital des chats. En effet, les zones de défécation trouvées infectées étaient situées dans des endroits peu fréquentés par les chats du site, mais qui pourraient être utilisées par les chats venant de l'extérieur. Il n'est pas non plus à exclure que les chats nouvellement contaminés puissent s'éloigner de leur domaine vital pour déféquer, protégeant ainsi leur territoire de la contamination. Enfin, il est également possible que le manque de sensibilité de la méthode de détection des oocystes ne nous ait pas permis vérifier qu'il n'y a pas d'oocystes dans la partie nord de l'hôpital.

2.4.6. Conclusion

En accord avec les hypothèses de Choisy et al. (2003), la transmission du cycle parasitaire semble être peu efficace dans une population urbaine où la prédation est peu importante : moins de 20% des chats sont porteurs d'anticorps et ont été en contact avec le parasite. La contamination des chats, probablement liée à la présence d'oocystes dans l'environnement, est limitée par le fait que chez cet hôte les oocystes sont peu pathogènes et

peu virulents. De plus, la contamination verticale semble être rare chez le chat en milieu naturel. Cependant, compte tenu de la forte densité de chats la population étudiée, la faible séroprévalence n'exclue pas que l'environnement puisse être localement très contaminé et, donc, constituer une source de risque significative pour les personnes exposées.

Nos travaux suggèrent que la contamination de l'environnement urbain est probablement répartie de façon très hétérogène dans l'espace, avec l'existence de zones très contaminées qui s'étendent sur quelques mètres carrés au maximum. Or, le domaine vital d'un hôte intermédiaire peut être très petit : par exemple, les espèces du genre *Apodemus* vivent dans une zone de 100-180m de diamètre (Le Louarn & Quéré, 2003). Il est donc possible qu'en faible densité d'hôtes intermédiaires, et compte tenu de l'hétérogénéité de la contamination spatiale de l'environnement par les oocystes de *T. gondii*, un hôte intermédiaire ne rencontre jamais le parasite. A l'inverse, si la contamination de l'environnement et la densité d'hôtes intermédiaires sont suffisantes pour favoriser la rencontre de ces hôtes avec le parasite, et également avec les hôtes définitifs, la circulation du parasite pourrait être optimale. Ainsi, dans la suite de nos travaux, nous avons étudié la dynamique du cycle de *T. gondii* dans des milieux où les hôtes intermédiaires sont abondants.

Troisième partie

Dynamique de la transmission de *Toxoplasma gondii* dans les milieux riches en hôtes intermédiaires

« Quand les hirondelles volent bas, les souris dansent parce qu'elles se sont trompées de proverbe. »

François Cavanna

3.1. Introduction

Dans la suite de nos travaux, nous avons entrepris l'étude des facteurs qui modulent la dynamique de la transmission de *T. gondii* dans des milieux où les hôtes intermédiaires sont abondants. Nous avons supposé que la prévalence peut être plus élevée dans les milieux où les densités d'hôtes intermédiaires relativement aux hôtes définitifs sont sufffisantes pour favoriser leur rencontre. Compte-tenu de la distribution cosmopolite du chat domestique, et de la présence en France du chat forestier, ces milieux sont très variés, allant depuis les zones péri-urbaines jusqu'au milieu non-anthropisé, incluant les villages, les fermes, les cultures, les prairies, les milieux bocagers semi-ouverts et les forêts. En fonction du milieu étudié, des niveaux de variabilité des prévalences devraient donc exister dans tous les compartiments du cycle de *T. gondii*. Dans la partie précédente de nos travaux, nous avons vu que, chez l'hôte définitif, la densité ainsi que le comportement de prédation et d'élimination peuvent déterminer l'importance de la contamination environnementale. On s'attend également à ce que la variabilité de densité des populations d'hôtes intermédiaires et de leur niveau d'infection entraîne un risque variable de contamination des hôtes définitifs. La survie des oocystes est considérée comme conditionnant le risque d'exposition au parasite chez les différents types d'hôtes.

3.1.1. Exposition des prédateurs : toutes les proies ne sont pas équivalentes

L'étude de la séroprévalence chez les proies du chat a été entreprise de manière inégale, et s'est surtout concentrée sur les rongeurs commensaux comme la souris domestique et le rat brun, dont les populations sont régulièrement décrites comme ayant de fortes séroprévalences : jusqu'à 70% chez le rat brun en Italie (Genchi et al., 1991) et 59% dans une population de souris domestiques en milieu sub-urbain en Angleterre (Marshall et al., 2004). Les séroprévalences observées chez ces espèces sont généralement élevées quand elles vivent près des fermes d'élevage (Dubey & Frenkel, 1998 ; Lehmann et al., 2003). Cependant, ces

fortes séroprévalences ne sont pas observées chez toutes les espèces d'hôtes intermédiaires et dans tous les milieux. Ainsi, la séroprévalence des rongeurs forestiers est généralement faible : 0 à 10% chez les mulots (Kapperud, 1978 ; Jackson et al., 1986 ; Jeon & Yong, 2000), ou 0 à 9% chez le campagnol roussâtre (Kapperud, 1978 ; Jackson et al., 1986). Peu d'information est disponible sur le niveau de séroprévalence des rongeurs de prairie en conditions naturelles. La seule étude réalisée en France sur plusieurs espèces capturées dans différents types de milieux fait état de 0,4% de séroprévalence chez le mulot sylvestre (N = 243), 0% chez le campagnol roussâtre (N = 243), 0% chez le campagnol agreste (N = 44), ou encore 1% chez la souris domestique (N = 295 ; Doby et al., 1974). Parmi les proies des chats vivant en dehors des zones d'habitations humaines, le lapin de garenne semble être souvent infecté : la séroprévalence varie de 6% à 15% pour des populations variées vivant dans des endroits secs (Tenter et al., 2000), et peut atteindre 54% en milieu forestier en Espagne (Almeria et al., 2004).

Les différences dans le niveau de séroprévalence de ces espèces peuvent être expliquées par plusieurs facteurs. Chez la souris et le rat, l'infection peut être transmise de la mère aux petits, ce qui pourrait contribuer à la perpétuation de la transmission du parasite : une ratte peut transmettre le parasite à 30 à 75% de ces petits, en fonction de la souche de *T. gondii* (Beverley, 1959 ; Dubey & Frenkel, 1998 ; Webster, 1994). Cependant la possibilité d'une transmission verticale n'a été mise en évidence que chez un petit nombre d'espèces, et il est possible que son importance diffère d'une espèce à l'autre. De plus, si on suppose que le mode d'infestation le plus courant chez ces espèces est l'ingestion d'oocystes depuis l'environnement, les différences de séroprévalences peuvent s'expliquer par une différence de sensibilité des espèces à l'infection par les oocystes. Des expériences réalisées en laboratoire révèlent en effet que le campagnol des champs est moins sensible à *T. gondii* que la souris domestique : en administrant les mêmes doses d'oocystes (100 à 1000) aux deux espèces, toutes les souris meurent alors que les campagnols développent une immunité. Le rat brun est peu affecté par l'infection et développe une immunité durable (Dubey & Frenkel, 1998). Par ailleurs, on peut s'attendre à observer une accumulation du risque d'exposition aux oocystes avec l'âge, opposant les espèces ayant les plus longues durées de vie (lapin de garenne, 10 ans ; Ernest, 2003) à celles ayant les plus courtes (campagnol des champs, 3 ans ou mulot sylvestre, 4 ans ; Ernest, 2003). Enfin, le niveau de séroprévalence des populations de proies pourrait être relié à la contamination de l'environnement dans lequel elles vivent : on peut s'attendre par exemple à ce que les rongeurs vivant en prairie ou dans des milieux bocagers (principalement le campagnol terrestre, le campagnol des champs ou le campagnol agreste) soient plus exposés aux oocystes émis par de nombreux chats, que les rongeurs vivant en

milieu forestier (les mulots, et le campagnol roussâtre) où la densité de chats est moins importante. Les bonnes conditions de survie des oocystes qu'offre le milieu forestier (couvert végétal, ombre et humidité) pourraient cependant favoriser la contamination du milieu forestier : Almeria et al. (2004) rapportent des séroprévalences plus fortes chez le lapin de garenne en milieu forestier dans des zones humides et ombragées qu'en milieu ouvert.

Du fait de ces différences, on peut s'attendre à ce que toutes les populations de proies ne représentent pas le même risque de contamination pour le chat. Il apparaît donc nécessaire d'une part, de déterminer quels facteurs peuvent permettre de prédire le niveau de séroprévalence chez les populations de proies et, d'autre part, d'estimer dans quels types de milieux les populations prédatrices consomment les hôtes intermédiaires.

3.1.2. Diversité des populations prédatrices

En France, la diversité du paysage rural permet la coexistence de deux sous-espèces de félidés : le chat forestier et le chat domestique. Parmi les chats domestiques, on distingue plusieurs types en fonction de leur dépendance à l'homme. Les chats auxquels l'homme fournit volontairement de la nourriture et un abri sont les chats dits « familiers » (ou chats de propriétaires), les chats de fermes sont tolérés par les agriculteurs pour contrôler les populations de rongeurs commensaux dans les bâtiments (Turner & Bateson, 2000), et les chats errants mènent une vie sauvage commensale de l'homme qui lui assure une partie de sa nourriture (Artois et al., 2002). Enfin, les chats féraux sont des chats dometiques retournés à la vie sauvage, et qui sont indépendant de l'homme et subviennent eux-mêmes à leurs besoins (Artois et al., 2002). De leur dépendance à l'homme va dépendre leur milieu de vie et leur mode de vie, ainsi que la part de ressources anthropogéniques dans leur régime alimentaire.

En milieu rural, la distribution spatiale des habitations humaines détermine celle des chats domestiques (Pontier, 1993). La densité est plus faible qu'en milieu urbain et varie entre 10 et 200 chats par km² (Artois et al., 2002). La plupart des chats ont un propriétaire qui les abrite et les nourrit mais ils sont libres de leurs déplacements (Liberg, 1981). Bien qu'ils soient nourris par leur propriétaire, une partie importante de l'alimentation des chats domestiques en milieu rural peut provenir de la prédation (Artois et al., 2002 ; Turner & Bateson, 2000) : 15 à 90% selon le mode de vie des chats (Liberg, 1984). Dans des hameaux

isolés, des fermes ou même à l'intérieur des villages, les chats peuvent former des groupes comprenant jusqu'à 20 individus, souvent constitués autour de femelles apparentées et de leurs petits (Turner & Bateson, 2000). Les mâles reproducteurs vivent en solitaire, sur de grands domaines vitaux englobant un ou plusieurs groupes de femelles (Liberg, 1980). Les chats de fermes passent généralement la plupart de leur temps dans la ferme où ils chassent rats et souris (Turner & Bateson, 2000), mais peuvent également chasser dans les prairies adjacentes et consommer des campagnols (campagnol terrestre et campagnol des champs).

Le milieu forestier constitue une part variable du domaine vital du chat forestier, de certains chats domestiques féraux, et de leurs hybrides (Coman & Brunner, 1972 ; Corbett, 1979 ; Stahl & Léger, 1992). Les chats féraux ont comme caractéristique commune qu'ils ne dépendent pas de l'homme et vivent de la prédation. Bien qu'aucune méthode d'estimation de la densité n'ait été mise au point chez le chat forestier, plusieurs auteurs estiment qu'elle pourrait être de l'ordre de quelques individus (1 à 5) pour une surface de 10 km² (Raimer & Schneider, 1983 ; Stahl et al., 1988). Les chats forestiers vivent en solitaire, mâles et femelles se rencontrant pour de courtes durées pendant les périodes de reproduction (Stahl & Léger, 1992). Le régime alimentaire des chats forestiers et des hybrides est très semblable à celui des chats domestiques en milieu rural : il est essentiellement composé de petits rongeurs (campagnol des champs, campagnol roussâtre, mulots, souris domestique, rat brun) et parfois d'oiseaux (Stahl & Léger, 1992 ; Turner & Bateson, 2000 ; Biró et al., 2005). Les proies sont en général capturées dans des milieux ouverts ou semi-ouverts, comme des lisières de prairies, des parcelles de recolonisation forestière ou des clairières de régénération (Stahl & Léger, 1992). Le régime alimentaire des chats domestiques comporte une part plus ou moins variable de nourriture fournie par l'homme, moins présente dans le régime alimentaire du chat forestier et des hybrides (Biró et al., 2005).

Les populations de chats en milieu non anthropisé ont été peu étudiées (Turner & Bateson, 2000). Elles constituent un extrême dans le gradient de densité et de socialité en comparaison des populations urbaines ou rurales, et se rapprochent des populations du milieu forestier car elles survivent de la prédation sans dépendre de l'homme. En milieu subantarctique, comme dans les îles Kerguelen, les chats vivent de la chasse et s'abritent dans des terriers ou cavités naturelles qui déterminent leur répartition spatiale (Derenne, 1976, Pascal, 1980). Les lapins de garenne constituent la proie la plus consommée, suivis de souris domestiques ainsi que d'oiseaux (*Pterodroma lessonii*, *Pachyptila desolata*, et *Procellaria aequinoctialis* ; Pontier et al., 2002). Les chats vivent en faible densité (1 à 3 chats par km²) et

ont de grands domaines vitaux (jusqu'à 4 km² ; Say et al., 2002). Les adultes semblent solitaires, les seuls groupes observés étant des groupes mère-chatons (Derenne, 1976).

La variabilité de la contamination de l'environnement par les oocystes de *T. gondii* excrétés dans les fèces de chats pourrait être le reflet de celle de leur organisation sociale et spatiale. En milieu rural, les chats sont en densité moyenne peuvent utiliser des zones de défécation communes au groupe social (Yamaguchi et al., 1996), ce qui pourrait avoir pour conséquence de concentrer les oocystes dans des zones fréquentées par les chats et les hôtes intermédiaires. Dans les fermes, des groupes de chats domestiques passent la plupart de leur temps autour des bâtiments et dans les prairies les entourant (Weber & Daily, 1998), où ils peuvent déféquer, exposant les rongeurs commensaux à la contamination. A l'inverse, les chats domestiques des îles Kerguelen ou ceux vivant en milieu forestier sont présents en très faible densité et mènent une vie solitaire territoriale. Ils peuvent déféquer sur leur territoire à proximité des gîtes, les fèces étant parfois rassemblés sur quelques mètres (Stahl & Léger, 1992). Corbett (1979) a également observé que les chats forestiers pouvaient déposer des fèces dans le territoire occupé par un autre chat. Compte-tenu de la superficie du domaine vital des chats vivant dans ces milieux (par exemple 600 ha pour des chats forestiers femelles en Ecosse ; Corbett, 1979), la contamination environnementale par les oocystes de *T. gondii* pourrait être dispersée dans l'espace, et la rencontre d'un hôte intermédiaire avec un oocyste serait alors peu fréquente. Cependant, la présence d'hôtes intermédiaires en grande quantité dans le régime alimentaire des chats prédateurs pourrait contribuer à maintenir un niveau de prévalence important chez ceux-ci : le chat domestique, par exemple, peut consommer 130g à 200g de proies chaque jour (Artois et al., 2002) et accumuler les risques de rencontrer une proie contaminée.

3.1.3. Séroprévalence chez l'hôte définitif

La prévalence de la toxoplasmose en milieu offrant une abondance d'hôtes intermédiaires a surtout été étudiée chez le chat domestique en milieu rural. Peu d'études ont conduit leur échantillonnage sur la base des populations naturelles de chats. L'étude exploratoire de Lickey et al. (2005) a permis d'estimer la séroprévalence de chats vivant à l'intérieur de villages ruraux au Guatemala (chats de propriétaire et chats errants) à 53% (IFAT, ≥ 1:10). Les chats qui ont le plus régulièrement accès au milieu extérieur sont les plus

souvent positifs (Dubey et al., 2002 ; Miró et al., 2004). Ayant un accès fréquent aux hôtes intermédiaires, ils sont plus exposés à *T. gondii* que les chats qui chassent occasionnellement. Les fermes d'élevage semblent constituer un milieu propice à la concentration du parasite : la forte séroprévalence observée chez des chats de ferme (68%, MAT, ≥ 1:25) capturés dans des fermes d'élevage de porc en Illinois (Etats-Unis) a été reliée aux fortes séroprévalences trouvées chez les rongeurs commensaux (47%, MAT, ≥ 1:25 ; chez le rat brun, la souris domestique et la souris à pattes blanches) vivant dans les bâtiments des fermes (Dubey et al., 1995c). Yamaguchi et al. (1996) rapportent la présence de seize zones de défécation communes à plusieurs chats autour des points de nourrissage dans une ferme d'élevage de vaches. La présence du rat brun en abondance et le fait que les chats vivant en colonie ont plus de chance d'être en contact avec les fèces de leurs congénères, sont évoqués pour expliquer la forte séroprévalence chez les chats de ferme (62%). Une étude chez des chats domestiques en milieu sub-urbain et rural en Corée fait figure d'exception : la faible séroprévalence chez ces chats (13%, LAT, ≥ 1:32) est reliée à celle observée chez l'homme (2 à 10%) sans évoquer d'explication (Sohn et al., 1999).

Comme le chat forestier est un animal difficile à capturer, qu'il bénéficie du statut d'espèce protégée dans la plupart des pays Européens (annexe II de la convention de Berne), et que son milieu de vie est peu fréquenté par l'homme, il a été l'objet de relativement peu d'études. La seule estimation d'une séroprévalence chez le chat forestier provient d'une étude réalisée en Ecosse sur un petit nombre d'individus (N = 23) et a été estimée à 100% (McOrist et al., 1991). Les auteurs concluent que le chat forestier est une source de contamination possible pour le chat domestique et l'homme, en contaminant le milieu forestier et les milieux de prairie dans lesquels il chasse.

Enfin, aucune étude ne rapporte de séroprévalence chez le chat domestique en milieu non anthropisé. Cependant, elle pourrait se rapprocher du niveau de prévalence du chat forestier : les deux sous-espèces vivent quasi-exclusivement de la prédation (Stahl & Léger, 1992 ; Pontier et al., 2002) et accumulent les risques de rencontrer un hôte contaminé ou une forme libre de *T. gondii* au cours de leur vie.

3.1.4. Objectifs et hypothèses

L'objectif de nos travaux était ici d'étudier la variabilité de la dynamique de la transmission de *T. gondii* dans des milieux contrastés, riches en hôtes intermédiaires. Les différentes espèces d'hôtes intermédiaires présentant des niveaux d'infection fortement variables, nous avons dans un premier temps cherché à déterminer des indicateurs de la variabilité interspécifique de la prévalence des hôtes intermédiaires de *T. gondii*, puis nous avons étudié les conséquences de cette variabilité sur le risque d'infection chez le chat. Nous supposions que la différence interspécifique du niveau d'infection pourrait être reliée d'une part au milieu de vie des espèces, et d'autre part à leurs traits d'histoire de vie. Ainsi, si des différences significatives du niveau d'infection des hôtes intermédiaires sont déterminées, nous supposons que le risque d'infection chez le chat pourrait dépendre de la composition de son régime alimentaire.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé la dynamique de l'infection de populations de chats domestiques et chats forestiers. Notre hypothèse de travail était que la transmission de *T. gondii* pourrait être favorisée dans les milieux où les populations d'hôtes intermédiaires sont en densité élevée. En milieu rural, nous supposions que des différences dans le niveau de prévalence des chats pourraient exister entre les zones plus ou moins proches des lieux habités. Enfin, les fermes pourraient représenter un lieu propice à la transmission du parasite, par leur abondance d'hôtes intermédiaires et de chats concentrés en un même lieu.

Afin d'étudier la variabilité interspécifique du niveau d'infection chez les hôtes intermédiaires proies du chat, nous avons estimé la séroprévalence de différentes espèces de micro-mammifères vivant en forêt à la surface du sol, ainsi que chez des fouisseurs vivant en prairie. Des sessions de piégeages ont ainsi eu lieu en Octobre 2005 et en Octobre 2006, en milieu forestier dans le Parc de Bel-Val (Ardennes) et dans les prairies avoisinantes du village de Boult-Aux-Bois (Ardennes). Cette étude a donné lieu à la publication suivante :

Eve AFONSO, Marie-Lazarine POULLE, Mélissa LEMOINE, Isabelle VILLENA, Dominique AUBERT, et Emmanuelle GILOT-FROMONT. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in small mammals from the Ardennes region, France. *Folia Parasitologica* 54(4), 313-314.

Par ailleurs, d'autres paramètres que le mode de vie pourraient expliquer les différences dans le niveau d'infection des hôtes intermédiaires. Chez les rongeurs et les

lagomorphes, la masse corporelle peut refléter la durée de vie ainsi que les besoins énergétiques et le domaine vital (Degen et al., 1998 ; Speakman, 2005 ; Ottaviani et al., 2006), qui peuvent expliquer en partie le risque d'exposition au parasite. Nous avons donc mené une étude bibliographique afin de relier la masse corporelle des rongeurs et des lagomorphes à leur niveau d'infection. Nous avons ensuite étudié la relation entre le régime alimentaire de chats domestiques vivant exclusivement grâce à la prédation, et leur séroprévalence pour la toxoplasmose. Cette étude a résulté en la publication suivante :

Eve AFONSO, Philippe THULLIEZ, Dominique PONTIER, et Emmanuelle GILOT-FROMONT. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey are equal. *Parasitology* 134(4), 1963-1971.

Dans la suite de ce travail, nous avons étudié des populations de chats vivant en milieu rural ou forestier, où les hôtes intermédiaires sont disponibles en abondance. Nous avons cherché à relier des caractéristiques individuelles ainsi que les caractéristiques du paysages et la variabilité du climat au niveau d'infection de la toxoplasmose chez les hôtes définitifs.

Dans un premier temps (chapitre 3.4), nous étudions le risque de séroconversion de trois populations de chats domestiques en milieu rural. Ce chapitre est basé sur la publication suivante en cours de préparation :

Eve AFONSO, Philippe THULLIEZ, and Emmanuelle GILOT-FROMONT. Factors influencing the seroconversion to anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in rural cats (*Felis catus*) in France. Manuscrit en cours de préparation.

Puis, dans un deuxième temps (chapitre 3.5), nous analysons les données issues de récolte de cadavres de chats forestiers et de chats domestiques dans le grand quart nord-est de la France. Nous étudions le niveau d'infection de ces deux sous-espèces d'hôte définitif, notamment en reliant des caractéristiques de l'environnement (ici densité d'exploitations agricole dans le paysage) ou du climat (indice NAO d'hiver) à la probabilité que les chats soient porteurs d'anticorps. Ce chapitre est basé sur la publication suivante en cours de préparation.

Eve AFONSO, Estelle GERMAIN, Marie-Lazarine POULLE, Dominique PONTIER, Isabelle VILLENA, Dominique AUBERT, Sandrine RUETTE, François LEGER, et Emmanuelle GILOT-FROMONT. Spatio-temporal variability in the prevalence of *Toxoplasma gondii* in definitive hosts in rural areas in France. Manuscrit en cours de préparation

3.2. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in small mammals from the Ardennes region, France.

Eve AFONSO, Marie-Lazarine POULLE, Mélissa LEMOINE, Isabelle VILLENA, Dominique AUBERT, et Emmanuelle GILOT-FROMONT

Folia Parasitologica, 54(4), 313-314 (2007).

Abstract. Serum samples from 218 small mammals trapped in forest and grassland in the Ardennes region (North-eastern France) were tested for antibodies to *Toxoplasma gondii*. Using the modified agglutination test, positive results were found in 4/92 *Apodemus* sp., 3/64 *Clethrionomys glareolus*, 0/26 *Microtus agrestis*, 0/4 *Micromys minutus*, 3/5 *Sorex* sp., 2/9 *Arvicola terrestris*, and 7/18 *Talpa europaea*. *T. gondii* was not isolated from the heart of seropositive individuals after bioassay in mice. Seroprevalence was significantly higher in large fossorial mammals living in grasslands than in small forest mammals, probably related to ecological factors.

Even if felids are the only hosts that can excrete oocysts in the environment, infection by the protozoan *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908) is widely prevalent in numerous species of warm-blooded animals (Dubey and Beattie 1988). Ecological and behavioural factors like feeding behaviour or use of space (De Thoisy et al. 2003) as well as the differences in soil contamination can influence the level of infection of intermediate hosts. Species of small mammals living under the surface of the ground and/or feeding from the ground are thus expected to be in contact with *T. gondii* oocysts. We predicted that the prevalence of *T. gondii* should differ from one species of small mammals to another, according to differences in their behaviour (fossorial *versus* non fossorial species) and habitat (forest *versus* grassland) leading to differences in their potential exposure to the parasite. Our aim was thus to explore the prevalence of *T. gondii* in several small mammal species, which differ in their behaviour, in forest and grassland areas where felids were present.

Small mammals were trapped between October 2005 and October 2006 in the Ardennes region (North-eastern France) in two trapping sites: the 600 hectares Bel-Val private park (49°28’11”N, 5°02’13”E) composed by 80% of forest on one side, and the grasslands surrounding the Boult-aux-Bois village (49°25’58”N, 4°50’57”E) on another side. Wildcats *Felis silvestris silvestris* (Schreber) and domestic cats *Felis silvestris catus* (L.) have been frequently observed in these two sites.

A standardized trapping method was used in forest. Lines of 34 INRA live-traps were placed every three meters during three nights, and checked once a day (Spitz et al. 1974). We used 12 (in October 2005) and 11 (in October 2006) trap lines located on different parcels that represent six main habitats of the Bel-Val park, considered as representative of forest cover surface in the Ardennes: open and closed forests, plot of regeneration, and their respective edges. Two lines of traps were placed in each habitat, except for the closed forest in October 2006, where only one line was placed. We then conducted 2346 trap-nights. Fossorial small

mammals of grassland were trapped with Topcat traps (TOPCAT, GmbH, Wintersingen, Switzerland). Twenty traps were placed in galleries between two hills from one to three nights, and checked every two to four hours. We conducted 218 trap-nights.

All animals were dissected in the laboratory. Blood was obtained by overflowing the heart in a drop of distilled water and heart washings were tested for IgG antibodies to *T. gondii* using the modified agglutination test (MAT; Dubey and Desmonts 1987). The hearts of seropositive animals were stored in aqueous sterile sodium chloride (0.9%) solution (saline) and antibiotics from four to six days at 4°C. Hearts of seropositive animals were bioassayed individually in mice. For bioassay, heart was first pounded and mixed homogenized with a 0.25% trypsin suspension (90 min, 37°C). The mixture was filtered through gauze and centrifuged, and supernatant was suspended in saline solution containing penicillin G, streptomycin and amoxicillin and inoculated intraperitoneally in two mice. Hearts of all seronegative animals were mixed in pools of 10 to 16 hearts by species. The inoculation procedure was also proceeded in pools of hearts of the seronegative animals. Serum of inoculated mice was tested with MAT at 1:25 dilution four weeks after inoculation.

A total of 218 individuals was trapped (Table I). Most of the 191 animals trapped in forest were wood mice *Apodemus* sp. and bank voles *Clethrionomys glareolus*. A few field voles *Microtus agrestis*, shrews *Sorex* sp. and harvest mice *Micromys minutes* were also trapped in this habitat. In grassland, 9 water voles *Arvicola terrestris* and 18 moles *Talpa europaea* were trapped. *Toxoplasma gondii* was not isolated from the heart of any animal.

The low seroprevalence in small forest rodents in the present study is similar to reports by others (Kapperud 1978, Hejlíček et al. 1997). By contrast, the high seroprevalence (22–39%) we found in fossorial mammals trapped in grassland is considerably higher than the 2% seroprevalence found previously in these animals in France (Doby et al. 1974, Kia et al. 2004). The seroprevalence was higher in grassland fossorial animals than in forest small mammals living on the surface of the ground (9/27 versus 10/191; Fisher's exact test, $P<0.001$). Although the sample size of grassland animals trapped in this study was low, it was sufficient to compare seroprevalences between grassland and forest animals, due to the considerable difference between the two seroprevalences: the power of the test comparing the two groups was of 96% (i.e. the type II error was 4% with a type I error of 5%).

Table I. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in 218 small mammals trapped in the Ardennes (France), as determined by the modified agglutination test.

Species	Positive / Tested		Total	Prevalence (%) [95 CI]
	2005	2006		
Forest				
Apodemus sp.	3/83	1/9	**4/92**	4 [2 ; 11]
Clethrionomys glareolus (Schreber)	1/59	2/5	**3/64**	5 [2 ; 13]
Micromys minutus (Pallas)	0/4	-	**0/4**	0 [0 ; 49]
Microtus agrestis (L.)	0/10	0/16	**0/26**	0 [0 ; 13]
Sorex sp.	0/1	3/4	**3/5**	60 [23 ; 88]
Grassland				
Arvicola terrestris (L.)	No sample	2/9	**2/9**	22 [6 ; 55]
Talpa europaea (L.)	No sample	7/18	**7/18**	39 [20 ; 61]

Several factors may explain this difference. First, the level of soil contamination may be different according to the habitat, because of their use by cats: wildcats and feral domestic cats frequently hunt in grasslands while forests are most frequently only used by wildcats (Fitzgerald and Turner 2000). Additionally, water voles and moles are fossorial species that have extensive contact with soil (and oocysts), by digging soil for building galleries or searching food. Moles also eat earthworms, which have been identified as paratenic and transport hosts of the parasite (Ruiz and Frenkel 1980, Bettiol et al. 2000). Finally, water voles and moles have a large body mass compared to forest species. Large body mass is correlated to a higher prevalence for toxoplasmosis in small mammals (Afonso et al. 2007), probably because of a longer lifespan and higher energy requirements that can explain a higher exposure to *T. gondii*, or also a difference in susceptibility.

Animal species present in forest and grassland are exposed to *T. gondii* and may be a potential source of infection if they are consumed by cats, with insectivorous and grassland species being most often infected. In particular, the water vole (*Arvicola terrestris*) may

represent an important host in the transmission of the parasite because it is generally the main prey of the cats when it is abundant (Fitzgerald and Turner 2000).

The authors thank the persons who participated to the fieldwork, the director of the Bel-Val park where some trapping sessions were performed, and Régine Geers for laboratory investigations. The authors also sincerely thank anonymous referees for improving the English and helpful comments. This research was financially supported by the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET) and the Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise. Eve Afonso received grants from the Grünenthal France Laboratory and the Région Champagne-Ardenne.

REFERENCES:

Afonso, E., Thulliez, P., Pontier, D., & Gilot-Fromont, E. 2007. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. *Parasitology*, In press.

Bettiol, S.S., Obendorf, D.L., Nowarkowski, M., Milstein, T., & Goldsmid, J.M. 2000. Earthworms as paratenic hosts of toxoplasmosis in eastern barred bandicoots in Tasmania. *Journal of Wildlife Diseases* 36, 145–148.

De Thoisy, B., Demar, M., Aznar, C., & Carme, B. 2003. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. *Journal of Wildlife Diseases* 39, 456-459.

Doby, J.M., Desmonts, G., Beaucournu, J.C., & Akinchnia, G.T. 1974. Systematic immunologic study of toxoplasmosis in small wild mammals of France. *Folia Parasitologica* 21, 289-300.

Dubey, J.P., & Desmonts, G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal* 19, 337-339.

Dubey, J.P., & Beattie, C.P. 1988. Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton, Florida. 220p.

Fitzgerald, B.M., & Turner, D.C. 2000. Hunting behaviour of domestic cats and their impact on prey populations. *In*: D.C. Turner and P. Bateson (Eds.), The Domestic Cat, the Biology of its Behaviour, Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 151–175.

Hejlíček K., Literák I., & Nezval J. 1997. Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases* 33, 480-485.

Kapperud, G. 1978. Survey for toxoplasmosis in wild and domestic animals from Norway and Sweden. *Journal of Wildlife Diseases* 14, 157-162.

Kia, E.B., Delattre, P., Giraudoux, P., Quéré, J.P., Fichet-Calvet, E., & Ashford, R.W. 2004. Natural infection of the water vole *Arvicola terrestris* with *Toxoplasma gondii*, on the Jura plateau, eastern France. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 98, 655-657.

Ruiz, A., & Fenkel, J.K. 1980. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29, 1161-1166.

Spitz, F., Le Louarn, H., Poulet, A., & Dassonville, B. 1974. Standardisation des piégeages en ligne pour quelques espèces de rongeurs. *Revue d'Evologie (Terre et Vie)* 28, 564–578.

3.3. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey are equal.

Eve AFONSO, Philippe THULLIEZ, Dominique PONTIER, et Emmanuelle GILOT-FROMONT

Parasitology, 134 (4), 1963-1971 (2007).

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is largely transmitted to definitive felid hosts through predation. Not all prey species represent identical risks of infection for cats because of differences in prey susceptibility, exposure and/or lifespan. Previously published studies have shown that prevalence in rodent and lagomorph species is positively correlated with body mass. We tested the hypothesis that different prey species have different infection risks by comparing infection dynamics of feral cats at four sites in the sub-Antarctic Kerguelen archipelago which differed in prey availability. Cats were trapped from 1994 to 2004 and anti-*T.gondii* IgG antibodies were detected using the modified agglutination test (≥1:40). Overall seroprevalence was 51.09%. Antibody prevalence differed between sites, depending on diet and also sex, after taking into account the effect of age. Males were more often infected than females and the difference between the sexes tended to be more pronounced in the site where more prey species were available. A difference in predation efficiency between male and female cats may explain this result. Overall, our results suggest that the composition of prey items in cat diet influences the risk of *T. gondii* infection. Prey compositon should therefore be considered important in any understanding of infection dynamics of *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, epidemiology, feral cat, diet, sub-Antarctic environment.

3.3.1. Introduction:

Toxoplasma gondii is a worldwide protozoan parasite that infects humans and a large variety of animal species. Felids, particularly domestic cats (*Felis catus*), are the only hosts that excrete the oocysts that infect intermediate hosts (Dubey and Beattie, 1988). The life cycle of the parasite includes intermediate hosts such as small mammals and birds, which complete the life cycle when they are eaten by cats. Beside predation, cats can be contaminated by vertical transmission or by ingesting oocysts. Vertical transmission, however, appears to be rare in laboratory and natural conditions (Dubey and Hoover, 1977; Afonso, Thulliez, and Gilot-Fromont, 2006) and oocysts are less infectious than tissue cysts in cats (Dubey, 2006). Predation is therefore the major cause of infection in cat populations and differences in prevalence between domestic and stray cats are closely correlated with levels of hunting in the diet (Tenter, Heckeroth and Weiss, 2000).

In cats that have access to prey the levels of infection should depend on the levels of infection in prey. Cats are opportunistic predators that can rapidly adapt their diet to prey availability (Turner and Bateson, 2000). The variability of prevalence in cats should thus also depend on the variability of infection in prey. Not all prey species have identical susceptibility (Gustafsson, Uggla and Jarplid, 1997; Sedlak et al., 2001). Prey also vary in exposure, because of the level of oocyst contamination in their habitat or differences in home-range size or energy requirements. Finally, infection accumulates with age, so that old individuals are more often infected than younger ones. Because life expectancy, home-range size and energy requirements are related to body size (Degen et al., 1998; Speakman, 2005; Ottaviani et al., 2006), body size may represent a good indicator of species risk.

The aim of this study was to provide information on *T. gondii* infection risk in feral cats according to their diet. We tested the prediction that cats exploiting different prey species would have different levels of *T. gondii* seroprevalence using data from a cat population living on the Kerguelen archipelago, one of the rare populations where cats survive exclusively through predation. We expected to find that seroprevalence in cats would vary between sites, according to availability of prey species.

3.3.2. Materials and methods:

Body mass and prevalence in rodents and lagomorphs

We searched for reported *T. gondii* prevalence in rodent and lagomorph species, including studies with sample sizes of at least 30 individuals captured in non-anthropized environments. We used a linear model to describe the relationship between body mass and antibody prevalence and, to ensure linearity, we used the natural logarithm of body mass and the arcsine square root of prevalence values (Sokal and Rohlf, 1981). Because species are not independent but linked by phylogenetic history, we used the method of phylogenetically independent contrasts to correlate the two variables, taking into account non-independence of data (Felsenstein, 1985). We constructed a phylogenetic tree with data from Conroy and Cook (2000), Huchon and Douzery (2001), Michaux et al. (2002), Durish et al. (2004), Steppan, Adkins, and Anderson (2004), and Robinson and Matthee (2005), with all branch lengths set to 1. We first calculated the Pearson's correlation coefficient without contrasts then calculated the Pearson's correlation on contrasts with the ape package of the R 2.0.1 software (R Development Core Team, 2005).

Study area and population

The Kerguelen archipelago (49°20' S, 70°20'E) in the Southern Indian Ocean consists of one main large island partly covered by an icecap and about 300 small islands over a total surface area of 7,200 km². The climate is characterized by high precipitation (mean 783 mm per year), low temperatures (mean annual temperature 4.8 - 11.9°C, Météo France, Port aux Français) and windy conditions. Cats live at very low densities (1-3 cats/km²; Say, Gaillard and Pontier, 2002) and are mainly solitary (Say et al, 2002).

Samples were collected from feral cats at four sites on the main island: (1) the French naval station, Port aux Français (PAF), (2) the farming settlement of Port Couvreux (PC), (3) the Norwegian whaling station of Port Jeanne d'Arc (PJDA), and (4) Cape Ratmanoff (RAT) on the Courbet Peninsula. Pairwise distances between sites range from 20 to 140 km and the

four groups of cats appear to be genetically different and spatially independent (Pontier et al., 2005).

Rabbits (*Oryctolagus cuniculus)* are the most common prey consumed by cats at PAF, PC, and PJDA (about 90%), whereas in RAT, rabbits, mice (*Mus musculus*) and birds (*Pterodroma lessonii*, *Pachyptila desolata*, and *Procellaria aequinoctialis*) are all consumed (about 30% each; Pontier et al, 2002).

Cats were trapped between October 1994 and November 2004, using baited-traps. Captured cats were anaesthetized, weighed and sexed, and blood samples collected by jugular puncture. Cats were permanently marked at first capture with subcutaneous transponders. Age was estimated based on general appearance, body size, tooth development and marks from previous captures. Cats aged less than one year were aged by months, while age of adults was estimated in years (Pascal and Castanet, 1978). Blood samples were centrifuged and stored at -20°C, sera were diluted twofold starting at 1:20 and tested for anti-*T.gondii* IgG antibodies using the modified agglutination test (Dubey and Desmonts, 1987).

Prevalence

We took 404 blood samples from 276 cats, with 74 cats captured several times (up to 4 captures per individual) and randomly selected one sample for each of the 276 individual cats. We then estimated seroprevalence as the proportion of cats having an antibody titer ≥ 1:40 (Afonso, Thulliez, and Gilot-Fromont, 2006).

Variables associated with antibody prevalence

We used logistic regression to relate the logit of the probability of being seropositive to predictor variables of site, year, cat sex and cat age. Comparisons were performed using the Akaike Information Criterion (AIC) since the model with the lowest AIC represents the best compromise between residual deviance and number of parameters (Burnham and Anderson 1992). After taking into account the effect of age as a continuous variable, we then tested the

effect of each variable (site, year and sex) with two-way interactions. We first included all variables and interactions that tended to influence antibody prevalence (using a Likelihood Ratio Test (LRT), $P < 0.2$) and then simplified the model using a backward approach. We retained the model with the lowest AIC and when AIC values of two models differed by less than 2, we selected the most parsimonious model. Coefficients in the final model were estimated by calculating adjusted odds-ratios and 95% confidence intervals to measure the strength of association between each variable and serological status. Overall fit of the final logistic equation was assessed using the Hosmer-Le Cessie test (Hosmer et al, 1997). All statistical procedures were performed using the R 2.0.1 software.

Estimation of the probability of infection

Assuming that incidence did not vary with time, we used age-specific prevalences to estimate the probability of a cat consuming an infected prey during one month (p). We considered that at age A (in months), the probability of being seronegative was the cross-product of the probabilities of encountering no infected prey (1-p) for A months. The probability of having antibodies at age A was thus $P(A) = 1- (1-p)^A$. Using this relationship, we estimated p using maximum likelihood. For each age class, the age A was the median age of captured cats. Because prevalence differed between sites (see results), we performed separate estimates for RAT and other sites.

3.3.3. Results:

Body mass and seroprevalence of *T. gondii* in rodents and lagomorphs

A positive linear relationship was detected between body mass and *T. gondii* seroprevalence (Table I, Figure 1) with the largest species having the highest prevalences ($R^2 = 0.25$, $P < 0.001$). After taking into account the phylogenetic relationships among species, prevalence was still positively related to body mass ($R^2 = 0.18$, $P = 0.010$).

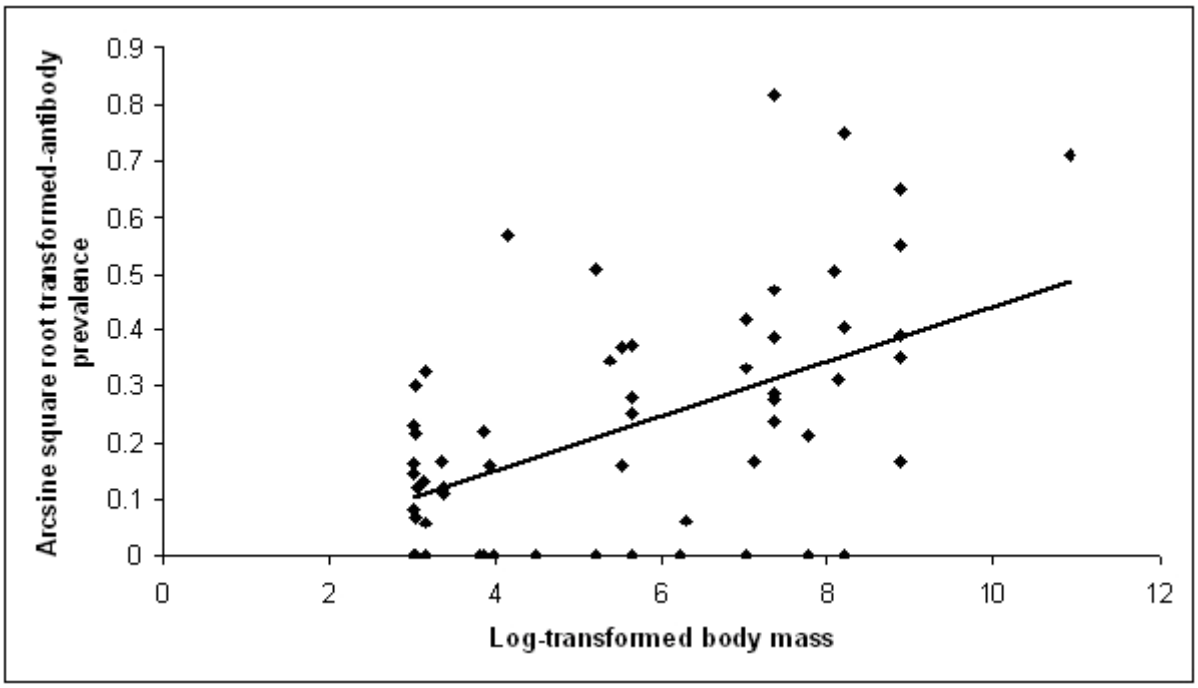


Figure 1. Linear relationship between antibody prevalence for *T. gondii* (arcsine square root-transformed) and body mass (log-transformed) in rodents and lagomorphs (data from Table I). Each point represents the mean of at least 30 individuals captured in non-anthropized environments.

Table I. Mean prevalence of *T. gondii* antibodies and body mass of various rodents and lagomorphs. Threshold of the serologic tests is indicated in parentheses when specified by the authors.

Order	Species	Country	Body mass[a] (g)	Seroprevalence (%)	N	Method[b]	Reference
Rodentia	*Apodemus agrarius*	Korea	21.5	1.49	1008	ELISA	Jeon and Yong, 2000
	Apodemus flavicollis	France	29.4	1.47	68	SFDT (/10)	Doby et al., 1974
	Apodemus sylvaticus	France	29.4	0.36	836	SFDT (/10)	Doby et al., 1974
		Scotland	23.4	10.20	98	SFDT (1/10)	Jackson, Hutchison and Siim, 1986
		Sweden	23.4	0	136	SFDT (1/8)	Kapperud, 1978
	Myodes [Clethrionomys glareolus]	France (Ardennes)	20.8	4.69	64	MAT (1/25)	Afonso et al., unpublished data
		France	20.8	0	243	SFDT (1/10)	Doby et al., 1974
		Scotland	20.8	8.82	68	SFDT (1/10)	Jackson, Hutchison and Siim, 1986
		Sweden	20.8	0.49	408	SFDT (1/8)	Kapperud, 1978
	Cricetus cricetus	France	506.67	0	42	SFDT (1/10)	Doby et al., 1974
	Dasyprocta agouti	Guiana (Petit Saut)	3265	23.26	43	DAT (1/40)	Carme et al., 2002
	Eutamias amoenus	USA (California)	48.25	0	34	HAI (1/64)	Franti et al., 1976
	Eutamias quadrimaculatus	USA (California)	88.45	0	44	HAI (1/64)	Franti et al., 1976
	Hydrochaeris hydrochaeris	Brazil	55000	42.28	149	MAT (1/25)	Canon-Franco et al., 2003
	Lemmus lemmus	Sweden	51.7	2.50	40	SFDT (1/8)	Kapperud, 1978
	Marmotta monax	USA (Pennsylvania)	3413	9.36	545	MAT (1/25)	Stewart, Humphreys and Dubey, 1995
	Microtus agrestis	France	46	0	44	SFDT (1/10)	Doby et al., 1974
		Sweden	46	0	46	SFDT (1/8)	Kapperud, 1978
	Microtus fortis	China	63	29.03	124	MAT (1/20)	Zhang et al., 2004
	Microtus nivalis	France	54	0	52	SFDT (1/10)	Doby et al., 1974
	Mus musculus	France	20.5	0.68	295	SFDT (1/10)	Doby et al., 1974
		USA (Illinois)	20.5	2.09	1243	MAT (1/25)	Dubey et al., 1995
		Sweden	20.5	0	70	SFDT (1/8)	Kapperud, 1978
	Myocastor coypus	France	7150	14.58	48	MAT (1/25)	AFFSA, 2005
		France	7150	11.97	117	MAT (1/25)	AFFSA, 2005
		Bulgaria	7150	2.70	37	Microagglutination	Arnaudov, Arnaudov and Kivin, 2003
		Italy	7150	36.58	41	DAT (1/8)	Bollo et al., 2003
		England	7150	27.27	110	SFDT (1/256)	Holmes et al., 1977
	Ondatra zibethicus	France	1135.8	10.71	56	MAT (1/25)	AFFSA, 2005
		USA (California)	1135.8	0	38	HAI (1/64)	Franti et al., 1976
		USA (Missouri)	1135.8	16.67	42	SFDT (1/8)	Smith and Frenkel, 1995
	Oryzomys palustris	USA (Florida)	47.67	4.84	62	IHAT (1/64)	Burridge et al., 1979
	Peromyscus boylii	USA (California)	28.7	2.70	37	HAI (1/64)	Franti et al., 1976
	Peromyscus gossypinus	USA (Florida)	29	1.20	83	IHAT (1/64)	Burridge et al., 1979
	Peromyscus leucopus	USA (Kansas)	23	1.74	115	MAT (1/25)	Brillhart et al., 1994

	Peromyscus maniculatus	USA (Kansas)	20.5	5.36	56	MAT (1/25)	Brillhart et al., 1994
		USA (California)	20.5	2.60	269	HAI (1/64)	Franti et al., 1976
	Rattus norvegicus	USA (Illinois)	280	6.31	95	MAT (1/25)	Dubey et al., 1995
		Egypt	280	13.33	60	HAI (1/64)	El Nahal et al., 1982
		Scotland	280	7.69	65	SFDT (1/10)	Jackson, Hutchison and Siim, 1986
		India	280	0	186	HAI (1/64)	Mir et al., 1982
	Rattus rattus	USA (Florida)	246.5	13.16	38	IHAT (1/64)	Burridge et al., 1979
		France	246.5	2.50	40	SFDT (1/10)	Doby et al., 1974
	Sciurus carolinensis	USA (Florida)	540.33	0.38	265	IHAT (1/64)	Burridge et al., 1979
	Sigmodon hispidus	USA (Kansas)	185	0	62	MAT (1/25)	Brillhart et al., 1994
		USA (Florida)	185	23.68	38	IHAT (1/64)	Burridge et al., 1979
	Spermophilus xanthophrymnus	Turkey	217	11.43	105	SFDT (1/16)	Karatepe et al., 2004
Lagomorpha	*Lepus californicus*	USA (California)	2317	0	30	HAI (1/64)	Franti et al., 1976
	Lepus capensis	France	2358	4.48	67	SFDT (1/10)	Doby et al., 1974
	Lepus europaeus	Bulgaria	3673.3	15.52	58	Microagglutination	Arnaudov, Arnaudov and Kivin, 2003
		Australia	3673.3	0	45	IFAT (1/10)	Cox, Edmonds and Shepherd, 1981
		Germany	3673.3	46.23	318	SFDT (1/16)	Frölich et al., 2003
		Sweden	3673.3	0	176	ELISA	Gustafsson and Uggla, 1994
	Oryctolagus cuniculus	Spain	1558.25	14.25	456	MAT (1/25)	Almeria et al., 2004
		France	1558.25	5.58	197	IFAT (1/8)	Chalupsky et al., 1990
		Australia	1558.25	7.54	1697	IFAT (1/10)	Cox, Edmonds and Shepherd, 1981
		Czech Republic	1558.25	53.01	366	SFDT (1/4)	Hejlicek and Literak, 1994
		Sweden	1558.25	20.59	34	SFDT (1/8)	Kapperud, 1978
		Chili (Juan Fernandez archipelago)	1558.25	8.00	50	IHAT (1/16)	Stutzin, Contreras and Schenone, 1989
	Sylvilagus palustris	USA (Florida)	1233	2.70	37	IHAT (1/64)	Burridge et al., 1979

[a] data from Ernest, 2003.
[b] CIA, carbon immunoassay; DAT, direct agglutination test; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFAT, indirect immunofluorescent antibody test; IHAT, indirect haemagglutination test; MAT, modified agglutination test; HAI, microtiter indirect agglutination test; SFDT, Sabin-Feldman dye test.

Prevalence

Of the 276 trapped cats, 103 were females and 173 were males. Approximately 36% (98/276) of cats were less than one year of age, and the median age was 1 year. 151 cats were trapped at PAF, 23 at PC, 44 at PJDA and 58 at RAT.

Of the 276 cats tested, 141 had antibody titers of at least 40. Overall prevalence was thus 51.09% (95% CI: 45.22 – 56.93). Seroprevalence was 54.30% (95% CI: 46.35 – 62.04) at PAF, 60.87% (95% CI: 40.79 – 77.84) at PC, 54.55% (95% CI: 40.07 – 68.29) at PJDA, and 36.21% (95%IC: 25.05 – 49.07) at RAT.

Cats at the sites with the same diet (essentially rabbits at PAF, PC and PJDA) had similar *T. gondii* prevalences (Chi-2 test, $P = 0.838$), while RAT cats had a significantly lower prevalence. We thus grouped sites according to cat diet and analyzed RAT separately from OTHER sites (PAF, PC and PJDA combined).

Variables associated with antibody prevalence

T. gondii seropositivity was related linearly to age (LRT, $P < 0.001$). Cats had a 2.43 times increased risk of acquiring toxoplasmosis for each year of life (95% CI: 1.77 – 3.33). In accordance with the hypothesis that vertical transmission is rare, none of the 11 individuals aged less than 3 months was positive (Table II), while all cats of at least 4 years of age carried antibodies (Figure 2).

Table II. Number cats captured at less than one year of age and seropositivity for *T.gondii* in Kerguelen sites. Numbers in parentheses indicate sample sizes.

	OTHER SITES	RATMANOFF
<3 months	0 (10)	0 (1)
[3-5] months	7 (30)	0 (2)
[6-11] months	20 (44)	2 (11)

After taking into account the effect of age, cats from RAT were less often seropositive than at OTHER sites (LRT, P = 0.002; odds-ratio of OTHER sites compared to RAT: 11.11, 95% CI: 2.13 – 50; Table III). Males were more often infected than females (LRT, P = 0.031), and this difference was more pronounced in RAT, where males had a 5.00 times greater chance of having antibodies (95% CI: 0.88 – 28.3) than females. The interaction between site and sex was included in the model with the lowest AIC (332.76 versus 337.23 without the interaction), although the LRT was only close to significance (LRT, P = 0.051). The variable year was not retained in the final model (LRT, P = 0.284). The Hosmer-LeCessie goodness-of-fit test showed a good fit of the final selected model (P = 0.935).

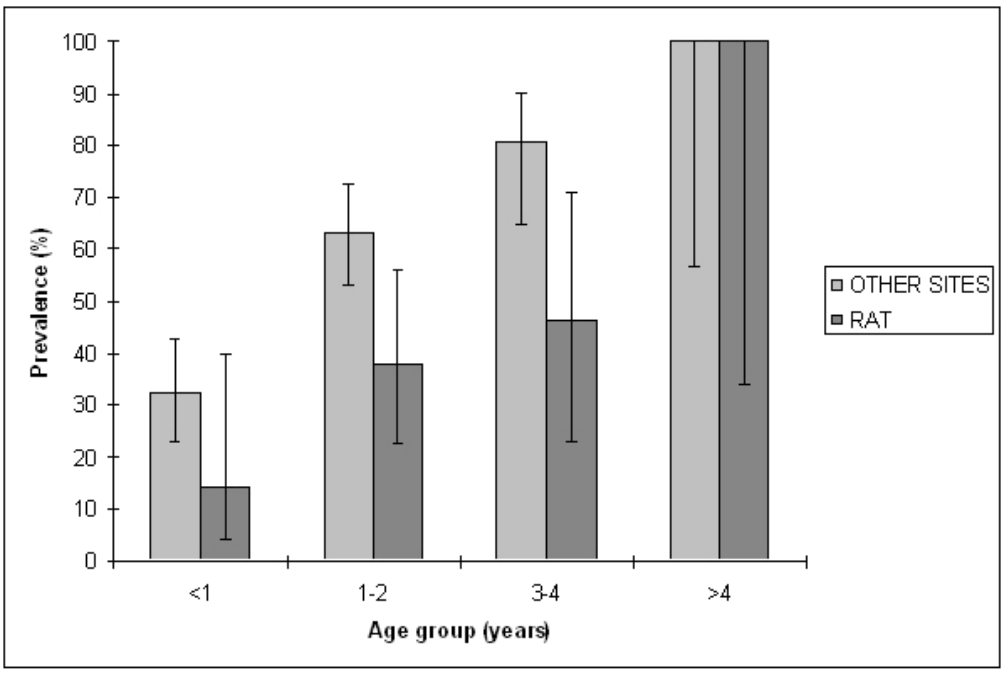


Figure 2. Observed seroprevalence of *T. gondii* in Kerguelen cats for four age classes. RAT = Ratmanoff.

Table III. Variables associated with seropositivity for *T.gondii* in Kerguelen cats. RAT = Ratmanoff.

Variable	Group	Adjusted odds-ratio	95% CI	*P*-value (Likelihood Ratio Test)
Age	-	2.43	[1.77; 3.33]	**<0.001**
Site	RAT	0.09	[0.02; 0.47]	**0.002**
Sex	Males	1.44	[0.79; 2.61]	**0.031**
Site: Sex	RAT: Males	5.00	[0.88; 28.3]	**0.051**

Estimation of the infection probability

Using maximum likelihood, the probability of infection for one month (*p*) was estimated to be 0.023 (95% CI: 0.011 – 0.035) at RAT and 0.054 (0.044 – 0.064) in OTHER sites. These estimates provided accurate predictions of the age-prevalence relationship in both sites (Figure 3).

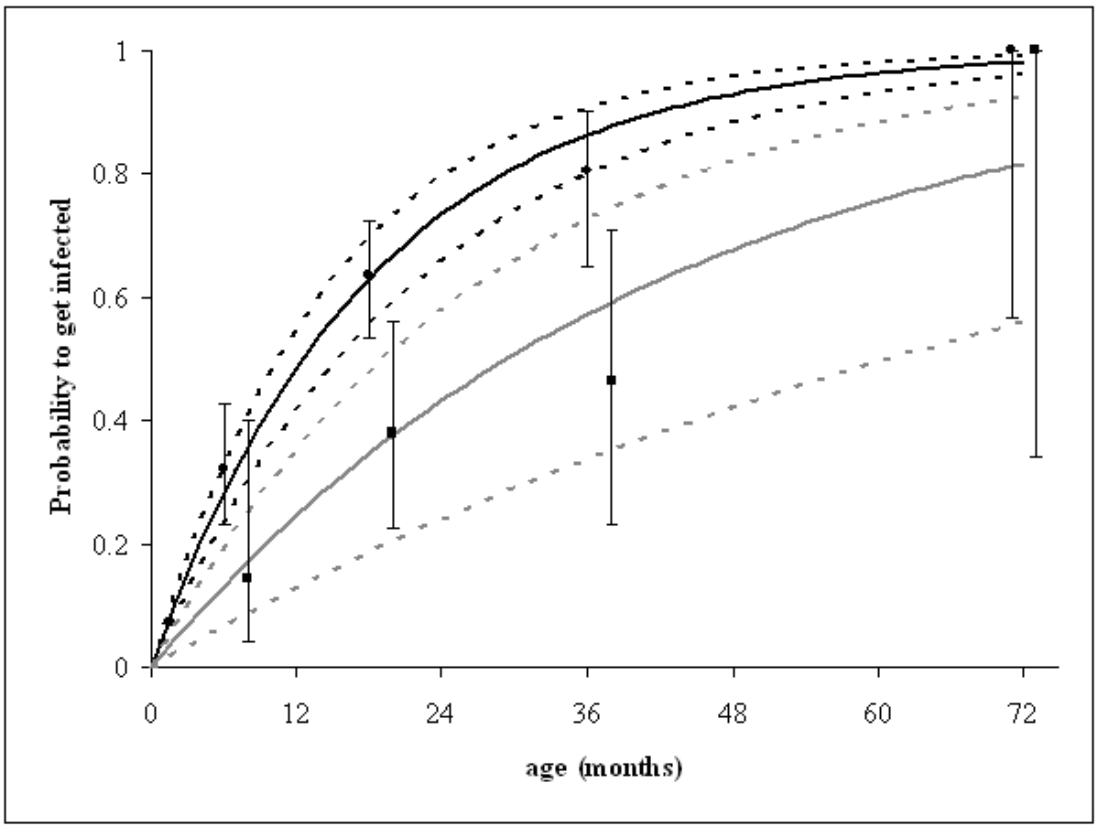


Figure 3. Predicted relationship between age and seroprevalence at RATMANOFF (grey line) and OTHER sites (black line). Solid lines represent the mean prediction and broken lines represent the 95% confidence interval limits. Points represent the observed prevalence values for each age class, with confidence intervals drawn as whiskers: square points for RATMANOFF values and circular points for OTHER values. Prevalences are indicated for the median age observed at capture and are slightly displaced for better visualisation.

3.3.4. Discussion

We found that *T. gondii* seroprevalence in rodents and lagomorphs was correlated to body mass, with large species being more often positive than small ones. Because we compared seroprevalences estimated with various serological methods at various thresholds the variance in the relationship could be partially explained by differences in sensitivity, specificity and predictive values between tests.

Since prevalence of infection accumulates with age, large species that have longer life expectancies are likely to be more at risk than small ones. Several non-exhaustive factors could also modulate seroprevalence: susceptibility, home-range size and energy requirements. Susceptibility of hosts is variable and several species have been reported to be particularly susceptible to the parasite (*Lepus timidus*, Gustafsson, Uggla, and Jarplid, 1997; *Sigmodon hispidus*, Chinchilla et al., 1996). Also, small rodents could be very susceptible and might die soon after ingestion of the parasite leading to biases in the estimation of seroprevalence. Large species have high energy requirements and extended home ranges come in contact with large surface areas of contaminated resources (such as vegetation and soil). As a consequence of the direct relationship between body mass and seroprevalence in prey species, knowledge of the availability of different-sized prey should allow prediction of the infection risk of cats in specific habitats.

In Kerguelen feral cats, we observed a high seroprevalence (51.09%) compared to a dense urban cat population where predation is uncommon (18.6%, Afonso, Thulliez, and Gilot-Fromont, 2006). In accordance with our hypothesis, the levels of infection were higher in sites where rabbits were the most commonly consumed prey item compared to sites where the diet included mice and birds as well as rabbits. Although genetic variability of the cat population is low, genetic differences can be detected among the four sites (Pontier et al., 2005), thus it is not possible to exclude the possibility that cats from RAT are less susceptible than cats from OTHER sites. Cats from RAT also consume birds, but the low seroprevalence at RAT gave no indication that birds represent a major source of toxoplasmosis. More information on seroprevalence in different species of birds would help to define the role of birds as intermediate hosts of *T. gondii*. Studying prey species on Kerguelen, however, would raise practical difficulties. Although Kerguelen cats are exclusively predators, their risk of infection is relatively low (0.023 to 0.054 per month) and so seroprevalence in prey species is likely to be very low. The sampling effort required to determine prey seroprevalence on

Kerguelen would thus be extremely extensive. A study of other populations of predatory cats could help to confirm our hypothesis.

As expected, antibody prevalence was related to age, due to the accumulation of infection with age. Males were more often infected than females. Because adult males are larger and heavier than females, they are expected to consume more prey items (Niewold, 1986; Turner and Bateson, 2000) and to be more often exposed to infection. The difference between sexes was more pronounced in RAT, where several prey species were available. Diet may differ between males and females and it has been shown elsewhere that males tend to feed on lagomorphs, carcasses of large mammals and birds, whereas females prey mainly on small mammals (Niewold, 1986 in the Netherlands; Jones and Coman, 1981 in Australia). Liberg (1982) found that free-roaming males were more efficient at hunting voles (*Microtus* and *Arvicola*) and rabbits than females. Males may be more exposed to toxoplasmosis than females on Kerguelen, due to difference in their diets.

Toxoplasma gondii prevalence in cat populations is generally related to prey availability yet studies on cats rarely take into account the ecology of prey species. Our literature review suggested that different prey species represent unequal infection risks for predators. In addition, our study showed that different diets of Kerguelen cats led to different levels of infection. Because prey availability differs according to the environment, it is thus necessary to examine both predator habitat and diet in order to fully understand the spatial variability of *T. gondii* infection.

Acknowledgements

The authors thank all those who participated in the field and laboratory investigations, L. Say and S. Devillard for help with statistical analyses and useful comments on an earlier version of the manuscript and D. Aubert for providing references. The authors also sincerely thank W. King and an anonymous referee for improving the English, and helpful comments. This work was supported by the French Institut Paul-Emile Victor (IPEV, program 279), the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET), the Grünenthal France Laboratory, the Région Champagne-Ardenne and the Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise.

REFERENCES :

AFSSA 2005. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. AFSSA Ed., Maisons-Alfort, 316p.

Afonso, E., Thulliez, P., & Gilot-Fromont, E. 2006. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *International Journal for Parasitology* 36, 1373-1382.

Almeria, S., Calvete, C., Pagés, A., Gauss, C.B.L. & Dubey, J.P. 2004. Factors affecting the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Spain. *Veterinary Parasitology* 123, 265-270.

Arnaudov, D., Arnaudov, A., & Kirin, D. 2003. Study on the toxoplasmosis among wild animals. *Experimental Pathology and Parasitology* 6/11, 51-54.

Bollo, E., Pregel, P., Gennero, S., Pizzoni, E., Rosati, S., Nebbia, P., & Biolatti, B. 2003. Health status of a population of nutria (*Myocastor coypus*) living in a protected area in Italy. *Research in Veterinary Science* 75, 21-25.

Brillhart, D.B., Fox, L.B., Dubey, J.P., & Upton, S.J. 1994. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild mammals in Kansas. *Journal of Helminthological Society of Washington* 61, 117-121.

Burnham, K.P., & Anderson, D.R. 1992. Data-based selection of an appropriate model: the key to modern data analysis. *In*: D.R. McCullough and Barrett R.H. (2001) Wildlife Populations. Elsevier Applied Science, London, pp. 16-30.

Burridge, M.J., Bigler, W.J., Forrester, D.J., & Hennemann, J.M. 1979. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in wild animals in Florida. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 175, 964-947.

Cañon-Franco, W.A., Yai, L.E.O., Joppert, A.M., Souza, C.E., D'Auria, S.R.N., Dubey, J.P., & Gennari, S.M. 2003. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the rodent Capybara (*Hidrochoeris hidrochoeris*) from Brazil. *The Journal of Parasitology* 89, 850.

Carme, B., Aznar, C., Motard, A., Demar, M., & de Thoisy, B. 2002. Serologic survey of *Toxoplasma gondii* in noncarnivorous free-ranging neotropical mammals in French Guyana. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2, 11-17.

Chalupsky, J., Vavra, J., Gaudin, J.C., Vandewalle P., Arthur C.P., Guenezan M., & Launey, H. 1990. Mise en évidence sérologique de la présence d'encephalitozoonose et de toxoplasmose chez le lapin de Garenne (*Oryctolagus cuniculus*) en France. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 8, 91-95.

Chinchilla M., Guerrero O.M., Reyes L., & Abrahams E. 1996. Susceptibility of *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae) to *Toxoplasma gondii* (Eucoccidia: Sarcocystidae). *Revista de Biologia Tropical* 44, 265-268. In Spanish.

Conroy, C.J., & Cook, J.A. 2000. Molecular systematics of holarctic rodent (*Microtus*: Muridae). *Journal of Mammalogy* 81, 344-359.

Cox, J. C., Edmonds, J.W., & Shepherd, R.C. 1981. Toxoplasmosis and the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in Victoria, Australia with suggested mechanisms for dissemination of oocysts. *Journal of Hygiene (London)* 87, 331-337.

Degen, A.A., Kam, M., Khokhlova, I.S., Krasnov, B.R., & Barraclough, T.G. 1998. Average daily metabolic rate of rodents: habitat and dietary comparisons. *Functional Ecology* 12, 63-73.

Doby, J.M., Desmonts, G., Beaucournu, J.C., & Akinchina, G.T. 1974. Systematic immunologic study of toxoplasmosis in small wild mammals of France. *Folia Parasitologica* (Praha) 21, 289-300.

Dubey, J.P., & Beattie, C.P. 1988. Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton.

Dubey, J.P. & Desmonts, G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal* 19, 337-339.

Dubey, J.P., & Hoover, E.A. 1977. Attempted transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kittens. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 170, 538-540.

Dubey, J.P., Weigel, R. M., Siegel, A.M., Thuilliez, P., Kitron, U.D., Mitchell, M.A., Mannelli, A., Mateus-Pinilla, N.E., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., & Todd, K.S. 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *The Journal of Parasitology* 81, 723-729.

Dubey, J.P. 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Veterinary Parasitology* 140, 69-75.

Durish, N.D., Halcomb, K.E., Kilpatrick, C.W., & Bradley, R.D. 2004. Molecular systematics of the *Peromyscus truei* species group. *Journal of Mammalogy* 85, 1160-1169.

El Nahal, H.S., Morsy, T.A., Bassili, W.R., El Missiry, A.G., & Saleh, M.S. 1982. Antibodies against three parasites of medical importance in *Rattus sp.* collected in Giza Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 12, 287-93.

Ernest, S.K.M. 2003. Life history characteristics of placental non-volant mammals. *Ecology* 84, 3402.

Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative methods. *The American Naturalist* 125, 1-15.

Franti, C.E., Riemann, H.P., Behymer, D.E., Suther, D., Howarth, J.A., & Ruppanner, R. 1976. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild and domestic animals in northern California. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 169, 901-906.

Frölich, K., Wisser, J., Schmuser, H., Fehlberg, U., Neubauer, H., Grunow, R., Nikolaou, K., Priemer, J., Thiede, S., Streich, W., & Speck, S. 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.

Gustafsson, K. & Uggla, A. 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, Uggla A, & Jarplid B. 1997. *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). I. Pathology. *Journal of Comparative Pathology* 117, 351-60.

Hejlicek, K., & Literak, I. 1994. Prevalence of toxoplasmosis in rabbits in South Bohemia. *Acta Veterinaria* 63, 145-150.

Holmes, R.G., Illman, O., & Beverley, J.K. 1977. Toxoplasmosis in coypu. *The Veterinary Record* 101, 74-5.

Hosmer, D.W., Hosmer, T., Le Cessie, S., & Lemeshow, S. 1997. A comparison of goodness of fit tests for the logistic regression model. *Statistics in Medicine* 16, 965-980.

Huchon, D., & Douzery, E.J.P. 2001. From the old to the new world: a molecular chronicle of the phylogeny and biogeography of hystricognath rodents. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20, 238-251.

Jackson, M.H., Hutchison, W.M., & Siim, J.C. 1986. Toxoplasmosis in a wild rodent population of central Scotland and a possible explanation of the mode of transmission. *Journal of Zoology, London, series A* 209, 549-557.

Jeon, S.-H., & Yong, T.S. 2000. Serological observation of *Toxoplasma gondii* prevalence in *Apodemus agrarius*, a dominant species in field rodents in Korea. *Yonsei Medical Journal* 41, 491-496.

Jones, E., & Coman, B.J. 1981. Ecology of the feral cat *Felis catus* (L.), in southern Australia. 1. Diet. *Australian Wildlife Research* 8, 249-262.

Kapperud, G. 1978. Survey for toxoplasmosis in wild and domestic animals from Norway and Sweden. *Journal of Wildlife Diseases* 14, 157-162.

Karatepe, M., Babür, C., Karatepe, B., Kiliç, S., & Cakir, M. 2004. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in anatolian ground squirrels, *Spermophilus xanthophrymnus* (Rodentia : Sciuridae) from Nigde, Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire* 155, 530-532.

Liberg, O. 1982. Hunting efficiency and prey impact by a free-roaming house cat population. *Transactions of the International Congress of Game Biology* 14, 269-275.

Michaux, J.R., Chevet, P., Filippucci, M.-G., & Macholan, M. 2002. Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP

gene and two mitochondrial markers: cytocrhome b and 12S rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23, 123-136.

Mir, N.A., Chhabra, M.B., Bhardwaj, R.M., & Gautam, O.P. 1982. *Toxoplasma* infection and some other protozoan parasites of the wild rat in India. *The Indian Veterinary Journal* 59, 60-63.

Niewold, F.J.J. 1986. Voedselkeuze, terreingebruik en aantalsregulatie van in het veld operende Huiskatten *Felis catus L.*, 1758. *Lutra* 29, 145-187. *In*: Turner, D.C. and Bateson, P.B. (2000). The Domestic Cat. The Biology of its Behaviour. Cambridge University Press.

Ottaviani, D., Cairns, S.C., Oliverio, M., & Boitani, L. 2006. Body mass as a predictive variable of home-range size among Italian mammals and birds. *Journal of Zoology* 269, 317-330.

Pascal, M., & Castanet, J. 1978. Méthode de détermination de l'âge chez le chat haret des îles Kerguelen. *La Terre et la Vie* 4, 529-555.

Pontier, D., Say, L., Debias, F., Bried, J., & Thioulouse, J. 2002. The diet of feral cats (*Felis catus L.*) at five sites on the Grande Terre, Kerguelen archipelago. *Polar Biology* 25, 833-837.

Pontier, D., Say, L., Devillard, S., & Bonhomme, F. 2005. Genetic structure of the feral cat (*Felis catus L.*) introduced 50 years ago to a sub-Antarctic island. *Polar Biology* 28, 268-275.

R Development Core Team (2005). R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org.

Robinson, T.J., & Matthee, C.A. 2005. Phylogeny and evolutionary origins of the Leporidae: a review of cytogenetics, molecular analyses and supermatrix analysis. *Mammals Review* 35, 231-247.

Sedlak, K., Literak, I., Pavlasek, I., & Benak, J. 2001. Susceptibility of common voles to experimental toxoplasmosis. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 640-642.

Say, L., Gaillard, J.M., & Pontier, D. 2002. Spatio-temporal variation in cat population density in a sub-Antarctic environment. *Polar Biology* 25, 90-95.

Say, L., Devillard, S., Natoli, E., & Pontier, D. 2002. The mating system of feral cats (*Felis catus L.*) in a sub-Antarctic environment. *Polar Biology* 25, 838-842.

Smith, D.D. & Frenkel, J.K. 1995. Prevalence of antibodies to *Toxoplama gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. *Journal of Wildlife Diseases* 31, 15-21.

Sokal, R.R., & Rohlf, F.S. 1981. Biometry. New York: W.H. Freeman.

Speakman, J.R. 2005. Body size, energy metabolism and lifespan. *The Journal of Experimental Biology* 208, 1717-1730.

Steppan, S.J., Adkins, R.M., & Anderson, J. 2004. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Systematic Biology* 53, 533-553.

Stewart, R.L., Humphreys, J.G., & Dubey, J.P. 1995. *Toxoplasma gondii* antibodies in woodchucks (*Marmota monax*) from Pennsylvania. *The Journal of Parasitology* 81, 126-127.

Stutzin, M., Contreras, M.C., & Schenone, H. 1989. Epidemiology of toxoplasmosis in Chile. V. Prevalence of the infection in humans and domestic and wild animals, studied by indirect hemagglutination reaction, in the Juan Fernandez Archipelago. V Region. *Boletín Chileno de Parasitología* 44, 37-40. In Spanish.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., & Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal For Parasitology* 30, 1217-1258.

Turner, D.C., & Bateson, P.B. 2000. The Domestic Cat. The Biology of its Behaviour. Cambridge University Press.

Zhang, S.Y., Jiang, S.F., He, Y.Y., Pan, C.E., Zhu, M., & Wei, M.X. 2004. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in field mice, *Microtus fortis*, from Yuanjiang, Hunan Province, People's Republic of China. *The Journal of Parasitology* 90, 437-438.

3.4. Factors influencing the seroconversion to anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in rural cats (*Felis catus*) in France

Eve AFONSO, Philippe THULLIEZ, and Emmanuelle GILOT-FROMONT.

En cours de préparation.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a worldwide spread protozoan parasite that infects humans and animal species. In rural areas, cats can be contaminated by ingesting oocysts, contaminated birds or small mammals, or by vertical transmission. The variability of the risk of seroconversion in rural cats is thus expected to be high. In this study, we followed-up three cat populations on rural France. Cats were captured, marked and recaptured during 7 to 14 years, depending on the population. We estimated that the average seroprevalence was of 52.73% during the study period. For an average year, we expected that 31 to 72 cats, depending on the population, have seroconverted per km², which is lower than in urban areas, where cat density is much higher. Prevalence in cats was higher in animals living in farms than in those living in the villages. We supposed that cats where more exposed to *T. gondii* in farms, due to the abundance of commensal rodents that can be reservoirs of the parasite. Seroconversion in cats was associated with the number of juveniles when cats lived in groups: this result may reflect that a special risk of exposure is related to sociality in rural cats. Moreover, as in other studies, we found that free-roaming cats have more often seroconverted during the study than cats not allowed to roam. Finally, we also found an association between the probability to seroconvert and the mean values of rainfall during the year of seroconversion of cats: rainy years appeared to increase the probability to seroconvert, that could reflect a good oocysts survival in moist conditions.

Keywords: Toxoplasma gondii, rural cats, seroconversion, precipiations.

3.4.1. Introduction

Toxoplasma gondii is a worldwide protozoan parasite that infects humans and warm-blood animals. Felids, particularly domestic cats (*Felis catus*), play a key role in the transmission of *T. gondii* because they are the only hosts that excrete oocysts in the environement (Dubey & Beattie, 1988). Cats can acquire toxoplasmosis by eating contaminated intermediate hosts such as small mammals and birds. Beside predation, cats can also be contaminated by vertical transmission or by ingesting oocysts. However, epidemiological data suggest that these routes of transmission are rare in cats: vertical transmission is rarely observed (Dubey & Hoover, 1977; Afonso et al., 2006) and oocysts are low infectious in cats (Dubey, 2006).

Because cats excrete millions of oocysts in the environment during a brief period (1-3 weeks) after primary infection (Dubey & Beattie, 1988), the comprehension of the factors influencing the acquisition of toxoplasmosis in cats are of great importance to understand the dynamic of the environmental contamination by oocysts of *T. gondii*. In rural areas, the risk of seroconversion of cats to *T. gondii* is expected to be higher than in urban areas, due to the higher density of intermediate hosts (Dubey et al., 1995). However, since the prevalence can be influenced by the importance of predation in the diet of cats, cats allowed to go outdoor have generally highest prevalence than cats living indoor (Lucas et al., 1999; Miró et al., 2004). Moreover, cats living in social groups, as it is the case in village and farms (Turner & Bateson, 2000), could have an increased risk of acquire toxoplasmosis because they share the same areas and could be exposed to the feces of other cats (Fernandez et al., 1995; Gauss et al., 2003). In farms, the abundance of rodents and cats can lead to high local prevalence in these hosts (Dubey et al., 1995; Lehmann et al., 2003). Finally, climatic variations could also affect the probability of cats to seroconvert, since highest prevalences were observed in hot and moist years in an urban population of domestic cats (Afonso et al., 2006). The heterogeneity of the rural landscape and cats populations can then determine different risk of exposure to *T. gondii* in cats, however, the relative importance of these factors on the probability for cats to seroconvert has never been investigated.

The aim of this study was to determine which factors that could influence the seroconversion in rural cats. We detected specific antibodies in cats captured, marked, and recaptured between 1991 and 2005 in three populations of domestic cats in rural France. Taking advantage of the serologic long-term follow-up of many cats, we recorded animals that have seroconverted during the study period. We supposed that, additionally to a probable

effect of local climate on seroconversion, we could identify variables that differentiate cats that will seroconvert from cats that will remain seronegative, in three populations of rural domesitc cats.

3.4.2. Materials and methods

Populations and sampling

Three cat populations located in rural France have been monitored (Figure 1): Aimargues (AIM) and Saint-Just-Chaleyssin (STJ) since 1982, Barisey-La-Côte (BLC) since 1990 (Pontier, 1993). AIM was located in the South of France (Languedoc-Roussillon region), BLC was located in the North-East France (Lorraine region), and STJ was located in South-East France (Rhône-Alpes region). The three populations differ by their local climate (Figure 2): temperatures and precipitations evolve according to a mediterranean-continental gradient. Indeed, mean of maximum daily temperatures per decade and mean height of precipitations per decade ranged respectively from 32.1 °C to 35.6°C and from 12.5mm to 35.6mm between 1990 and 1998 at AIM ; from 27.1°C to 38°C and from 22.5mm to 32.7mm between 1990 and 2004 at BLC ; and from 23.2°C to 37.2 and from 29.7mm to 37.2mm between 1991 and 2005 at STJ (data from MétéoFrance).

All the three populations were identified as stable in size, density, sex ratio, and age structure, but they differed in size and density: population size ranged from 60 to 300 cats and density from 1.2 to 1.5 cats / ha (Pontier, 1993; Pontier et al., 1995). Most of the cats are fed by their owners but also prey on small mammals and birds. Cats live alone in the owners' house or in small to medium groups (ranging generally from 2 to 16 cats), with mothers and kittens forming the core groups with sometimes also include adult males.

Figure 1. Location of the study sites in France.

An epidemiological study has been carried out each year since 1991 in the four cat populations with various durations: 1991-1998 at AIM, 1991-2004 at BLC, and 1991-2005 at STJ. Cats were either caught directly in the owner's house, or trapped in baited cages. They were anaesthetized via a mixture of ketamin chlorhydrate (15 mg/kg; Sanofi, Paris, France), weighed and sexed, and blood samples were collected by jugular puncture. Cats were permanently marked with a sub-cutaneous electronic transponder at first capture for help the subsequent identification of each individual. During each trapping session, all cats that were seen on the site but untrapped were recorded, particularly to take into account the number of cats in the groups. Age was known to the nearest month for cats born in the population during the study (60.2% of all cats) and was estimated for other cats according to owners' information, general appearance, teeth development, body mass and marks from previous captures. We also recorded if cats live in the village or in farms.

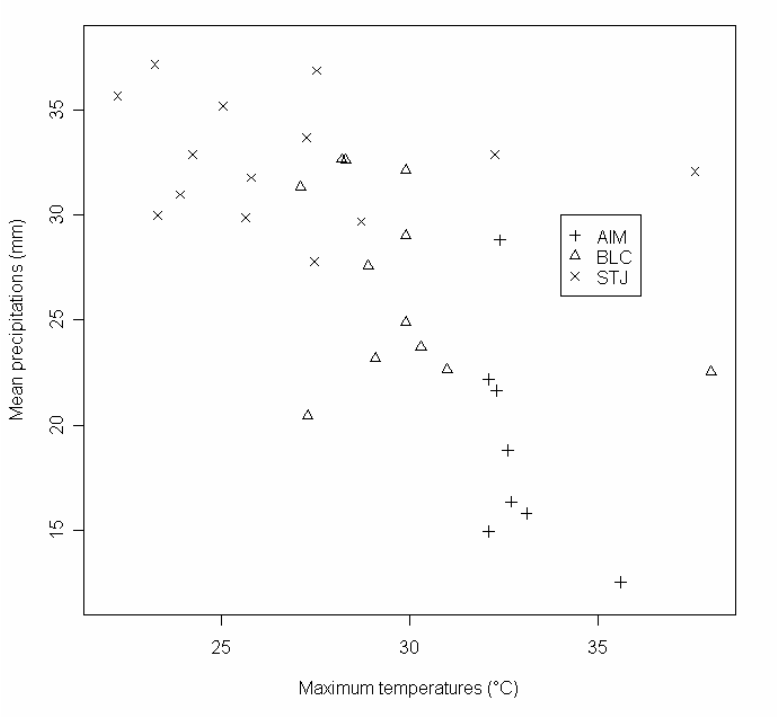


Figure 2. Maximum temperatures and mean precipitations observed during the 1991-2005 period in the studied populations.

Serological method

Blood samples were centrifuged and stored at -20°C, sera were diluted twofold starting at 1:20 and tested for anti-*T.gondii* IgG antibodies using the modified agglutination test (Dubey and Desmonts, 1987). We considered that cats were positive to anti-*T.gondii* antibodies when the antibody titer was ≥ 1:40 (Afonso et al., 2006).

Prevalence and expected number of seroconversions

Previously sampled cats were regularly recaptured during the follow-up. In order to estimate the seroprevalence in the three cat populations during the study period, one measurement was randomly selected for each of the cats. We calculated the proportion of cats having an antibody titer of at least 1:40. We repeated this calculus by resampling 1000 times with replacement one measurement per cat. We estimated overall seroprevalence as the mean

of the proportions of positive cats in the 1000 resamplings. All statistical procedures were performed using the R 2.3.0 software.

We estimated the expected number of seroconversion per hectare per year for an average year in each population by considering the serologic follow-up of cats. The number of cats having seroconverted during the study period was recorded (*i.e.* cats being seronegative at the beginning of the study and become seropositive during the study) and we considered the cumulative follow-up period for all the followed cats to obtain incidence. This last was then multiplied by the cat density in each population, to obtain the expected number of seroconversions in each population for an average year.

Variables associated with seroconversion

The serologic profile of cats was used to list all the individuals for which a seroconversion could be dated of less than one year (*i.e.* the first positive sample was spaced of one year from the last negative). We then searched to relate the probability to seroconvert in the year coming to predictor variables. For seroconverted cats, we considered the blood sample that has preceded the first positive test. For seronegative cats (*i.e.* cats for which we have at least two negative blood samples), we randomly selected one blood sample.

We used logistic regression to search for factors associated with a seroconversion, in order to take into account the effect of each factor adjusted on the others and to avoid confusion bias. In a urban population, prevalence increased linearly with age (Afonso et al., 2006), so we supposed that age would not influence the probability to seroconvert. We then tested the effect of roaming habit (free-roaming versus not allowed to roam) on the probability to seroconvert. Moreover, we supposed that cats living in the same territory would be more exposed to parasite, because of a high risk to be in contact with soil, water or prey contaminated by a newly infected cat. We then tested the effect of the total number of cats in the group (one cat in the case of singly pet cats), and the number of kittens (less than 6 months old) in the group. Moreover, because previous studies have shown that cats positives for FIV (Feline Immunodeficiency Virus) could be often positive fot anti-*T. gondii* antibodies (D'Amore et al., 1997; Dorny et al., 2002) we tested if FIV was related to the probability for cats to seroconvert. Finally, we tested the influence of maximum temperature and mean precipitations during the year between the two samplings that we supposed as representing climate conditions (Afonso et al., 2006).

To build the model, we firstly tested the effect of each variable and two-way interactions using a Likelihood Ratio Test (LRT). We then included all variables and interactions that tended to influence antibody prevalence ($P < 0.200$) and we simplified the model using a backward approach. We selected the most parsimonious model, *i.e.* the best compromise between residual deviance and number of parameters. Adjusted odds-ratio and 95% confidence intervals were calculated to measure the strength of association between each variable and probability of seroconverting. Overall fit of the final logistic equation was assessed using the Hosmer-Le Cessie test (Hosmer et al., 1997).

3.4.3. Results

A total of 861 distincts cats were trapped during the study: 224 cats at AIM, 226 at BLC, and 411 at STJ. We collected a total of 1488 blood samples, from which 37% was from recaptured cats (1-10 captures per cat). Of the 861 trapped cats, 458 were females and 403 were males. Place where cats live and age of cats were known for 856 individuals: 593 live in villages (178 at AIM, 128 at BLC and 287 at STJ) and 263 in farms (41 at AIM, 98 at BLC and 124 at STJ). By randomly taking into account one measurement per cat, age structure differed between the three populations (χ^2, $P < 0.001$): BLC and STJ had younger cats than AIM (Table I).

Table I. Number (and %) of cats in each age class in the studied populations.

	Age class (in year)				
Population	**< 1**	**[1-2]**	**[3-4]**	**≥ 5**	**Total**
AIM	26 (11.7)	109 (49.1)	36 (16.2)	51 (23)	222
BLC	91 (40.6)	73 (32.6)	36 (16.1)	24 (10.7)	224
STJ	141 (34.4)	137 (33.4)	54 (13.2)	78 (19)	410

Prevalence and the expected number of seroconversions in cats

Of the tested 861 cats, 454 had antibody titers of at least 40. Overall seroprevalence was thus 52.73% (95% CI: 49.39 – 56.04). Seroprevalence was of 50.18% (95% CI: 47.90 – 52.45) at AIM, of 47.39% (95% CI: 44.81 – 49.96) at BLC, and of 55.09% (95% CI: 53.48 – 56.70) at STJ. The proportion of seropositive cats did not differed between AIM (112/224) and BLC (107/226; χ^2, P = 0.639), and nor between AIM and STJ (226/411; χ^2, P = 0.263), but tended to be different between BLC and STJ (χ^2, P = 0.078).

By randomly taking into account one measurement per cat, seroprevalence differed between farms and villages (Figure 3). Indeed, seroprevalence was lower in villages (48.34% at AIM, 48.68% at BLC, and 60.82% at STJ) than in farms (83.32% at AIM, 64.33% at BLC, and 71.65% at STJ). Because cats where not followed up for long time in farms, we could not detect seroconversion in these individuals.

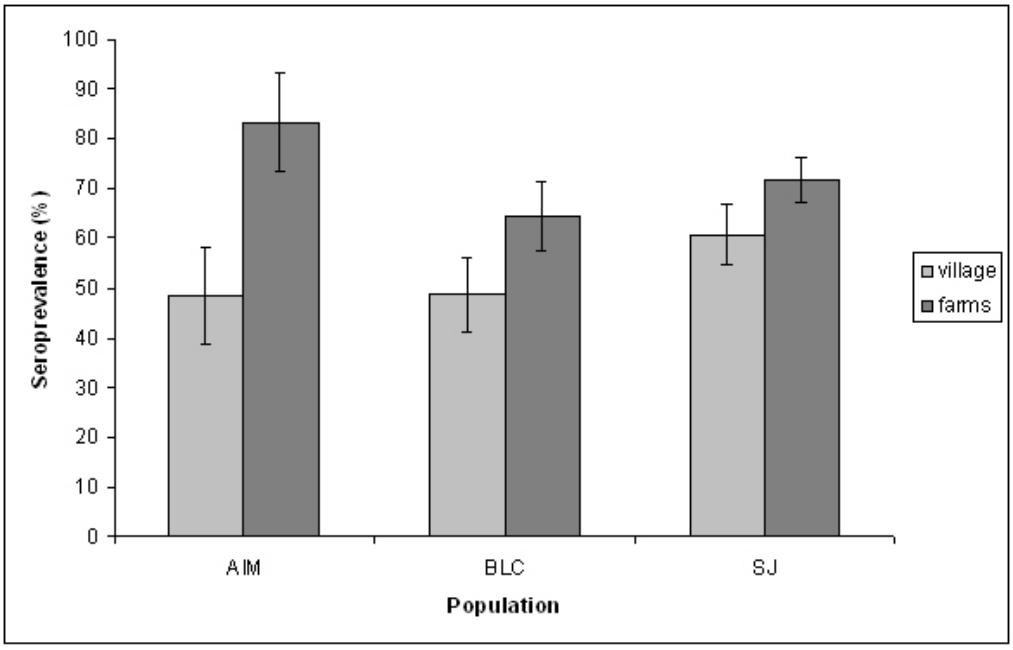


Figure 3. Seroprevalence of cats adjusted on age in villages and farms of the studied populations.

Of the 50 cats that were seronegative at first sampling at AIM, 22 seroconverted during a cumulative follow-up period of 85 years-cats. The observed incidence at AIM was thus 0.258 infection per cat per year. At BLC, 49 of the 71 cats that were seronegative at the first sample seroconverted during a period of 136 years-cat (0.360/cat/yr). The highest incidence was observed at STJ, since 52 cats of the 138 that were seronegative at the first

sampling seroconverted during a period of 132 years-cat (0.394 infection /cat/yr). Taking into account the density of cats, we expected 0.310 seroconversion /ha/yr at AIM, 0.720 /ha/yr at BLC and 0.551/ha/yr at STJ (Table II).

Table II. Main characteristics of the studied populations

Population	Study area[a] (km^2)	Population size	Cat density (cat/km^2)	Seroprevalence (%)	Nb seroconversions (km^2/year)
AIM	1.67	200	120[b]	50.18	31
BLC	0.23	45	200	47.39	72
STJ	2.14	300	140[c]	55.09	55

[a] Surface favourable to cats in the commune.

[b] Pontier et al., 1995 ; [c] Pontier & Natoli, 1996

Variables associated with seroconversion in cats

We could date a seroconversion of less than one year for 82 cats (19 at AIM, 27 at BLC, and 36 at STJ), whereas 64 cats remained seronegative during all their trappings (29 at AIM, 15 at BLC, and 20 at STJ). Most of the cats were free-roaming (N = 128), whereas 18 were not allowed to roam by their owner. Although cats not allowed to roam were not equally represented in our sample, we chosen to take into account the roaming habits of cats in the logistic model in order to avoid confusion bias.

Beside roaming, the retained model to explain the probability of seroconversion also included also the number of juveniles in the group and mean precipitations. Indeed, a significant association was detected between the probability to seroconvert and the number of kittens in the group (LRT, P = 0.001; Table III). A group with kittens appeared to lead higher risk of seroconversion than a group without young cats. Moreover, the roaming habit of cats influenced also the probability to seroconvert (LRT, P = 0.006): cats not allowed to roam had a 3.59 lower probability to seroconvert than free-roaming cats. Finally, mean precipitations during the year coming future increased the chance to seroconvert (LRT, P = 0.009). The effect of mean precipitations was the same in the three populations: the interaction between population and precipitations was no significant (LRT, P = 0.224). So, in all the three populations, a high level of rain lead to higher rates of seroconversions. Seroconversions

occurred more often during moist years (mean precipitations per decade > 25 mm), leading to high probabilities to seroconvert when social group comprises more than one juvenile (Figure 4). In largest groups (7 kittens), the model predicted that almost all individuals seroconvert in moist years.

Noteworthy, the effect of mean precipitations accounted for temporal variability as well as between-population variability of the probability to seroconvert. Indeed, difference of exposure to *T. gondii* between years or between the three populations was accounted for by mean precipitations included in the selected model: their effect was significant when they were considered singly in a model (LRT, years: P = 0.060, population: P = 0.018), whereas they were no longer significant when mean precipitations were considered with years or populations (LRT, years: P = 0.412, population: P = 0.792). Other variables were not retained in the final model: sex (LRT, P = 0.303), FIV (LRT, P = 0.394), number of cats in the group (LRT, P = 0.090), maximum temperature (LRT, P = 0.120), and the interaction between population and maximum temperature (LRT, P = 0.268). The Hosmer-LeCessie goodness-of-fit test showed a good fit of the selected model (P = 0.491).

Tableau III. Variables associated with seroconversion for *Toxoplasma gondii* in cats and parameters of the model chosen.

Variable	Group	Adjusted odds-ratio	95% Confidence interval	P-value (LRT)
Number of juveniles	-	1.48	[1.02; 2.13]	0.001
Roaming habit	Free-roaming cats	1.00	-	0.006
	Cats not allowed to roam	0.25	[0.07; 0.83]	
Mean precipitations	-	1.07	[1.02; 1.13]	0.009

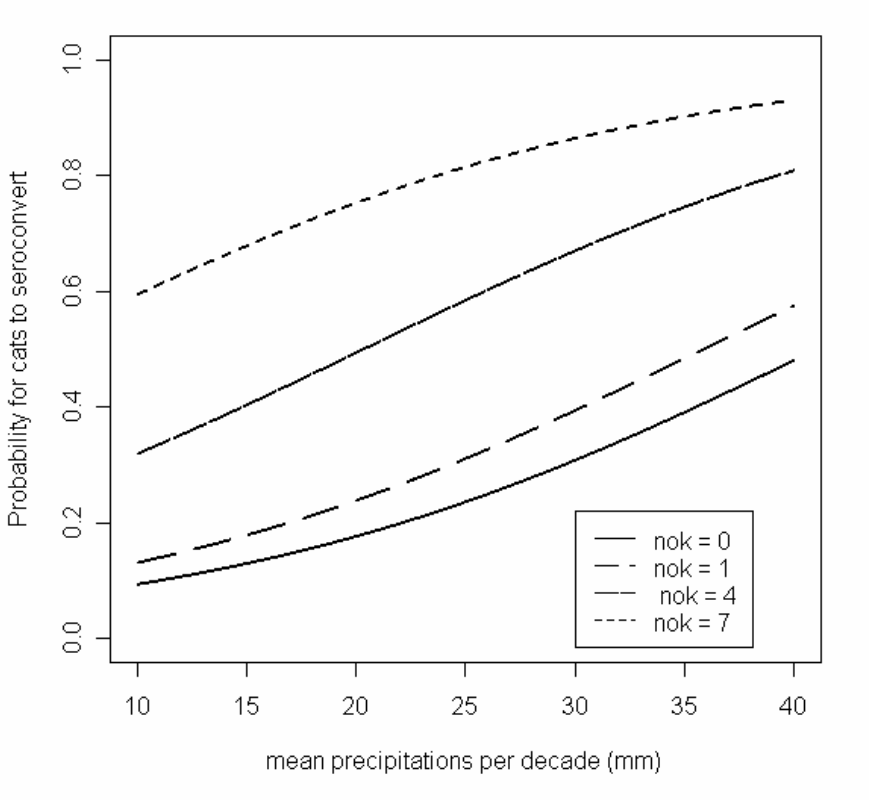


Figure 4. Predictions of the final model for free-roaming cats. Mean precipitations was those observed in the three studied populations during the study period (1991-2005). We calculated predictions for different number of kittens in the cat group (nok = number of kittens).

3.4.4. Discussion

The overall seroprevalence of cats trapped in three rural areas in France was > 50%, indicating that cats were highly exposed to *T. gondii*. We found that cats living in farms where more often positive for anti-*T. gondii* antibodies than those living in villages. In previous studies, authors have found similar values in rural cats and related these values to the possibility for cats to hunt intermediate hosts that could potentially be contaminated (47%, Gethings et al., 1987; 62%, Yamaguchi et al., 1996; 59.7%, Dubey et al., 2002). Moreover, recent investigations have shown that farms may serve as reservoirs of infection in rural environment: in farms and in surrounding grasslands, rodents are abundant and their seroprevalences are often high (Dubey et al., 1995; Lehmann et al., 2003). Cats in farms have now to be followed-up for long periods to conclude on the relative impact of place where cats live on the probability to seroconvert.

Although prevalence was high in the three populations, the importance of contamination of the environnement by oocystes (31-72 cats, depending on the population, seroconverted during an average year per km², and shedded millions of oocystes in the environment) would be lower than in an urban population of domestic cats (400 cats seroconverted per km² for an average year; Afonso et al., 2006). These results can be explained by the fact that density in rural populations (120 – 200 cats/ km²; Pontier et al., 1995; Pontier & Natoli, 1996) was lower than in the dense urban cat population (970 cats/ km²; Devillard et al., 2003): incidence was then higher in dense population where possibility of new contaminations are high for cats, even if prevalence was low (18.6%; Afonso et al., 2006).

Incidence varied between the three study populations and was higher in those where younger cats were the most abundant: we estimated that 31 seroconversions occurred per km² for an average year at AIM, while 72 and 55 seroconversions occurred per km² for an average year at BLC and STJ, respectively. Although the probability of cats to seroconvert was not related to the age of cats, one can expect more seroconversion events to oocur in a young population where numerous cats are exposed than in a population where cats are older and have a high probability to have already been in contact with the parasite and seroconvert. Moreover, we found a significant association between the probability to seroconvert in cats and the number of kittens in the groups frequented by cats. Since communal defecation sites can take place around feeding sites and are used by members of the groups (Yamaguchi et al., 1996; Turner & Bateson, 2000). Cats living in groups thus have more opportunities to come into contact with areas contaminated by other cats within the group than solitary cats, and so may have higher proportions of parasites transmitted by ingesting oocysts. Moreover, mothers living in social groups are often kin-related and sometimes rear young cooperatively, and comprise more than one female. Mothers could be exposed to special risk of contamination during gestation and lactation, because of an increase of energy requirements and distances covered for hunting during this period (Turner and Bateson, 2000). Mothers could then have higher risks to be primary contaminated during these periods and to excrete oocysts in the territory of the group. Finally, kittens themselves could represent a special risk of exposure for cats: because they generally cover short distances to defecate from their feedings points (Turner and Bateson, 2000), and could excrete oocysts in places used by other cats for many activities.

The difference between free-roaming cats and cats not allowed to roam is well known for toxoplasmosis in cats (Lucas et al., 1999; Tenter et al., 2000; Gauss et al., 2003). Free-

roaming cats living free in rural areas could be more exposed to the contamination by ingesting contaminated intermediate hosts like small mammals and birds. In the three studied populations, roaming habits are correlated with reproductive status of cats and group size (Fromont et al., 1998) : free-roaming cats are more often nonneutered and live in large groups, compared to cats not allowed to roam which are generally neutered and live solitary or in small groups. Then, here, roaming habits of cats can reflect a particular profil of cats that determine their risks for toxoplasmosis. Neutered cats have less motivation to go outdoor and to hunt than nonneutered cats (Turner & Bateson, 2000). So, neutering owned cats could contribute to reduce their roaming habits and their chances to acquire toxoplasmosis by hunting intermediate hosts.

Finally, we found an influence of the cumulative rainfall on the probability to seroconvert. Here, cats had a higher probability to seronvert during rainy years (mean rainfall per decade > 25 mm). In a previous study, we showed that anti-*T. gondii* antibody prevalence in urban cats was related to temperatures and precipitations: hot and moist years were those for which we found the highest seroprevalences in cats (Afonso et al., 2006). These results may suggest that precipitations could indirectly act on exposure to *T. gondii* for cats: precipitations can be related to the survival of oocysts in the external environment, and then to the abundance of infectious parasite in the environment. Intermediate hosts, as well as cats, could be most contaminated during rainy years: by increasing the risks of contact with infectious oocysts, and of consume a contaminated intermediate host. Such a relationship with infection and precipitations has already been found in others parasites in cats (*Bartonella henselae*; Jameson et al., 1995; Maruyama et al., 2003) or proposed in toxoplasmosis in humans (Hubálek, 2005; Sukthana et al., 2006). In the context of changing climate, it is necessary to better understand the influence of climatic conditions on this and other zoonotic parasites, in order to provide insights into the possible control of these infections.

Acknowledgements

The authors thank all those who participated in the field. Thanks to Christiane Leprince for performing serological tests. This work was financially supported by the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET), the Grünenthal France Laboratory, the Région Champagne-Ardenne and the Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise.

REFERENCES

Afonso, E., Thulliez, P. & Gilot-Fromont, E. 2006. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *International Journal For Parasitology* 36, 1373-1382.

D'Amore, E., Falcone, E., Busani, L., & Tollis, M. 1997. A serological survey of feline Immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* in stray cats. *Veterinary Research Communications* 21, 355-359.

Devillard, S., Say, L., Pontier, D. 2003. Dispersal pattern of domestic cats (*Felis catus*) in a promiscuous urban population: do female disperse or die? *Journal of Animal Ecology* 72, 203-211.

Dubey, J.P., & Beattie, C.P. 1988. Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton.

Dubey, J.P., & Desmonts, G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal* 19**,** 337-339.

Dubey, J.P., & Hoover, E.A. 1977. Attempted transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kittens. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 170, 538-540.

Dubey, J.P., Weigel, R.M., Siegel, A.M., Thuilliez, P., Kitron, U.D., Mitchell, M.A., Mannelli, A., Mateus-Pinilla, N.E., Shen, S.K., Kwok, O.C.H. & Todd, K.S. 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in illinois. *Journal of Parasitology* 81, 723-729.

Dubey, J.P., Saville, W.J.A., Stanek, J.F., & Reed, S.M. 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Domestic Cats From Rural Ohio. *The Journal of Parasitology* 88, 802-803.

Dubey, J.P. 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Veterinary Parasitology* 140, 69-75.

Dorny, P., Speybroeck, N., Verstraete, S., Baeke, M., De Becker, A., Berkvens, D. & Vercruysse, J. 2002. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *The Veterinary Record* 151, 626-629.

Fernandez, F., Ouvina, G., Clot, E., Fernandes Guido, R., Codoni, C. 1993. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats in the western part of Great Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology* 59, 75-79.

Fromont, E., Artois, M., & Pontier, D. 1998. Epidemiology of feline leukemia virus (FeLV) and structure of domestic cat populations. *Journal of Wildlife Management* 62, 978-988.

Gauss, C.B.L., Almeria, S., Ortuno, A., Garcia, F., & Dubey, J.P. 2003. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. *The Journal of Parasitology* 89, 1067-1068.

Hosmer, D.W., Hosmer, T., Le Cessie, S. & Lemeshow, S. 1997. A comparison of goodness of fit tests for the logistic regression model. *Statistics in Medicine* 16, 965-980.

Hubálek, Z. 2005. North Atlantic weather oscillation and human infectious diseases in the Czech Republic, 1951-2003. *European Journal of Epidemiology* 20, 263-270.

Jameson, P., Greene, C., Regnery, R., Dryden, M., Marks, A., Brown, J., Cooper, J., Glaus, B., & Greene, R. 1995. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout regions of North America. *Journal of Infectious Diseases* 172, 1145-1149.

Lehmann, T., Graham, D.H., Dahl, E., Sreekumar, C., Launer, F., Corn, J.L., Gamble, H.R., Dubey, J.P. 2003. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infection, Genetics and Evolution* 3, 135-141.

Lucas, S.R.R., Hagiwara, M.K., Loureiro, V., Ikesaki, J.Y.H., & Birgel, E.H. 1999. *Toxoplasma gondii* infection in brazilian domestic outpatient cats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 41, 221-224.

Maruyama, S., Kabeya, H., Nakao, R., Tanaka, S., Sakai, T., Xuan, X., Katsube, Y., & Mikami, T. 2003. Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV Infections in Domestic Cats in Japan. *Microbiology and Immunology* 47, 147-153.

Miró, G., Montoya, A., Jimenez, S., Frisuelos, C., Mateo, M., Fuentes, I. 2004. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. *Veterinary Parasitology* 126, 249-255.

Pontier, D. 1993. Analyse de la variabilité des traits d'histoire de vie chez les mammifères. Mémoire d'habilitation à diriger des recherches. Thesis, Université Lyon-1, France.

Pontier, D., & Natoli, E. 1996. Male reproductive success in the domestic cat (*Felis catus* L.): a case history. *Behavioural Processes* 37, 85-88.

Pontier, D., Rioux, N., & Heizmann, A. 1995. Evidence of selection on the orange allele in the domestic cat *Felis catus*: the role of social structure. *Oikos* 73, 299-308.

Sukthana, Y. 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends in parasitology* 22, 137-142.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., & Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal For Parasitology* 30, 1217-1258.

Turner, D.C., & Bateson, P.B. 2000. The Domestic Cat. The Biology of its Behaviour. Cambridge University Press.

Yamaguchi, N., Macdonald, D.W., Passanisi, W.C., Harbour, D.A., & Hopper, C.D. 1996. Parasite prevalence in free-ranging farm cats, *Felis sivestris catus*. *Epidemiology and Infection* 116, 217-223.

3.5. Spatio-temporal variability in the prevalence of Toxoplasma gondii in definitive hosts in rural areas in France.

Eve AFONSO, Estelle GERMAIN, Marie-Lazarine POULLE, Dominique PONTIER, Isabelle VILLENA, Dominique AUBERT, Sandrine RUETTE, François LEGER, et Emmanuelle GILOT-FROMONT.

En cours de préparation.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a worldwide protozoan parasite that infects humans and a large variety of animal species. Felids are the only definitive hosts of the parasite. In rural environments, farms can serve as reservoirs of the infection and be an area of contact between these hosts and the intermediate hosts. The aim of this study was to relate the level of infection in cats, to the agricultural activity in rural communes. We collected 208 cats between 1996 and 2006: 29 were domestic cats (*Felis catus*), 71 were wildcats (*Felis silvestris*) and 50 were hybrids from the two ecotypes. Seroprevalence did not differ between ecotypes, and we then estimated the overall seroprevalence as 62.98%. We detected a positive relationship between the probability of having antibodies and the number of farms in the communes. Moreover, we found that inter-annual variations observed during the study period could be related to the fluctuations of the NAO winter index: high prevalences were observed when winter temperatures and precipitations during the winter preceding the collect were high. Finally, we found that seropositive cats had a more important ratio of *Microtus* species in the distribution of their prey items, than seronegative cats. We related the number of farms to the surface of habitat where the abundance of these species should be the highest. Farms should thus represent hyper-endemic areas by concentrating rodents living in open areas also with domestic cats, thus increasing the risk of exposure for cats.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, stray cats, wildcats, rural area, farms.

3.5.1. Introduction

Toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii,* is one of the most prevalent zoonotic diseases of warm-blood mammals throughout the world (Tenter et al., 2000). After primary infection, felids excrete millions of oocysts of *T. gondii* in the environment during a brief period (Dubey and Beattie, 1988). Oocysts may remain infectious in moist soil for at least 18 months (Frenkel et al., 1975; Tenter et al., 2000), and infest an intermediate host such as small mammals and birds, which complete the life cycle when they are eaten by cats. In rural environment, the landscape composition is highly heterogeneous, and is a dependency of human activities: because of difference between hosts communities, areas such as forests, grasslands, cultivated field or farms, may present differences in the possibilities of *T. gondii* transmission. The variability of the prevalence of *T. gondii* in definitive hosts could be thus related to hosts density that determines the probability of contact with the parasite (Altizer et al., 2003), but also to variables describing the local environment, such as climate fluctuations that can reflect oocysts survival and fluctuations of intermediate hosts (Frenkel et al., 1975; Mouritsen and Poulin, 2002; Stenseth et al., 2002).

Noth Atlantic Oscillation index has been related to inter-annual variations in populations of *Apodemus flavicollis* and *Myodes glaerolus* as a reflect of the variation in seed production (Stenseth et al., 2002). Moreover, spatial heterogeneity in agricultural activities may represent variability in hosts' density. Indeed, Warner (1985) reported that farms with domestic livestock had more cats per residence than households without livestock. Recent studies have shown that livestock production farms may serve as reservoirs of infection in rural environments (Dubey et al., 1995; Weigel et al., 1995; Weigel et al., 1999; Lehmann et al., 2003). Although these studies have especially investigated swine farms, several characteristics indicate that all livestock production farms may increase the risk of transmission of *T. gondii* to the surrounding environment (Lehmann et al., 2003). The abundance of rodents (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*) in farms is related to the presence of stray cats, which increase the possibility of transmission between these hosts, and the contamination of livestock through the shedding of oocysts by cats (Smith et al., 1992; Assadi-Rad et al., 1995; Weigel et al., 1995; Yamaguchi et al., 1996; Kijlstra et al., 2004). Moreover, the presence of oocysts could be high around the farms, due to the probable longevity of oocysts in the moist and shaded environment of the farm sites, and livestock animals may increase the dissemination of oocysts by mixing the soil (Lehmann, et al., 2003).

In Central and Eastern France, the potential main definitive hosts of *T. gondii* are the domestic cat *Felis catus* (Linnaeus 1758), and the European wildcat *Felis s. silvestris* (Schreber 1777), these two being able to hybridise to produce fertile hybrids (Randi et al., 2001). Furthermore, in the study conducted by Biró et al. (2005) in rural environment, communities of domestic cats are in competition with wildcats and hybrids for the food resources, which are largely constituted in the same proportions by small mammals (murids and microtines). Wildcats and hybrids can hunt in farms and in their surroundings (Germain et al., in prep.), so farms can constitute an area where definitive hosts should defecate and be in contact with intermediate hosts. Domestic cats, as well as wildcats and hybrids, are then expected to be often positive when the landscape composition comprise farms. Moreover, domestic cats consume more anthropogenic food than wildcats that are expected to be exclusively predators, with the diet of hybrids being intermediate between those of domestic cats and wildcats (Biró et al., 2005). The ecotypes of definitive hosts may thus have different level of prevalence, according to their diet or their infective susceptibility.

According to this view, the aim of this study was to investigate the spatio-temporal variations of the level of infection of three potential main definitive hosts of *T. gondii* in rural France. We collected cats bodies in Central and Eastern France and recorded the number of farms in the communes where cats were collected, as well as the North Atlantic Oscillation winter index. Moreover, we supposed that seropositive cats may have a hunting behaviour that could differ from seronegative ones. We then explored the content of the stomach of some of the cats collected, in order to search for a difference of distribution of prey items among serological status of cats.

3.5.2. Materials and methods

Sampling

Between 1996 and 2006, dead cats were collected on roads by the French Game and Wildlife Office (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, ONCFS) in all the regions where the presence of cats with a wildcat's phenotype was suspected or confirmed (Central and Eastern France). All cats were collected in forest areas or remotely from areas

inhabited by humans. So we assumed that cats collected did not interact with humans. Moreover, fifteen live cats (7 females and 8 males) were trapped in eastern France (Champagne-Ardennes region) between 2003 and 2006 (Germain et al, in prep.). Each cat was geographically assigned to the "commune" where it was found.

All corpses were necropsied and hair samples were taken on each specimen for genetic identification to discriminate domestic cats from wildcats and hybrids. Genetic analyses were based on Pritchard et al. (2000) method (Germain et al., in prep). Each cat was sexed and weighed, and blood samples were taken. Cats whose teeth were not fully erupted, and/or were small in size were considered to be less than one year old and class as "juveniles". The other cats were classified as "adults".

Serological tests

Blood samples were stored at -20°C, diluted twofold starting at 1:6 and tested for anti-*T.gondii* IgG antibodies using the modified agglutination test (Dubey and Desmonts, 1987). The seroprevalence was estimated as the proportion of cats having an antibody titer ≥ 1:48 (Afonso et al., 2006).

Number of farms and NAO winter index

The number of farms in each commune was obtained from the French ministry of agriculture and fishing (http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/). We supposed that it would reflect the concentration of commensally rodents (Langton et al., 2001; Leirs et al., 2004) and cats, and thus be a measurement of spots of concentration of the hosts of *T. gondii* in the landscape.

Furthermore, we attempted to relate the inter-annual oscillations in antibody prevalence in cats to the North Atlantic Oscillation winter index. The NAO index represents a measure of the difference in pressure level between Iceland and the Azores, and provides a single variable to resume, in a large geographic area, inter-annual differences in a number of

weather variables such as temperature, wind speed and direction, and precipitation (Hurrell, 1995). NAO winter index covered the period from December to March. High index values are associated with high winter temperatures and high levels of precipitation in Western Europe (Hurrell, 1995). The NAO winter index values were extracted from the URL http://www.cgd.ucar.edu/~jhurrell/nao.html. We recorded the values of NAO winter index for the winter preceding the collect of each cat. We supposed that inter-annual differences in antibody prevalence in cats could be related to oocyst survival and/or intermediate host abundance. Warm and wet winters should favour both oocyst survival (Frenkel et al., 1975) and high densities of preys (Stenseth et al., 2002; Ottersen et al., 2001).

Variables associated with antibody prevalence

We used logistic regression to relate the logit of the probability of being seropositive to predictor variables of age, genetic type, sex, year of collect (qualitative variable), number of farms (logarithmic transformation, base 10), and NAO winter index.

Because cases accumulate with age (Dubey and Beattie, 1988), we supposed that adults should be more often positive than juveniles. We thus firstly took into account the effect of age (juveniles/adults), and we tested the effect of each variable with two-way interactions (using a Likelihood Ratio Test (LRT), $P < 0.200$). Secondly, we included all variables and interactions that tended to influence antibody prevalence and then simplified the model using a backward approach. We selected the most parsimonious model, *i.e.* the best compromise between residual deviance and number of parameters. Coefficients in the final model were estimated by calculating adjusted odds-ratios and 95% confidence intervals to measure the strength of association between each variable and serological status. Overall fit of the final logistic equation was assessed using the Hosmer-Le Cessie test (Hosmer et al., 1997).

Distribution of prey items

We determined the occurrence of prey items by analysis of the stomach contents collected from 53 of the dead cats. Rests of prey items (bones, teeth, hair) were identified by macro and microscopic examination using key references (see Germain et al., in prep. for details). We used a G-test to analyse the occurrence of each prey species among seronegative and seropositive cats. Shannon-Weaver index (Shannon and Weaver, 1949) was used to calculate diet diversity from occurrence among serological status of cats.

3.5.3. Results

Prevalence

We collected or trapped 208 cats throughout 155 communes of central and eastern France. Among these, 41 were juveniles and 167 were adults; 29 were classified as domestic cats, 71 as wildcats and 50 as hybrids, according to the genetic analyses. We could determine sex for 205 of the 208 cats: 82 were females and 123 were males. We recorded information about the number of farms in 146 communes, for 189 of the 208 collected/trapped cats. The number of farms per commune ranged from 3 to 132.

Antibodies to *T. gondii* (MAT, ≥ 1:40) were found in 131 of 208 cats, with titres of 1:40 in 54 cats, 1:80 in 39 cats, 1:160 in 20 cats, 1:320 in 6 cats, 1:640 in 5 cats and ≥ 1:1280 in 7 cats. The crude overall seroprevalence was 62.98% (95% CI: 56.24 – 69.25) and did not differed between domestic cats 65.50% (19/29), wildcats 63.38% (45/71), and their hybrids 60% (30/50) (χ^2, P = 0.875). Inter-annual variations in crude seroprevalence were significant (χ^2, P = 0.017), yearly seroprevalence varied between 36.36% and 93.33% (Figure 1).

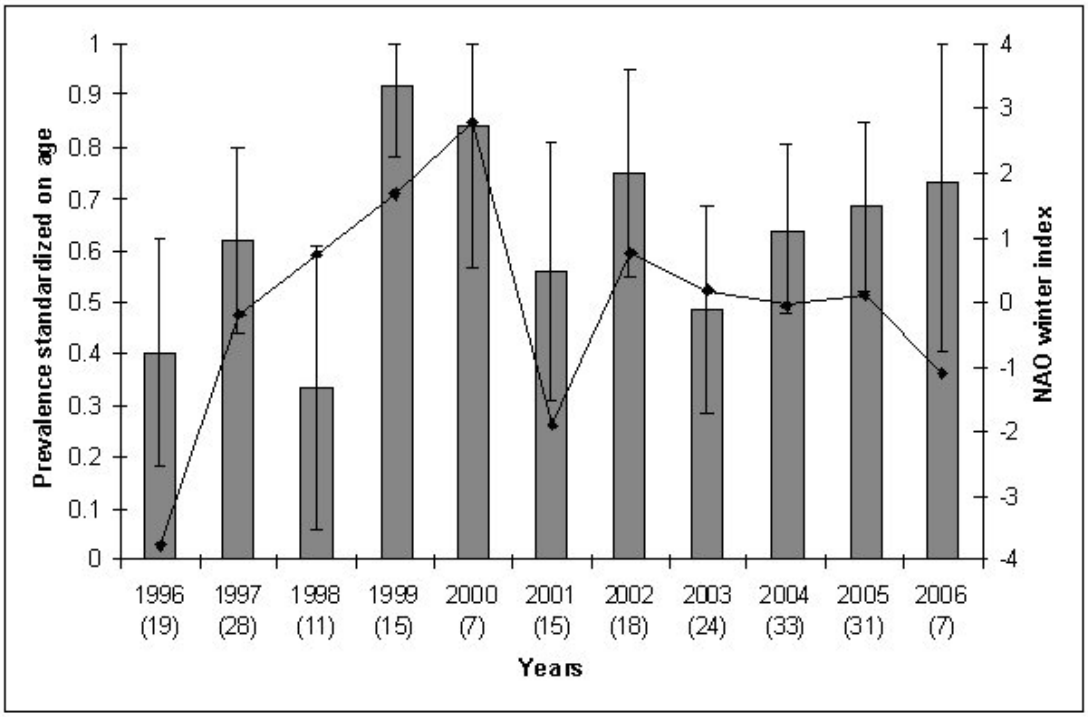


Figure 1. Inter-annual variations in seroprevalence in cats standardized on age (bars) and observed values of NAO winter index (full line) during the study period. Lines represent 95% confidence intervals and numbers in brackets indicate sample sizes.

Variables associated with antibody prevalence

A significant association was detected between age and *T. gondii* seropositivity (LRT, P = 0.050). Juvenile cats had 1.96 times lower chance of having antibodies than adults. After taking into account the effect of age, the log-transformed number of farms in the communes and the NAO winter index were related to antibody prevalence (Table I). The probability of having antibodies was increased in communes where the log-transformed number of farms was high (LRT, P = 0.001). Moreover, cats were more often positive when the NAO winter index of the winter preceding the collect was high (Figure 2).

Inter-annual variations were signicantly accounted for by the NAO winter index: after considering age only, the temporal variability was significant (LRT, P = 0.010), whereas this effect was no longer significant (LRT, P = 0.134) when the NAO winter index was considered. The inter-annual differences in seroprevalence partially overlapped the NAO winter index variations (Figure 1).

Other variables were not retained in the final model: genetic type (LRT, P = 0.949), and sex (LRT, P = 0.498). The Hosmer-LeCessie goodness-of-fit test showed a good fit of the final selected model (P = 0.881).

Table I. Variables associated with seropositivity for *Toxoplasma gondii* in cats and parameters of the chosen model.

Variable	Group	Adjusted odds-ratio	95% confidence interval	P-value (LRT)
Age	Adults	1.00	-	0.050
	Juveniles	0.51	[0.23; 1.11]	
Number of exploitations	-	1.81	[1.21; 2.70]	0.001
NAO (winter)	-	1.40	[1.13; 1.75]	0.002

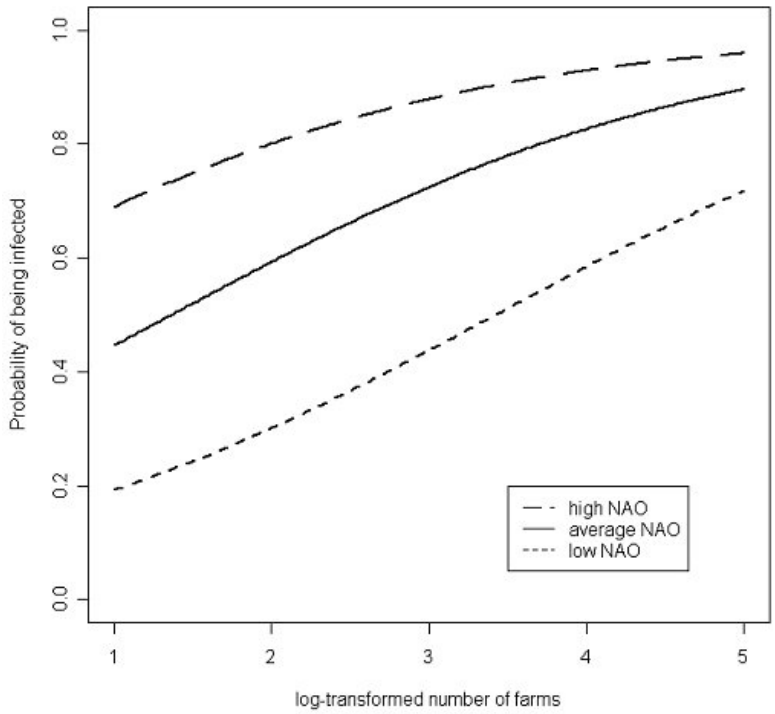


Figure 2. Predicted relationship between log-transformed number of farms and the probability of being infected. Average NAO winter index observed during the study period was taking into account for calculate the average predictions (full line). Minimal and maximal NAO winter index values observed during the study period was used to calculate the minimal and maximal predictions of the model (dotted lines).

Distribution of prey items

The content of the stomach of 17 domestic cats, 13 hybrids and 23 wildcats was analysed. Small mammals formed the dominant component of the diet of feral domestic cats, hybrids and wildcats (Table II). Common vole *Microtus arvalis* and field vole *Microtus agrestis* were the most important prey items in stomach contents. The second most heavily consumed item was field mouse *Apodemus* spp. (*Apodemus sylvaticus* or *Apodemus flavicollis*).

Among the 53 dead cats from which we collected stomach, 19 were seronegative and 34 were seropositive. Because we did not detect relationship between antibody prevalence and genetic type of cats, we regrouped the stomach contents according to the serologic status of cats. Seronegative and seropositve cats had no significantly different distribution of prey items, compared to seronegative ones (G-test, P = 0.222). However, the distribution of prey items of seronegative cats was more diverse (H = 0.93) than those of seropositive ones (H = 0.78).

Table II. Distribution of the number of small mammals items in stomach of cats according to the serological status of cats for toxoplasmosis.

Prey species	In seronegative cats	In seropositive cats	TOTAL
Apodemus sp. *(Apodemus sylvaticus, Apodemus flavicollis)*	7	12	**19**
Arvicola terrestris	0	1	**1**
Myodes glareolus	2	4	**6**
Crocidura sp.	1	0	**1**
Microtus sp. *(Microtus arvalis, Microtus agrestis)*	5	13	**18**
Mus musculus	1	2	**3**
Neomys sp.	1	0	**1**
Ondatra zibethicus	1	0	**1**
Rattus norvegicus	0	1	**1**
Sorex sp.	3	1	**4**
Talpa europaea	1	0	**1**

3.5.4. Discussion

The seroprevalence in cats collected through central and eastern France was particularly high (62.98%), compared to values observed in an urban environment where predation is uncommon (18.6%; Afonso et al., 2006). Because wildcats and stray cats are largely dependent on predation, their levels of infection can be related to the possibility of the frequent consumption of contaminated intermediate hosts (Tenter et al., 2000). After taking into account the effect of age, seroprevalence did not differed between genetic types. This results may thus suggest that the levels of infections found in cats collected in this study could be related to a similar exposure and susceptibility to *T. gondii* in the three types of cats. In our study, we highlight several factors of exposure in these hosts.

Seroprevalence significantly varied among years, as was already found in an urban population of stray cats (Afonso et al. 2006). Moreover, we found that inter-annual variations of seroprevalence may be related to the NAO winter index. Cats were more often found positive for *T. gondii* when winter temperatures and precipitations preceding the collect were high. The variation of infection levels in relation to climate fluctuations can be related to the survival of parasite infective stages in the external environment (and then to the abundance of parasite in the environment), as to their infection intensity (Mouritsen and Poulin, 2003). Moreover, variations in climate patterns also affect predator-prey interactions by increasing mortality of small mammals and affecting their abundance when winter are severe (Ottersen et al., 2001). In the case of toxoplasmosis, a previous study in an urban domestic cat population where predation is uncommon have shown that moist and hot years should favour the increase of the levels of infection in cats, probably because oocysts survival is optimal in these conditions (Afonso et al., 2006). In cats surviving through predation, climate oscillations may produce a cascade of effects - by affecting oocysts survival, as well as density and probability of contamination of intermediate hosts - that could modulate the host-parasite and the predator-prey interactions. Moreover, because domestic cats move far from farms when temperature is clement (Germain et al., in prep.), the dissemination of *T. gondii* should be favoured in years with high NAO winter index, both in space (movements of cats) and in time (survival of oocysts).

Moreover, we showed that antibody prevalence in cats was related to the number of farms in the communes where they were collected or trapped. Although the commune as the scale of investigation does not have an ecological meaning for cats, we assumed that the number of farms in the communes reflects a local landscape management, and then the

importance of the exposure to potential hyper-endemic areas. Because farms are favourable areas for the presence of domestic cats (Warner, 1985; Turner and Bateson, 2000), wildcats and hybrids that hunt in farms' surroundings can be in contact with soil or intermediate hosts contaminated by oocysts shed by domestic stray cats, and then have increased probabilities of acquiring the infection in these areas.

Finally, the overall distribution of prey items in stomachs of cats was similar to those found in other studies (Condé et al., 1972; Biró et al., 2005). The major difference between cats according to their serological status was that seropositive cats had a lower varied composition of food item in their stomach than seronegative ones, with a higher proportion of *Microtus* species (*Microtus agrestis* or *Microtus arvalis*). *Microtus* sp. live in grasslands and semi-open habitats, contrary to field mouse and bank voles that are most found in forests (Indelicato, 2000). Our results thus suggest that seropositive cats may be those that hunt the most in grasslands and semi-open habitats. The importance of agricultural activity could determine the ratio of these habitats in the landscape composition. Communes with high numbers of farms may present a high ratio of open and semi-open habitat, and should have high abundance of *Microtus* species. The ratio of permanent grassland in the landscape has already been related to the abundance of *Microtus arvalis*, that could outbreak when surface of open habitat is high (Delattre et al., 1992; Giraudoux et al., 2003). Because cats are opportunistic predators that adapt their diet to the availability of prey (Turner and Bateson, 2000), the composition of landscape, by determining the composition of intermediate hosts communities, can affect the risk of transmission of *T. gondii*, like that is observed in others zoonosis, for example *Echinococcus multilocularis* (Giraudoux et al., 2003).

To conclude, communes with numerous farms could represent a special risk for the exposure of *T. gondii*, by offering an abundance of intermediate hosts, and an interface area of proximity between the definitive hosts. Wildcats, which mainly live in forest environment (Stahl and Léger, 1992; Lozano et al., 2003), may be contaminated when they hunt in grasslands, where the importance of contamination should be increased by the presence of domestic cats, and they could then contaminate forest. This phenomenon could be higher in moist and hot years and could contribute to expose domestic livestock and humans to high risk of contamination.

Acknowledgements

The authors thank the persons who participated to the collect and necropsy of dead cats, and the trapping sessions of cats. The authors also thank Régine Geers for performing serological tests, and Kevin Georgin for performing stomach analysis. This study has been financially supported by the Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET), Grünenthal France Laboratory, the Région Champagne-Ardenne, the Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise and the Zoo d'Amnéville (Moselle, France).

REFERENCES

Afonso, E., Thulliez, P., & Gilot-Fromont, E. 2006. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *International Journal for Parasitology* 36, 1373-1382.

Altizer, S., Nunn, C.L., Thrall, P.H., Gittleman, J.L., Antonovics, J., Cunningham, A.A., Dobson, A.P., Ezenwa, V., Jones, K.E., Pedersen, A.B., Poss, M., & Pulliam, J.R.C. 2003. Social organization and parasite risk in mammals: Integrating Theory and Empirical Studies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34, 517-547.

Assadi-Rad, A.M., New, J.C., & Patton, S. 1995. Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tenessee. *Veterinary Parasitology* 57, 289-297.

Biró, Z.S., Lanszki, J., Szemethy, L., Heltai, M., & Randi, E. 2005. Feeding habits of feral domestic cats (*Felis catus*), wild cats (*Felis silvestris*) and their hybrids: trophic niche overlap among cat groups in Hungary. *Journal of Zoology* 266, 187-196.

Condé, B., Nguyen-Tchi-Thu-Cuc, Vaillant, F., & Schauenberg, P. 1972. Le régime alimentaire du chat forestier (*Felis silvestris*, Schreber) en France. *Mammalia* 36, 112-119.

Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Truchetet, D., Musard, P., Toussaint, M., Stahl, P., Poule, M. L., Artois, M., Damange, J. P., & Quéré, J.P. 1992. Lande use patterns and types of common vole (*Microtus arvalis*) population kinetics. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 39, 153-169.

Dubey, J.P., & Beattie, C.P. 1988. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton.

Dubey, J.P., & Desmonts, G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal* 19, 337-339.

Dubey, J.P., Weigel, R.M., Siegel, A.M., Thuilliez, P., Kitron, U.D., Mitchell, M.A., Mannelli, A., Mateus-Pinilla, N.E., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., & Todd, K.S. 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in illinois. *Journal of Parasitology* 81, 723-729.

Frenkel, J.K., Ruiz, A., & Chinchilla, M. 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygyene* 24, 439-443.

Germain, E., Benhamou S., & Poulle M.L. Spatio-temporal sharing between the European wildcat (*Felis silvestris*), the domestic cat (*Felis catus*) and their hybrids. En cours de préparation.

Germain, E., Ruette, S., Léger, F., & Poulle M.L. Food habits of wildcats (*Felis s. silvestris* Schreber 1777), free-ranging domestic cats (*Felis catus* Linnaeus 1758) and their hybrids in France: are they in competition? En cours de préparation.

Giraudoux, P., Craig, P.S., Delattre, P., Bao, G., Bartholomot, B., Harraga, S., Quéré, J.P., Raoul, F., Wang, Y., Shi, D., & Vuitton, D. A. 2003. Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology* 127, S121-S131.

Hosmer, D.W., Hosmer, T., Le Cessie, S., & Lemeshow, S. 1997. A comparison of goodness of fit tests for the logistic regression model. *Statistics in Medicine* 16, 965-980.

Hurrell, J.W. 1995. Deacadal trends in the North Atlantic Oscillation: regional temperatures and precipitation. *Science* 269, 676-679.

Indelicato, N. 2000. Aspects biogéographiques de la distribution des micromammifères dans le Limousin (France). *Annales Scientifiques du Limousin* 11, 61-80.

Kijlstra, A., Meerburg, B.G., & Mul, M.F. 2004. Animal-friendly production systems may cause re-emergence of *Toxoplasma gondii*. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* 52, 119-132

Langton, S.D., Cowan, D.P., & Meyer, A.N. 2001. The occurrence of commensal rodents in dwellings as revealed by the 1996 English House Condition Survey. *Journal of Applied Ecology* 38, 699-709.

Lehmann, T., Graham, D.H., Dahl, E., Sreekumar, C., Launer, F., Corn, J.L., Gamble, H.R., & Dubey, J.P. 2003. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infection, Genetics and Evolution* 3, 135-141.

Leirs, H., Lodal, J., & Knorr, M. 2004. Factors correlated with the presence of rodents on outdoor pig farms in Denmark and suggestions for management strategies. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* 52, 145-161.

Lozano, J., Virgos, E., Malo, A.F., Huertas, D.L., & Casanovas, J.G. 2003. Importance of scrub-pastureland mosaic for wild-living cats occurrence in a Mediterranean area: implications for the conservation of the wildcat (*Felis silvestris*). *Biodiversity and Conservation* 12, 921-935.

Mouritsen, K.N., & Poulin, R. 2003. Parasitism, climate oscillations and the structure of natural communities. *Oikos* 97, 462-468.

Ottersen, G., Planque, B., Belgrano, A., Post, E., Reid, P.C., & Stenseth, N.C. 2001. Ecological effects of the North Atlantic Oscillation. *Oecologia* 128, 1-14.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

Randi, E., Pierpaoli, M., Beaumont, M., Ragni, B., & Sforzi, A. 2001. Genetic identification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*) and their hybrids using bayesian clustering methods. *Molecular Biology and Evolution* 18, 1679-1693.

Shannon, C.E., & Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. Urbana, IL: Illinois University Press.

Smith, K.E., Zimmermann, J.J., Patton, S., Beran, G.W., & Hill, H.T. 1992. The epidemiology of toxoplasmosis in Iowa swine farms with an emphasis on the roles of free-living mammals. *Veterinary Parasitology* 42, 199-211

Stahl P., & Léger F. 1992. Le chat sauvage (*Felis silvestris*, Schreber, 1777). *Encyclopédie des Carnivores de France* (ed. by M. Artois and H. Maurin), pp. 1-50. Société Française pour l'Étude et la Protection des Mammifères, Bohallard, Puceul.

Stenseth, N.C., Viljugrein, H., Jedrzejewski, W., Mysterud, A., & Pucek, Z. 2002. Population dynamics of *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*: seasonal components of density dependence and density independence. *Acta Theriologica* 47 S1, 39–67.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., & Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30, 1217-1258.

Turner, D.C., & Bateson, P.B. 2000. The Domestic Cat. The Biology of its Behaviour. Cambridge University Press.

Warner, R.E. 1985. Demography and movements of free-ranging domestic cats in rural areas Illinois. *Journal of Wildlife Management* 49, 340-346.

Weigel, R.M., Dubey, J.P., Siegel, A.M., Kitron, U.D., Mannelli, A., Mitchell, M.A., Mateus-Pinilla, N.E., Thuilliez, P., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., & Todd, K.S. 1995. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *Journal of Parasitology* 81, 736-741

Weigel, R.M., Dubey, J.P., Dyer, D., & Siegel, A.M. 1999. Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms in illinois. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 793-798.

Yamaguchi, N., Macdonald, D.W., Passanisi, W.C., Harbour, D.A., Hopper, C.D. 1996. Parasite prevalence in free-ranging farm cats, *Felis sivestris catus*. *Epidemiology and Infection* 116, 217-223.

3.6. Conclusions

3.6.1. Niveaux d'infection chez les hôtes intermédiaires :

La longévité, la superficie du domaine vital et les besoins énergétiques sont, chez les mammifères, liés à la masse corporelle (Degen et al., 1998 ; Speakman, 2005 ; Ottaviani et al., 2006). Or, ces paramètres peuvent eux-mêmes expliquer des différences interspécifiques d'exposition au parasite. Les différences de niveau de prévalence observées par exemple entre la souris domestique (0 à 2%) et le rat brun (0 à 10%) pourraient ainsi s'expliquer par la différence de masse corporelle entre ces deux rongeurs (20.5g contre 280g ; Ernest, 2003). De plus, d'autres facteurs, comme le milieu et le mode de vie, peuvent expliquer les variations du niveau de prévalence constatées d'une population à l'autre de micro-mammifères. Nous avons montré que des espèces prairiales comme le campagnol terrestre ou la taupe européenne peuvent montrer des niveaux de prévalence supérieurs à ceux observés chez les micro-mammifères vivant en forêt (chapitre 3.2). Ces deux espèces ont une masse corporelle plus importante que celle des micro-mammifères trouvés habituellement en forêt (120 - 133 g ; Ernest, 2003), et sont aussi des espèces fouisseuses. Il est possible que leurs mœurs souterraines les exposent davantage aux oocystes de *T. gondii* que des espèces vivant à la surface du sol. Le mode de vie, le comportement, ainsi que l'habitat des espèces déterminent ainsi leur niveau d'infection. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Carme et al. (2002) et De Thoisy et al. (2003) qui ont montré que le niveau d'infection était plus important chez les espèces vivant au sol que chez les espèces arboricoles.

L'étude menée dans les Ardennes est, à notre connaissance, la première investigation de la séroprévalence chez la taupe européenne. Cette espèce est néanmoins intéressante pour la compréhension de la contamination de l'environnement par les oocystes de *T. gondii*, puisqu'elle se nourrit en grande partie de lombrics, hôtes paraténiques pouvant contenir des oocystes et contribuer à leur dissémination spatiale (Ruiz & Frenkel, 1980 ; Bettiol et al., 2000). Sur seulement 18 taupes piégées, la séroprévalence estimée était déjà importante

(39%), et comparable à celle que l'on pourrait trouver chez des individus consommant régulièrement des proies contaminées. Ces données suggèrent que, d'une part, les lombrics pourraient effectivement contenir et disséminer des oocystes en conditions naturelles et, d'autre part, que les taupes pourraient présenter des risques importants d'exposition au parasite en consommant ces lombrics. Durant ce travail de thèse, plusieurs récoltes de lombrics ont été entreprises sur les lieux où des taupes avaient été piégées et trouvées positives à *T. gondii* (méthode d'échantillonnage au formol ; Raw, 1959). Malheureusement, de la terre étant restée en quantité dans le corps des lombrics, ni les PCR (problèmes d'inhibiteurs) ni les inoculations sur souris (décès des souris dû aux débris contenus dans les échantillons) n'ont pu permettre d'isoler le parasite. La détection du parasite chez le lombric reste à mettre au point mais pourrait être d'un intérêt majeur pour la compréhension de la dynamique de la transmission de *T. gondii* puisque lombrics et taupes peuvent être occasionnellement consommés par le chat (Artois et al., 2002) et constituer un risque spécifique d'exposition au parasite.

Enfin, la relation entre prévalence et masse corporelle prend une importance particulière dans le cas des lagomorphes. Chez le chat domestique, le lapin de garenne occupe une place importante du régime alimentaire quand il est présent en abondance (Turner & Bateson, 2000 ; Artois et al., 2002). Dans les îles Kerguelen, il peut constituer jusqu'à 90% du régime alimentaire des chats (Pontier et al., 2002). Chats domestiques et forestiers semblent même devenir spécialistes et consommer en grande majorité des lapins dans les zones où ceux-ci sont présents (Turner & Bateson, 2000 ; Malo et al., 2004). La consommation de lagormorphes représente pour le chat un risque plus important d'acquérir la toxoplasmose que celle de petits mammièfres, leur masse corporelle étant plus importante. A Kerguelen, nous avons montré que la prévalence était plus élevée dans les sites où les chats domestiques féraux consommaient essentiellement des lapins, que dans les sites où les chats consommaient en partie égale lapins, souris et oiseaux.

3.6.2. Différentes échelles de variabilité chez l'hôte définitif

D'une sous-espèce à l'autre

La prévalence de *T. gondii* est peu connue chez le chat forestier, et elle n'est estimée que sur des effectifs restreints (McOrist et al., 1991 ; Sobrino et al., 2007). Notre étude (chapitre 3.5) a permis d'estimer la séroprévalence chez cette espèce à partir d'un échantillon de 71 individus récoltés dans le grand quart Nord-Est de la France et nous avons montré qu'elle peut être élevée (64%). Bien que leur régime alimentaire soit essentiellement constitué de micro-mammifères, les chats domestiques dépendant de l'homme consomment également de la nourriture pour animaux et des restes de cuisine (Biró et al., 2005) et pourraient donc être moins exposés au parasite que les chats forestiers. Nos travaux n'ont cependant pas mis en évidence une différence de séroprévalence entre les chats féraux et les chats forestiers (chapitre 3.5), suggérant que chats féraux et forestiers ont les mêmes facteurs de risque quand ils vivent dans le même milieu. Toutefois, cette comparaison n'a été faite qu'avec un petit nombre de chats féraux (N = 29) collectés sur une zone géographique large.

D'une population à l'autre

Il semblerait que dans les environnements où les hôtes intermédiaires sont abondants, au moins la moitié des chats échantillonnés portent des anticorps et ont donc rencontré le parasite. Chez l'hôte définitif, la variabilité du niveau d'exposition au parasite est directement reliée à la composition locale de l'environnement (composition du paysage, importance de l'activité anthropique, etc…). C'est cette composition qui conditionne la distribution et l'abondance spatio-temporelle des hôtes intermédiaires : à Kerguelen, les sites où le lapin est présent en abondance constituent un risque particulier pour le chat domestique ; en milieu rural, le nombre de fermes présent dans une commune influence le niveau d'exposition des chats domestiques et forestiers vivant indépendamment de l'homme.

En milieu rural, les chats domestiques qui vivent dans les fermes (chapitre 3.4) montrent des séroprévalences plus fortes que ceux qui vivent à l'intérieur du village. Les

zones où l'activité agricole est importante peuvent comporter des surfaces de prairies permanentes importantes et être le lieu d'épisodes de pullulations de rongeurs prairiaux (Delattre et al., 1992) et surtout, les fermes elles-mêmes constituent des foyers propices à la propagation de la toxoplasmose. Cette conduite paysagère pourrait avoir un impact direct sur le niveau d'exposition des populations de chats. La surface de prairie associée aux exploitations agricoles peut permettre la rencontre entre les chats et des hôtes intermédiaires fouisseurs, qui montrent des prévalences élevées. Au contraire, les zones où la végétation est laissée à l'abandon, favorisant son recouvrement par des buissons, pourraient favoriser l'installation de lapins de garenne (Calvete et al., 2004), exposant également les populations de chats à un risque particulier. Resterait à apporter plus de précision sur les chats de ferme et de maison pour déterminer leurs circonstances de contamination.

D'un individu à l'autre

Le mode de vie des chats explique en partie leur niveau d'infection (chapitre 3.4) : les chats vivant à l'intérieur de la maison de leur propriétaire et n'étant pas autorisés à sortir sont moins souvent positifs que les chats vivant librement. Bien que cette tendance soit généralement expliquée par le fait que les chats errants chassent plus et ont donc plus de chances de consommer une proie infectée que les chats vivant chez leur propriétaire et nourris par eux, il ne faut pas négliger l'importance de l'exposition des chats aux oocystes de *T. gondii*, qui peuvent représenter une part de la contamination des chats errants. Même si la transmission par les oocystes est peu efficace chez le chat (Dubey, 2006), elle peut représenter un risque d'exposition, notamment lorsque les chats utilisent des zones communes de défécation.

De plus, les chats peuvent former des groupes organisés autour d'une ou plusieurs femelles et de leurs petits lorsque les ressources sont distribuées de manière hétérogène (Macdonald, 1983 ; Turner & Bateson, 2000). Nous avons montré en milieu rural (chapitre 3.4) que les chats vivant dans des groupes sociaux avec des juvéniles avaient plus de chance de séroconvertir que les chats vivant seuls ou dans des groupes sans juvéniles. Le fait que les chats vivent en groupe peut augmenter leurs chances d'être en contact avec les fèces de leurs congénères et ainsi d'être exposés à la contamination par les oocystes (Yamaguchi et al., 1996). On peut également penser que l'existence d'un groupe de chats vivant à un endroit

donné augmente les chances de transmission du parasite depuis l'environnement aux hôtes intermédiaires, contribuant à infecter à leur tour les chats non encore atteints. Les sites où vivents les grands goupes sociaux contenant beaucoup de chatons sont aussi les sites propices à l'installation de ces groupes, notamment les sites où se trouvent de nombreuses proies. On peut donc aussi penser que le nombre de jeunes dans un groupe reflète la disponibilité en proies, et donc un risque spécifique d'exposition au parasite.

Il est intéressant de noter que la présence de juvéniles dans le groupe social est un facteur de risque, même si la probabilité de séroconvertir ne dépend pas de l'âge des chats. En effet, il doit se produire moins de séroconversions dans la classe la plus âgée d'une population de chats puisque au moins une partie des individus de cette classe a probablement déjà séroconverti. Une population constituée essentiellement de jeunes individus et ayant un renouvellement régulier (par exemple la population de Saint-Just-Chaleyssin, chapitre 3.4), représente donc un risque de contamination environnementale plus important qu'une population plus stable ayant beaucoup d'individus immunisés.

Enfin, la variabilité du risque d'acquisition de l'infection chez le chat pourrait dépendre d'autres facteurs que nous n'avons pas étudiés : par exemple, le statut social des mâles (les mâles dominants peuvent entrer en contact directement ou indirectement – via les zones de marquage – avec davantage d'individus que les subordonnés), le statut reproducteur des femelles (les femelles reproductrices ayant des besoins énergétiques plus important pendant la gestation et l'allaitement), le statut immunitaire, ainsi que des co-infections par d'autres maladies.

3.6.3. Variabilité du climat et toxoplasmose féline

Le niveau d'infection chez le chat domestique et le chat forestier est sensible aux variations de climat. En effet, les années caractérisées par des températures clémentes et/ou une forte pluviométrie augmentent la probabilité pour un chat de séroconvertir (chapitre 3.4) ou d'avoir des anticorps (chapitre 3.5). Dans un premier temps, nous avons utilisé des variables reflétant le climat local dans trois populations rurales (chapitre 3.4) : pluviométrie moyenne sur l'année, et valeur maximale de température observée dans une décade sur l'année. Mais la variabilité du climat peut également être considérée à une échelle plus large :

celle de l'index NAO, qui mesure les différences de pression atmosphérique entre l'anticyclone des Açores et l'Islande (Hurrell, 1995). Dans notre étude regroupant chats forestiers et domestiques dans le grand quart Nord-Est de la France (chapitre 3.5), nous avons montré que les prévalences les plus élevées correspondent aux années pour lesquelles l'indice était élevé et, donc, caractérisées par un hiver doux et pluvieux. Que ce soit pour les variables climatiques locales (températures ou pluviométries mesurées dans les stations météorologiques les plus proches) ou globales (NAO), les variations du climat expliquaient largement les variations inter-annuelles du niveau d'infection dans les différentes populations de chats étudiées.

Ces résultats suggèrent que le cycle du toxoplasme est sensible aux conditions de température et d'humidité nécessaires à la sporulation et/ou la survie des oocystes. En laboratoire, les oocystes de *T. gondii* survivent peu de temps à des périodes de forte chaleur et de dessication (Frenkel et al., 1975). Il n'est pas impossible que lors d'années particulièrement chaudes, la survie des oocystes soit affectée, réduisant le risque de contamination pour les hôtes intermédiaires ou définitifs. Le climat local peut également être responsable de la fluctuation de l'abondance des hôtes intermédiaires, ceux-ci étant plus abondants lors des années clémentes (Ottersen et al., 2001), comme c'est le cas par exemple pour les campagnols roussâtres ou les mulots à collier (Stenseth et al., 2002) ou pour le lapin de garenne (Calvete et al., 2004). Si l'hypothèse d'un lien entre la séroprévalence chez le chat et le climat a été évoquée (Nogami et al., 1998), aucune étude ne l'avait jusqu'ici mise en évidence.

Enfin, nos résultats suggèrent que la survie des oocystes pourrait être meilleure durant les hivers doux, évoquant un effet possible de la saison sur la séroprévalence chez les hôtes. Des études expérimentales sur la survie des oocystes pourraient apporter des informations supplémentaires sur le risque de contamination des hôtes en fonction du climat.

3.6.4. Conclusions

D'une façon générale, les séroprévalences estimées dans les populations rurales et insulaires étudiées étaient plus élevées que dans la population urbaine des chats de l'hôpital la Croix-Rousse à Lyon. Le fait que le parasite puisse non seulement se transmettre du chat à

l'environnement et de l'environnement au chat (comme c'est probablement le cas à la Croix-Rousse) mais aussi via les hôtes intermédiaires (comme c'est le cas sur nos autres terrains d'étude), entraîne une optimisation du cycle, avec des niveaux de séroprévalence élevés chez le chat. Elle entraîne également des niveaux de variabilité supplémentaires dans tous les compartiments du cycle.

Quatrième partie

Discussion générale

« Toute certitude est par essence contradictoire avec la philosophie de la recherche. »

Pierre Joliot

4.1. Limites de l'étude et améliorations

4.1.1. Constitution et représentativité des échantillons de chats

Nos travaux ont visé à étudier les populations de chats dans leur milieu de vie habituel, afin d'estimer la dynamique de propagation de *T. gondii* au plus proche des conditions naturelles. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à constituer des échantillons représentatifs des populations naturelles, que ce soit dans la structure d'âge ou de sexe, comme pour ce qui est des modes de vie.

Nos efforts de standardisation de l'échantillonnage ont cependant pu être en partie biaisés par des différences individuelles de probabilité de capture : en milieu rural, les chats de propriétaire ont été attrapés à la main et parfois piégés. Certains chats de propriétaire ou errants ont pu échapper aux sessions de capture, alors qu'ils pourraient représenter des individus ayant un profil à risque pour la toxoplasmose car ils ont accès au milieu extérieur. De plus, les chats les plus jeunes, qui sont plus naïfs et qui rentrent plus facilement dans un piège appâté que les chats plus vieux et plus méfiants, sont souvent les plus faciles à capturer. Ceci a pu résulter dans la constitution d'échantillons de chats jeunes, qui sont généralement les moins souvent infectés par la toxoplasmose. Cependant, compte tenu de la forte efficacité de piégeage obtenue dans les différentes populations de chats (50 à 90% des chats capturés selon les sessions ; Courchamp, 1996) et de la bonne représentativité par rapport à la structure d'âge et la sex-ratio (Fromont, 1997), nous estimons avoir analysé des échantillons représentatifs des populations étudiées.

4.1.2. Périodes de réalisation des sessions de captures

Dans les populations rurales, les chats domestiques ont été capturés une fois par an (en avril à Aimargues, en juillet à Saint-Just-Chaleyssin, et en septembre à Barisey-La-Côte). Sur le site de l'hôpital de la Croix-Rousse à Lyon, les chats ont été capturés deux fois par an (avril/juin et septembre/octobre), et enfin à Kerguelen, des sessions de captures ont été organisées en continu pendant l'année. Le fait d'échantillonner les populations toujours à la même période de l'année permet de pouvoir comparer les séroprévalences d'une année sur l'autre, mais ne permet pas d'étudier les variations saisonnières de séroprévalence. Cependant, différents paramètres sont sensibles aux variations saisonnières, comme la dynamique des populations de rongeurs (Delattre et al., 1999 ; Stenseth et al., 2002), ou la survie des oocystes (Frenkel et al., 1975 ; Dubey, 1998b). Thevenet et al. (2004) ont ainsi observé que la présence de parasites et notamment d'oocystes de *T. gondii* dans le sol dans des jardins publics en Argentine est plus importante au printemps que durant les autres saisons. La prévalence différait entre les populations de chats de Saint-Just-Chaleyssin et Barisey-La-Côte, qui ont été échantillonnées à différentes périodes de l'année (chapitre 3.4). Il est possible que durant le printemps et l'automne, la survie des oocystes soit favorisée par des températures douces et des épisodes pluvieux, qui pourraient entraîner un risque d'exposition plus important pour les hôtes, que lorsque les températures sont plus contrastées (très chaude durant l'été, ou très froides durant l'hiver). L'investigation de la présence des oocystes et de la contamination des hôtes au fil de l'année reste donc à entreprendre.

4.1.3. Méthode sérologique

Nous avons évoqué la bonne sensibilité et la bonne spécificité du test d'agglutination directe modifié, mais il s'avère cependant qu'aucun test sérologique n'est actuellement capable de révéler le statut sérologique d'un animal pour la toxoplasmose avec une fiabilité de 100% : la sensibilité et la spécificité du test utilisé se place autour de 80 à 90 % (Dubey et al., 1995c ; 1995d). En effet, *T. gondii* a déjà été isolé par bio-essai chez des chats, des poulets ou des souris séronégatifs, et l'existence de faux-séropositifs a déjà été évoquée (Dubey et al., 1995c ; 2003c). Cependant, dans nos études sur les populations de chats domestiques, une

partie des individus a été testé plusieurs fois à plusieurs mois ou années d'intervalle. Ces mesures nous ont permis de vérifier la cohérence du profil sérologique de chaque chat, c'est-à-dire, par exemple, de vérifier qu'un chat séropositif le reste au cours de sa vie. Nous pouvons estimer que le risque de faux-positifs et de faux-négatifs était négligeable dans ce contexte. De plus, ce problème ne serait important que si la proportion de faux positifs ou faux négatifs n'était pas constante d'une catégorie à l'autre, mais nous n'avons pas d'indication dans ce sens.

Par ailleurs, le choix du seuil de positivité a pu poser un problème dans l'interprétation du statut sérologique des individus testés : en considérant les animaux positifs à partir du titre 40, nous avons pris le risque de ne pas prendre en compte les individus réellement positifs au titre 20, et de sous-estimer la séroprévalence. Nous avons montré dans l'étude sur la population de chats domestiques de la Croix-Rousse que la séroprévalence différait sensiblement selon qu'on considère le titre 20 (25.3%) ou le titre 40 (18.6%), mais restait dans un ordre de grandeur inférieur à celui des autres populations étudiées. De plus, l'emploi du seuil 40 rend difficile la comparaison de la séroprévalence des populations étudiées avec celles de la littérature, généralement données au seuil 20 quand le test d'agglutination direct modifié est utilisé pour la recherche d'anticorps. Nous avons cependant considéré ce choix comme pertinent car, d'une part, il permet de nous affranchir des résultats faux-positifs et d'autre part, il est basé sur la réponse immunitaire de chats à long terme et sa concordance a été vérifiée chez tous les individus testés plusieurs fois. Il serait souhaitable que les études de la séroprévalence de la toxoplasmose chez les différents hôtes soient comparables entre elles et pour cela utilisent toutes le même test avec le même seuil de positivité, ou donnent leurs résultats avec plusieurs seuils.

4.1.4. Durée de l'étude

Dans le cadre des études épidémiologiques sur la toxoplasmose chez le chat domestique, nos travaux ont apporté des données originales d'un suivi à long terme de plusieurs populations de chats suivies par la même équipe (10 à 14 ans suivant les populations). Jusqu'ici, le plus long suivi décrit dans la littérature avait été effectué durant 7 ans sur une population urbaine de chats domestiques au Brésil (Silva et al., 2002).

Ces durées de suivis ont permis de montrer qu'il existe une forte variabilité inter-annuelle de la prévalence de la toxoplasmose chez le chat domestique, sauf à Kerguelen, et de mettre en évidence un lien entre cette variabilité et les conditions météorologiques. De plus, comme l'espérance de vie d'un chat domestique en milieu rural est de trois ans pour un mâle et quatre ans pour une femelle (Legay & Pontier, 1983 ; Pontier, 1984), une période de suivi d'au moins cinq ans permet de connaître l'évolution du titre d'anticorps des individus tout au long de leur vie, le moment de leur séroconversion ou la variabilité de caractéristiques individuelles.

Cependant, une capture annuelle (ou bisannuelle à Lyon) n'a permis d'estimer qu'une valeur de séroprévalence par an, et donc d'obtenir au mieux moins d'une quinzaine de valeurs pour la période d'étude la plus longue (14 ans de suivi à Saint-Just-Chaleyssin). La durée des suivis de population de chats a parfois limité l'étude de la variabilité du niveau la séroprévalence, notamment celle de l'effet des variations climatiques. Nos travaux permettent cependant de supposer que les variations du climat local ou global influencent la survie des oocystes et le niveau de prévalence des hôtes, sans toutefois estimer précisément ces effets, ni prédire l'évolution de cette relation. En général, les études qui associent les variations interannuelles du climat avec une réponse biologique s'étendent sur plus de 20 ans, comme par exemple les études de capture-marquage-recapture chez des ongulés de montagne, qui relient la dynamique de leurs populations aux variations climatiques (Loison et al., 1999). Dans notre cas, une telle durée permettrait probablement de mieux estimer l'impact de chaque facteur (notamment humidité et température) sur la dynamique de l'infection. Cependant, la dynamique de l'infection pourrait varier à long terme suivant d'autres paramètres (comme la dynamique des populations d'hôtes) si bien que comme dans toute étude observationnelle, les conclusions pourraient être difficilement interprétables. Notre suivi met donc surtout en évidence la nécessité de mieux connaître la survie des oocystes, y compris de manière expérimentale.

4.1.5. Analyse des données

L'immunité contre *T. gondii* persistant plusieurs années et probablement à vie chez le chat (Chapitre 2.2), le statut sérologique d'un individu présentant des anticorps n'est pas indépendant d'une année sur l'autre. C'est pourquoi nous avons choisi d'inclure dans

l'analyse de la séroprévalence chez le chat un prélèvement pris au hasard par individu. Ceci nous a permis d'analyser, par régression logistique, la probabilité d'avoir des anticorps pour la totalité des animaux capturés.

En faisant le choix de ne prendre en compte qu'une seule prise de sang par chat, nous avons pris le risque de perdre l'information apportée par les autres prises de sang effectuées au cours de sa vie. Par ailleurs, dans notre étude sur les chats en milieu rural (chapitre 3.4), nous avons uniquement considéré, parmi tous les individus capturés, les individus ayant séroconverti et ceux n'ayant pas présenté d'anticorps durant toute leur durée de suivi. Ceci a donc fortement réduit la taille de notre échantillon (les individus porteurs d'anticorps au moment de leur première capture, ou ceux ayant été capturés une seule fois ont été exclus de l'analyse). Nous avons cependant dû faire ces choix d'analyse des données récoltées car il n'existe actuellement pas de technique statistique adaptée pour étudier l'ensemble des suivis de chaque individu, en considérant les données censurées par intervalle et la non-indépendance des données d'une année sur l'autre. Le développement actuel des méthodes d'analyse de données épidémiologiques issues de capture-marquage-recapture laisse présager que des analyses complémentaires pourront être envisagées dans le futur.

4.2. Environnement et variabilité du cycle de *Toxoplasma gondii* : principaux résultats des travaux

La figure 4.1 résume les différents facteurs susceptibles d'influencer la transmission de *T. gondii* à l'échelle populationnelle : de nombreux facteurs entrent en jeu à plusieurs niveaux d'organisation. Les travaux réalisés dans cette thèse, axés sur les relations entre les différents hôtes et l'environnement, ont permis de caractériser la variabilité de la transmission du parasite.

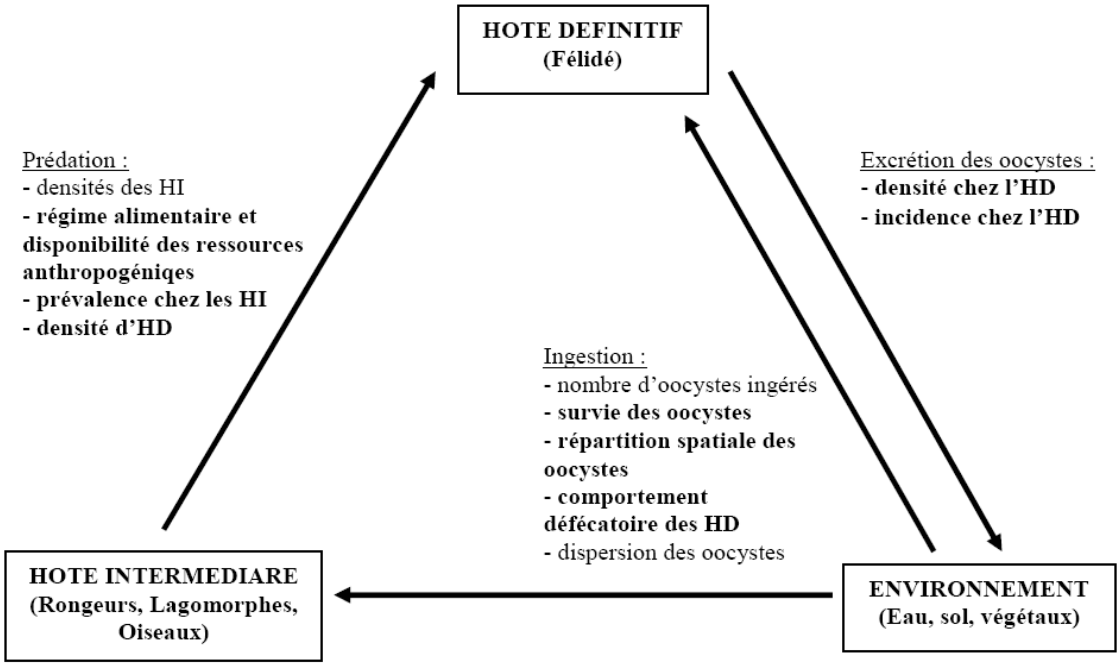


Figure 4. 1. Facteurs influençant le cycle de transmission de *Toxoplasma gondii*. Les facteurs étudiés dans ce mémoire sont indiqués en gras. HD : hôte définitif, HI : hôte intermédiaire (modifié d'après Raoul, 2001).

4.2.1. Variabilité de la toxoplasmose chez les hôtes intermédiaires

L'éventail des hôtes intermédiaires de *T. gondii* est constitué par une faune variée vivant dans des habitats contrastés. A ce titre, quand les hôtes intermédiaires constituent une proie des hôtes définitifs, différentes espèces ne représentent pas le même risque de contamination pour l'hôte définitif. Chez les rongeurs et les lagomorphes, la prévalence des anticorps anti-*T. gondii* pourrait varier selon trois facteurs principaux : la masse corporelle, l'habitat, et la sensibilité (Figure 4.2). Dans ce mémoire, nous avons abordé les deux premiers facteurs en comparant les prévalences retrouvées entre différentes espèces et entre différents habitats. D'autres facteurs, dont l'organisation sociale, la densité, ou encore l'efficacité de la transmission verticale du parasite, qui pourraient également influencer le niveau d'infection spécifique des rongeurs et lagomorphes, n'ont pas été étudiés dans nos travaux.

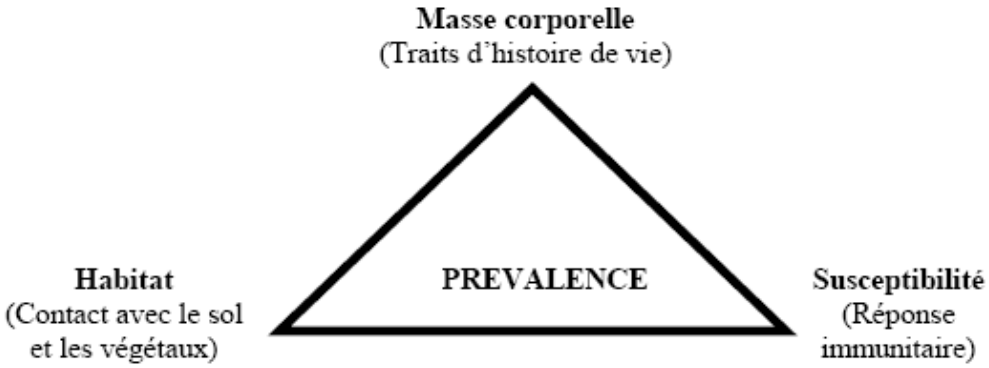


Figure 4.2. Facteurs déterminant la prévalence chez les hôtes rongeurs et lagomorphes de *Toxoplasma gondii* à l'échelle de l'espèce.

La masse corporelle des proies comme indicateur de risque de la contamination des prédateurs

Chez les mammifères, la masse corporelle est liée à de nombreux traits d'histoire de vie comme la morphologie, la physiologie et l'écologie des espèces (Lindstedt et al., 1986). Par exemple, le volume du cœur et sa fréquence de contraction, le temps de passage des aliments à travers les intestins, ou le temps nécessaire pour atteindre la maturité sexuelle sont directement reliés à la masse corporelle chez tous les mammifères (Blueweiss et al., 1978 ;

Western, 1979). Certains paramètres peuvent expliquer l'exposition à des parasites. Chez les rongeurs et les lagomorphes, notamment, la masse corporelle est corrélée à la superficie du domaine vital, aux besoins énergétiques et à la longévité (Degen et al., 1998 ; Speakman et al., 2005 ; Ottaviani et al., 2006). Ces paramètres reflètent un risque important d'exposition à des parasites si la masse corporelle est élevée : si le domaine vital, les besoins énergétiques et la longévité sont importants, l'animal parcoure plus de distance, consomme plus de végétaux et accumule plus de risques de rencontrer le parasite avec l'âge, en comparaison avec des animaux de petite taille. La relation entre prévalence et masse corporelle nous a permis de prédire une différence dans le niveau de prévalence de chats domestiques harets des îles Kerguelen vivant sur différents sites et ayant un régime alimentaire différent : les chats qui consommaient le plus de lapins de garenne (90% dans certains cas) avaient une prévalence plus élévée que les chats consommant en même quantité des lapins, des souris et des oiseaux.

Des niveaux élevés de prévalence pourraient se retrouver chez le chat domestique dans des environnements où il consomme beaucoup plus de lapin de garenne que de micromammifères. C'est le cas en Australie où la présence de lapins peut être relevée dans 90% des fèces de chats domestiques analysées (Fitzgerald & Karl, 1979 ; Coman & Brunner, 1972). D'une façon générale, le lapin de garenne constitue également une proie importante des chats domestiques dans les îles sub-antarctiques où les deux espèces ont été introduites : Ile Macquarie (Jones, 1977), ou Ile aux cochons dans l'archipel des Crozets (Derenne & Mougin, 1976). En Europe, les paysages offrant des surfaces importantes de broussaille peuvent également favoriser une réponse fonctionnelle des chats domestiques et forestiers à l'abondance de lapins, les exposant potentiellement au parasite (Lombardi et al., 2003 ; Calvete et al., 2004 ; Malo et al., 2004). Dans ces situations, et si les autres facteurs qui interviennent sur le cycle restent inchangés, à une très forte incidence de toxoplasmose pourrait être observée chez le chat.

En plus de la masse corporelle, la prévalence chez les lagomorphes peut également dépendre de la sensibilité des espèces au parasite. Par exemple, le lièvre variable (*Lepus timidus*), qui a une masse corporelle deux fois plus importante que le lapin de garenne (en moyenne 3Kg contre 1,5Kg, respectivement ; Ernest, 2003), est aussi plus sensible au parasite que ce dernier : après avoir ingéré 50 oocystes, les lièvres développent des signes cliniques sévères avec notamment atteinte des intestins, tandis que les lapins ne manifestent aucun signe clinique (Gustafsson et al., 1997). Les mécanismes immunitaires sont encore peu connus, mais il semblerait que la réponse immuntaire du lièvre soit insuffisante pour limiter la multiplication et la dissémination de *T. gondii* dans les tissus des intestins (Gustafsson et al.,

1997). Reste à savoir si cette sensibilité déboucherait sur un rôle accru du lièvre en tant qu'hôte intermédiaire (ce serait le cas s'il s'infecte plus facilement avec des oocystes) ou au contraire sur un rôle moindre (ce serait le cas si les lièvres meurent rapidement à la suite d'une infection). Les études épidémiologiques disponibles dans la littérature apportent des informations contradictoires : dans une étude conduite sur le lièvre d'Europe en Allemagne, Frölich et al. (2003) rapportent une séroprévalence de 46% (N = 318), qu'ils relient à la présence potentielle dans l'environnement d'oocystes contaminant pour cet hôte. Cependant, Gustafsson & Uggla (1994) rapportent une séroprévalence de 0% (N = 176) dans des zones agricoles de Suède, et la relient à la forte incidence de toxoplasmose aiguë trouvée chez cet animal en laboratoire : les lièvres pourraient mourir rapidement suite à l'infection, c'est pourquoi on retrouve peu d'individus ayant des anticorps dans certaines études en milieu naturel. L'étude de la séroprévalence chez le lièvre gagnerait donc à être approfondie afin de mieux déterminer le rôle de cet hôte dans la transmission de *T. gondii*.

Des habitats différemment contaminés ?

D'autres éléments permettent d'apporter une nuance à la relation entre masse corporelle et prévalence d'anticorps anti-*T. gondii* chez les hôtes intermédiaires rongeurs. En effet, à masse corporelle similaire, l'habitat et le mode de vie peuvent déterminer des risques variables d'exposition au parasite.

En effet, nous avons montré, grâce à des sessions de piégeage de micromammifères conduites dans des milieux de forêt et de prairie dans les Ardennes, que les micromammifères capturés en prairie étaient plus souvent porteurs d'anticorps anti-*T. gondii* que ceux capturés en forêt (chapitre 3.2). Dans notre échantillon, les milieux de prairie étaient caractérisés par des espaces ouverts utilisés en prairie de fauche ou en pâture, de telle sorte que les micromammifères présents étaient, à l'exception de quelques captures de campagnol des champs, essentiellement des campagnols terrestres et des taupes européennes, tous deux fouisseurs et capturés dans leurs galeries souterraines. Il est possible que ces espèces, dont le contact avec le sol est accentué par le fait qu'elles creusent des galeries et ingèrent de la terre, aient plus de chance de rencontrer un oocyste de *T. gondii* que les espèces capturées en forêt (essentiellement des mulots et des campagnols roussâtres), qui vivent à la surface du sol (Le Louarn & Quéré, 2003). La rencontre avec les oocystes de *T. gondii* pourrait être encore plus

fréquente chez la taupe (*Talpa europaea*) dont le régime alimentaire est constitué par une part importante de lombrics (Castien & Gosalbez, 1995), qui sont des hôtes paraténiques de *T. gondii* pouvant probablement transporter le parasite sur de grandes distances (Lavelle, 1988).

La différence de séroprévalence observée chez les micromammifères de prairie et de forêt pourrait également être expliquée par une contamination différente de ces habitats par les chats. En effet, l'utilisation de l'habitat par les chats n'est pas homogène (Turner & Bateson, 2000), notamment dans leur comportement défécatoire, qui peut déterminer la contamination spatiale du sol par les oocystes de *T. gondii*. Les chats fréquentent préférentiellement le milieu ouvert pour la chasse des micromammifères de prairie (Liberek, 1999 ; Artois et al., 2002). Le comportement défécatoire des chats en fonction du type de milieu a été peu étudié : Liberek (1999) observe que les fèces de chats forestiers sont souvent présentes en lisière de forêt. Il est possible que le milieu ouvert, fréquenté régulièrement par les chats domestiques et les chats forestiers, représente un risque particulier d'exposition aux oocystes de *T. gondii*. Cette différence entre habitats est observée chez d'autres parasites : dans le cas d'*Echinococcus multilocularis*, le milieu de lisière entre forêt et prairie est particulièrement favorable à la rencontre entre les œufs du parasite et les hôtes intermédiaires, et les renards (hôtes définitifs) ont une prévalence plus importante quand le paysage dans lequel ils vivent est composé d'une plus large proportion de prairies que de forêts (Guislain, 2006 ; Guislain et al., 2007).

Enfin, les fermes d'élevage peuvent constituer un habitat spécifique car elles sont habitées par des rongeurs commensaux, comme la souris domestique et le rat brun (Le Louarn & Quéré, 2003). De récentes études ont montré que ces rongeurs ont des prévalences particulièrement élevées dans les fermes d'élevage (Dubey et al., 1995c ; Lehmann et al., 2003). L'abondance de ces rongeurs entraîne généralement les fermiers à tolérer la présence de chats qui permettent leur contrôle (Turner & Bateson, 2000). Ainsi, les bâtiments de la ferme représentent des sites d'importance primordiale dans les déplacements des chats de fermes, qui ne quittent qu'occasionnellement la ferme et chassent dans les bâtiments et les prairies adjacentes (Weber & Daily, 1998 ; Barratt, 1997). La contamination de l'environnement par les oocystes de *T. gondii* dans les fermes doit donc être très concentrée dans ce type de milieu, autour des bâtiments et dans les prairies environnantes. Elle pourrait être favorisée par la présence de boues ou de zones ombragées dans les fermes, ou par la dissémination qu'apportent les animaux d'élevage en piétinant le sol et en se déplaçant dans les prairies (Lehmann et al., 2003). Les fermes pourraient donc constituer des réservoirs de *T. gondii* dans l'environnement rural (Weigel et al., 1995 ; 1999 ; Lehmann et al., 2003).

En fonction du type d'habitat, les communautés de rongeurs et de chats seront donc déterminantes pour la contamination de l'environnement (Figure 4.3). En milieu rural, les différents types d'habitat pourraient être contaminés de manière différente, et exposer différents types de chats à la contamination : au niveau des habitations et des fermes, le risque de contamination pourrait être maximal pour les chats domestiques des fermes qui dépendent plus ou moins de l'homme pour se nourrir, alors que les chats féraux et les chats forestiers sont exposés au parasite dans différents milieux, allant de la prairie au milieu forestier.

A la suite de nos travaux, il apparaît nécessaire de mieux mesurer la contamination environnementale par *T. gondii* en milieu rural, ainsi que ses déterminants et ses conséquences sur la contamination des hôtes. Il serait notamment intéressant de vérifier que les fermes constituent des sites de contamination préférentiels, et si les milieux de prairie sont plus contaminés par les oocystes de *T. gondii* que les milieux forestiers. Ces informations pourraient permettre de savoir si la contamination environnementale explique, en plus de leur masse corporelle, les différences dans les niveaux de prévalence chez les hôtes intermédiaires, ou s'il faut chercher d'autres facteurs, comme par exemple un comportement particulier des rongeurs (par exemple une préférence pour des zones particulières dans les prairies, utilisés également par les chats pour la défécation).

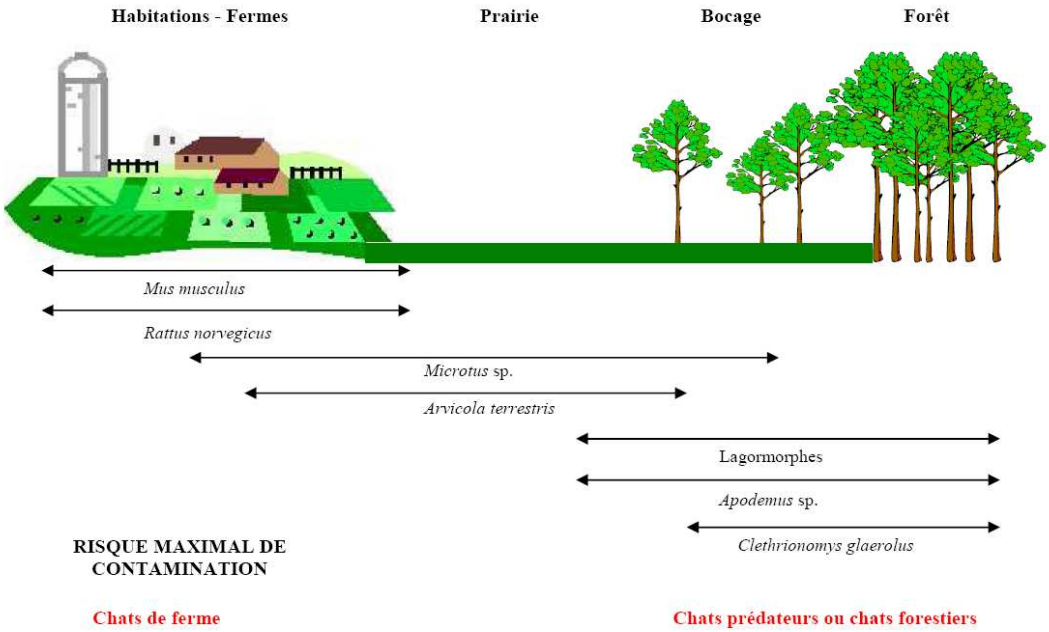


Figure 4. 3. Répartition des hôtes intermédiaires en milieu rural et zones de risque maximal d'infection à *Toxoplasma gondii* pour les chats domestiques et les chats forestiers (modifié d'après Le Louarn & Quéré, 2003).

4.2.2. Environnement et variabilité de la contamination chez le chat domestique

Nos travaux ont permis d'estimer la prévalence et l'incidence de la toxoplasmose chez le chat domestique dans des populations naturelles de chats vivant dans des sites variant selon un gradient décroissant d'urbanisation. La prévalence des anticorps anti-*T. gondii* chez le chat domestique dépend du milieu de vie de la population, et de la part de ressources anthropogéniques dans son régime alimentaire (Tableau 4.1).

En effet, les chats domestiques qui consomment le plus de ressources anthropogéniques sont ceux qui montrent la prévalence la plus faible (18,6% dans la population de chats de l'hôpital de la Croix-Rousse). L'incidence, que nous exprimons ici par le nombre de séroconversions pour 100 chats-années, était également la plus faible dans cette population (17 séroconversions pour 100 chats-années). Cependant, compte-tenu de la densité de chats vivant en un lieu défini, le fait que la prévalence et l'incidence soient faibles n'implique pas forcément que la contamination environnementale le soit également. La population de la Croix-Rousse vit en très forte densité dans un site de quelques hectares (0.03 km² favorables aux chats), et nous avons estimé que, pour une année moyenne, on peut s'attendre à ce que 164 chats séroconvertissent dans une surface d'un km². Cette estimation montre que, à raison d'une fèces contaminée excrétée chaque jour par 33 chats (20% des 164 chats si l'on considère qu'ils se contaminent par les oocystes présents dans l'environnement) durant 1 à 3 semaines, la présence d'oocystes dans l'environnement pourrait être particulièrement élevée et concentrée sur une petite surface dans ce type de sites.

Les îles Kerguelen représentent l'autre extrémité du gradient d'urbanisation. Les chats qui y vivent sont exclusivement prédateurs et présents en très faible densité sur un site très vaste non urbanisé. Cependant, la séroprévalence n'est pas plus élevée chez ces chats que chez ceux des populations rurales que nous avons étudiées, dans lequelles les individus consomment à la fois des proies et des ressources anthropogéniques. Il semble donc que, même si le nombre de séroconversions pour 100 chats-années est maximal à Kerguelen, la faible densité de chats sur les différents sites ne permet probablement pas de maintenir un niveau de contamination environnemental important. Le milieu rural semble au contraire propice à la transmission de *T. gondii* : les chats ont des séroprévalences élévées (47,3% à 55,1%) et l'incidence et le niveau de contamination environnemental sont importants.

Tableau IV.1. Caractéristiques des différentes populations de chats domestiques étudiées

Population	Milieu	Densité de chats (chats/km²)	Superficie favorable aux chats (km²)	Constituants majeurs du régime alimentaire	Prévalence (%)	Incidence (séroconversions pour 100 chats-années)	Contamination environnementale (séroconversions/ année/ km²)
LCR	Urbain	970[a]	0.03	Ressources anthopogéniques	18,6	17	164
BLC	Rural	200[b]	0.23	Ressources anthopogéniques/ Proies	47,3	36	72
STJ	Rural	140[c]	2.14	Ressources anthopogéniques/ Proies	55,1	39	55
AIM	Rural	120[b]	1.67	Ressources anthopogéniques/ Proies	50,2	26	31
KER(RAT)	Insulaire	1,8[d]	17.2	Proies	36,2	28	0.5
KER(AUTRES)	Insulaire	1,5[d]	62	Proies	55,1	65	1

[a] Devillard et al., 2003 ; [b] Pontier et al., 1995 ; [c] Pontier & Natoli, 1996 ; [d] Say et al., 2002.

La dynamique de la transmission du cycle de *T. gondii* chez le chat domestique semble donc ici dépendre principalement de deux facteurs : la densité de chats et leur régime alimentaire. Ces deux facteurs sont déterminés par l'abondance et la distribution des ressources alimentaires et des abris (Macdonald, 1983 ; Turner & Bateson, 2000). Plus les ressources sont aggrégées (ce qui se produit notamment en milieu urbain), plus la contamination environnementale pourrait être localement forte. Cependant, comme il est possible que les populations urbaines de chats présentent de fortes variabilités locales dans leur régime alimentaire, il est nécessaire de vérifier nos résultats par l'étude d'autres populations urbaines avant de conclure sur l'importance de la contamination du milieu urbain par les oocystes de *T. gondii*.

4.2.3. Variations spatio-temporelles de la toxoplasmose chez le chat

Dans les populations de chats que nous avons étudiées, nous avons montré qu'il existait des variations spatiales ou temporelles de la prévalence de toxoplasmose, qui pouvaient notamment être reliées à la survie des oocystes dans l'environnement.

Variations spatiales de la séroprévalence chez le chat

Hormis les variations spatiales qui pourraient être expliquées par la composition du paysage au sens large (importance de la surface agricole, surface de forêt), la séroprévalence de la toxoplasmose chez le chat varie à une échelle plus fine. Dans le site de l'hôpital de la Croix-Rousse, nous avons montré que la séroprévalence de la toxoplasmose chez les chats domestiques était plus importante dans la partie sud du site que dans la partie nord. En admettant que la transmission de *T. gondii* dans ce site se passe entre l'environnement, le chat et l'environnement, on peut supposer que la différence nord/sud soit due à une différence locale de la contamination du site par les oocystes. Le fait que la prévalence chez les chats de ce site dépende des conditions de température et de pluviométrie va dans le sens de l'hypothèse que la variabilité locale de la contamination environnementale doit dépendre de la survie des oocystes. Dans un site aussi restreint (7,5 ha), il est difficile d'imaginer caractériser les conditions de survie des oocystes dans chaque zone, mais cela pourrait être effectué dans un site plus grand et plus varié. Cependant, une étude expérimentale sur la survie des oocystes en fonction de différents paramètres (ensoleillement, humidité, température, composition du sol, etc…) paraît là encore plus appropriée.

Variations temporelles de la séroprévalence chez le chat

Le niveau d'infection des populations de chats domestiques et forestiers connaît des fluctuations inter-annuelles qui peuvent être, comme l'ont montré nos résultats, en partie expliquées par les variations climatiques. Dans l'étude de la prévalence des chats domestiques de l'hôpital de la Croix-Rousse (chapitre 2.2), la variabilité inter-annuelle de la

séroprévalence de la toxoplasmose était reliée à la température et la pluviométrie. Les séroprévalences les plus élevées étaient observées durant les années pour lesquelles les températures maximales avaient été les plus chaudes (>32°C) et les hauteurs de précipitations moyennes les plus importantes (>25mm de hauteur de précipitation moyenne par décade). Dans les populations rurales, les années pluvieuses (>25mm de hauteur de précipitation moyenne par décade) ont semblé être liées à un accroissement du risque de séroconvertir chez les chats domestiques ruraux. Enfin, de telles variations ont également été observées dans notre échantillon constitué de chats forestiers et domestiques, puisque le niveau de séroprévalence dans leurs populations était relié à une mesure globale du climat, le NAO. Les années pour lesquelles l'indice NAO d'hiver était positif, ce qui correspond en Europe de l'ouest à des hivers chauds et pluvieux, ont été celles durant lesquelles les plus fortes séroprévalences ont été observées.

Ces variations inter-annuelles reliées au climat local ou global peuvent être expliquées par différents phénomènes. En effet, durant les années chaudes et humides la survie des oocystes dans l'environnement augmente (Frenkel et al., 1975 ; Dubey, 1998b), résultant en une augmentation de la biomasse des oocystes dans l'environnement par rapport aux années de sécheresse, ce qui pourrait accroître les chances de rencontre entre les différents types d'hôtes et le parasite. Dans la population de l'hôpital de la Croix-Rousse, où nous avons supposé que la transmission reposait essentiellement sur la contamination du chat par les oocystes, cette hypothèse pourrait expliquer que l'on retrouve les plus fortes séroprévalences durant les années à épisodes chauds et humides. Cependant, les variations climatiques affectent aussi la dynamique des populations d'hôtes intermédiaires et d'hôtes paraténiques. En effet, les densités de rongeurs sont généralement plus importantes lorsque les hivers sont doux (Stenseth et al., 2002), on peut donc supposer que les chats, prédateurs opportunistes, les consomment plus souvent. Enfin, la dispersion du parasite pourrait être optimale lors d'épisodes pluvieux, car elle serait favorisée par le ruissellement ou par l'augmentation des biomasses et des mouvements des vers de terre (Valle et al., 1997). La meilleure survie et la meilleure dispersion des oocystes, ainsi que l'augmentation des densités d'hôtes intermédiaires, sont trois facteurs qui convergent pour entraîner un risque élevé de contamination dans les populations prédatrices durant les années clémentes.

Cet effet semble agir à large échelle : en milieu rural (chapitre 3.4), nous avons montré que les variations climatiques expliquaient également la variabilité du risque de séroconversion entre les populations étudiées. De même, l'effet des variations climatiques sur la prévalence des chats forestiers et domestiques (chapitre 3.5) a été mesuré à l'échelle du

quart nord-est de la France. Cependant, les vatiations de prévalences ne sont pas synchrones dans toutes les populations, même si certains phénomènes sont retrouvés partout (Figure 4.4). On observe en effet des phases d'augmentation de la séroprévalence dans la population urbaine de l'hôpital de la Croix-Rousse (chapitre 2.2) ainsi que dans l'échantillon constitué de chats forestiers et domestiques (chapitre 3.5) : entre 1998 et 1999, la séroprévalence a augmenté dans les deux échantillons, cette période correspondant à une phase d'augmentation de l'indice NAO et donc à des températures clémentes et une forte pluviométrie.

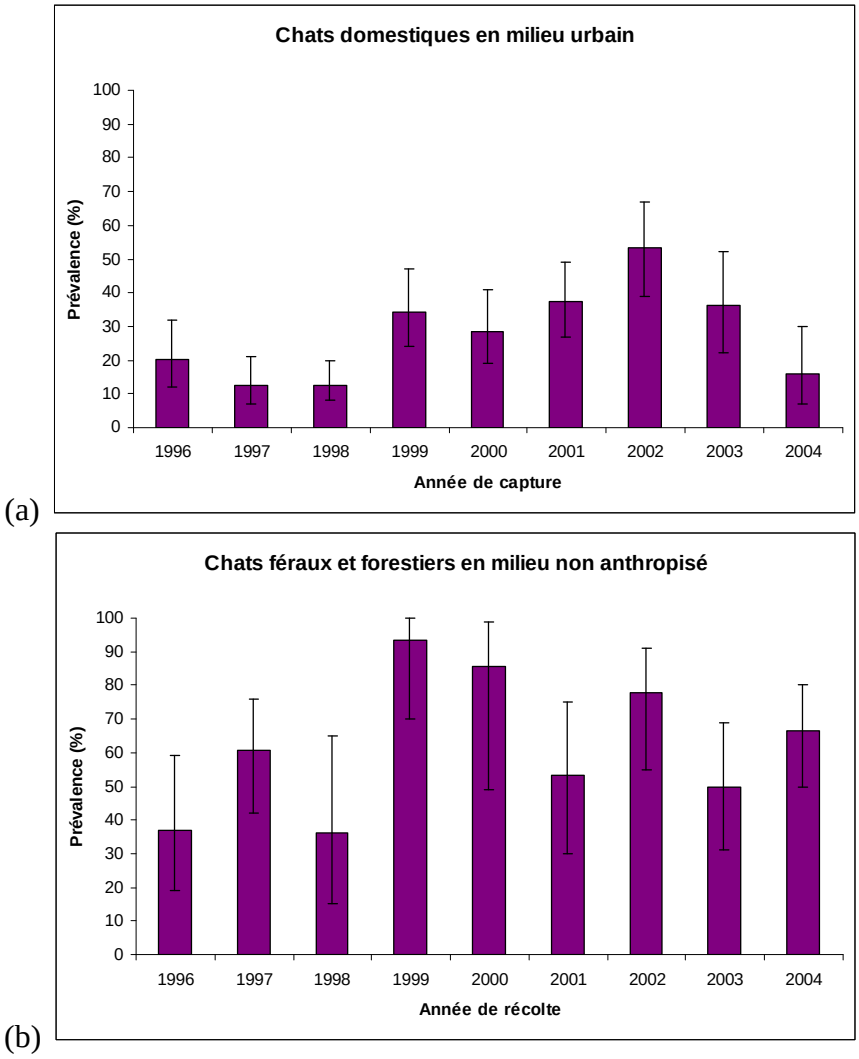


Figure 4.4. Prévalences brutes des anticorps anti-*Toxoplasma gondii* dans les différentes populations étudiées (1996-2004). (a) Séroprévalence des chats de l'hôpital de la Croix-Rousse (Lyon) en fonction du temps (chapitre 2.2). (b) Séroprévalence des chats féraux et chats forestiers du quard nord-est de la France (chapitre 3.5).

4.2.4. Contamination environnementale

La contamination environnementale par les oocystes de *T. gondii* peut varier selon la densité des populations de chats et les conditions de survie des oocystes. De plus, le comportement défécatoire des chats est structuré (Turner & Bateson, 2000), puisque ceux-ci utilisent des zones de défécation communes réparties sur leur territoire, ce qui peut concentrer les parasites dans des zones très localisées (Uga et al., 1996 ; Yamaguchi et al., 1996). Nous avons montré qu'en milieu urbain où les chats vivent en très forte densité (chapitre 2.3), seules ces zones de défécations contiennent de l'ADN de *T. gondii* en grande quantité. Ce résultat suggère que la dynamique de diffusion des oocystes dans le sol n'est pas suffisamment active pour homogénéiser la contamination du sol, au moins dans le site étudié, mais il resterait à confirmer par l'utilisation d'une méthode de détection des oocystes plus sensible.

En conséquence, dans une telle population, l'exposition des chats aux oocystes de *T. gondii* doit être importante, et en partie due au partage de zones de défécation contaminées qui sont utilisées par plusieurs chats. Au niveau des zones de défécation, les chats peuvent gratter le sol pour enterrer leurs fèces (Ishida & Shimizu, 1998), et entrer ainsi en contact avec des oocystes de *T. gondii*. De plus, la contamination des hôtes intermédiaires pourrait dépendre de la répartition spatiale de ces zones de défécation. Enfin, dans le site de l'hôpital de la Croix-Rousse où de grandes quatités d'oocystes pourraient être concentrées sur quelques zones réparties au sein du site, les zones de risque pour l'homme apparaissent donc comme spatialement très limitées et leur décontamination pourrait suffire à limiter la propagation de *T. gonii*.

4.2.5. Existe-t-il un profil de chat à risque ?

Même s'il existe une forte variabilité individuelle du taux d'anticorps chez les chats domestiques (chapitre 2.2), leur niveau de prévalence varie peu selon des facteurs individuels. Nous avons montré qu'en milieu naturel, les chats gardent une immunité tout au long de leur vie (chapitre 2.2) et que l'on retrouve un effet linéaire de l'âge sur la probabilité d'avoir des anticorps dans toutes les populations étudiées. En effet, plus les chats sont âgés, plus ils ont de

chance d'avoir été infestés, la probabilité d'acquérir la toxoplasmose étant égale à chaque âge. L'évolution de la prévalence en fonction de l'âge dépend cependant des caractéristiques de la population de chats : à Kerguelen, où les chats sont prédateurs, tous les individus étaient positifs à partir de quatre ans, alors qu'ils n'étaient que 40% dans la population de Lyon. On suppose que l'accumulation des occasions de rencontrer un hôte intermédiaire contaminé entraîne une évolution rapide de la prévalence en fonction de l'âge à Kerguelen, alors que cette probabilité est relativement faible à Lyon.

De plus, nous avons confirmé que, en milieu rural (chapitre 3.4), les chats ayant accès au milieu extérieur étaient plus souvent positifs que des chats de propriétaire qui ne sont pas autorisés à sortir. Cette différence peut être mise en parallèle avec les résultats obtenus dans l'étude des chats de l'hôpital de la Croix-Rousse à Lyon qui chassent peu et ont une faible séroprévalence, et ceux obtenus sur les chats des îles Kerguelen qui survivent exclusivement par la prédation et ont une séroprévalence élevée.

La socialité semble également jouer un rôle dans le risque d'acquisition de la toxoplasmose chez le chat. En milieu rural, les individus appartenant à des groupes comportant des juvéniles ont une probabilité plus importante de séroconvertir que ceux qui vivent dans des groupes composés uniquement d'adultes, ou que les individus solitaires (chapitre 3.4). Les juvéniles représentent une classe d'âge dans laquelle la séroprévalence est faible mais également dans laquelle beaucoup d'individus sont susceptibles de séroconvertir, ce qui expose les autres individus du groupe et les hôtes intermédiaires présents sur le territoire aux oocystes excrétés dans l'environnement. Au contraire, les individus plus âgés représentent une classe pour laquelle la proportion d'animaux ayant déjà séroconverti est plus importante, c'est pourquoi on peut observer moins de primo-infections chez ces individus.

Il est intéressant de remarquer que les facteurs individuels qui ont été étudiés dans nos travaux étaient généralement correlés à d'autres facteurs, définissant un profil de chat. Par exemple, le mode de vie était correlé à l'état reproducteur des chats (castrés ou non) en milieu rural (chapitre 3.4) : un chat ne sortant pas de la maison de son propriétaire était généralement castré. De la même façon, c'est le nombre de juvéniles dans un groupe social qui expliquait l'effectif du groupe. Enfin, dans toutes les populations où nous avons pu tester ce facteur, le FIV était confondu avec l'âge, les chats vieux ayant plus de chance d'avoir cette virose (Courchamp & Pontier, 1994) et n'était pas retenu dans le modèle final. Ces effets de confusion montrent qu'il est difficile d'étudier l'effet d'une variable séparemment sur la prévalence chez le chat. Il est nécessaire, par exemple, de considérer l'effet de l'âge avant d'étudier l'effet d'une co-infection sur le risque d'acquérir la maladie chez le chat. Ceci

pourrait expliquer pourquoi les résultats des études portant sur les co-infections toxoplasmose-FIV ou toxoplasmose-FeLV sont généralement contradictoires : dans plusieurs études, la prévalence de la toxoplasmose est supérieure chez les chats infectés par le FIV ou le FeLV (Whitt et al., 1989 ; Lin et al., 1992 ; D'Amore et al., 1997) alors qu'elle est inférieure dans d'autres (Dorny et al., 2002 ; Lin et al., 1990). Ces études ont comme point commun de ne pas avoir pris l'âge des chats en compte, et pourraient donc simplement refléter la structure d'âge des échantillons étudiés.

Pour conclure, nos travaux indiquent que, à partir du moment où les chats sont autorisés à sortir et chassent régulièrement, ils semblent avoir tous les mêmes risques d'être contaminés dans un environnement donné. Ceci n'exclut pas la possibilité de différences individuelles de sensibilité et de réponse immunitaire. Par exemple, le taux d'anticorps produit par les chats diffèrait fortement entre les individus dans notre étude sur les chats domestiques de l'hôpital de la Croix-Rousse, entre les chats nés à l'intérieur du site et ceux venus de l'extérieur (chapitre 2.2). Cette différence peut être expliquée par la voie d'infection (oocystes, hôtes intermédiaires) ou par la dose d'infection, ou enfin par une réactivité différente des chats, cependant ces hypothèses n'ont pas encore été étudiées.

4.2.6. Phase clonale et phase sexuée : quelle importance relative en fonction de l'environnement ?

Bien qu'il soit difficile de généraliser nos résultats à l'ensemble des environnements dans lesquelles des populations de chats peuvent s'établir, nous pouvons conclure que l'importance relative de la phase clonale et la phase sexuée de *T. gondii* diffère selon l'environnement. En accord avec les hypothèse de Choisy et al. (2003), nous avons montré que dans un environnement où les hôtes intermédiaires sont en faible densité relativement aux hôtes définitifs, la transmission du parasite est reliée aux conditions de survie de la phase libre de *T. gondii* (oocystes) dans l'environnement. En effet, en milieu urbain, les chats domestiques de l'hôpital de la Croix-Rousse étaient peu contaminés et leur prévalence variait en fonction de facteurs reflétant les conditions de survie des oocystes (localisation dans le site d'étude, températures, précipitations).

Au contraire, dans les environnements riches en hôtes intermédiaires, la phase clonale peut prendre une importance particulière. Lorsque les chats sont prédateurs, leurs chances de rencontrer le parasite en consommant un hôte intermédiaire contaminé sont plus importantes. En milieu rural, par exemple, le niveau de prévalence chez les chats domestiques était deux fois plus important que celui observé en milieu urbain où les chats chassaient peu.

En milieu non anthropisé ou en milieu forestier, la faible densité de chats suggère que la contamination environnementale est peu importante. Cependant, les chats étudiés dans ces milieux étaient les plus contaminés et leur prévalence était fortement correlée aux composantes de leur régime alimentaire : dans les îles Kerguelen, la présence de lapins dans le régime alimentaire des chats domestiques harets était reliée à de fortes prévalences chez ces derniers. Ainsi, deux hypothèses permettent d'expliquer que des forts niveaux de contamination soient observés chez des chats vivat dans des milieux dont les matrices environnementales sont supposées faiblement contaminées. D'une part, les chats qui vivent dans ces milieux ne dépendent pas de l'homme pour survivre et sont exclusivement prédateurs : la consommation régulière de proies doit conduire à une accumulation des risques de rencontrer des hôtes intermédiaires contaminés, même si ceux-ci ont une faible prévalence. D'autre part, les hôtes intermédiaires présents dans ces milieux peuvent se transmettre le parasite par voie verticale ou par carnivorisme, ce qui constituerait un réservoir d'hôtes contaminés pour la transmission du parasite. Bien que nous n'ayions pas d'informations sur ce sujet, les milieux non anthropisés ou forestiers apparaîssent comme pouvant favoriser la prépondérance d'une phase clonale dans le cycle sauvage de *T. gondii*.

4.2.7. Quels sont les risques pour l'homme ?

La présence d'oocystes de *T. gondii* de l'environnement peut constituer un risque d'exposition variable pour l'homme en fonction des liens qu'il entretient avec son environnement. Le comportement humain au sens large peut agir comme un filtre modulateur de la transmission du parasite : utilisation de l'habitat par l'homme, conditions locales d'hygiène, habitudes culinaires, etc… Bien que la consommation de viande insuffisamment cuite apparaisse comme le premier facteur de risque d'acquisition de la toxoplasmose chez l'homme, plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence des comportements et des modes de vie à risque (revue *in* AFSSA, 2005). Les professions agricoles, ainsi que le contact

avec le sol et le fait de vivre en milieu rural ou en milieu sub-urbain entraînent un risque d'acquisition de la toxoplasmose plus élevé chez l'homme (Stürchler et al., 1987 ; Bobić et al., 1998 ; Cook et al., 2000). La notion de paysage à risque doit donc être nuancée : on a vu que le milieu urbain semble présenter une contamination environnementale par les oocystes de *T. gondii* qui peut être localement très importante, mais sans présenter un risque particulier de toxoplasmose chez l'homme. Cependant, l'évolution de l'utilisation du milieu urbain par l'homme suggère que son risque d'exposition va également évoluer. En effet, les aires de promenades (parcs, jardins, etc.), qui étaient au 18e siècle des lieux de mondanités, sont devenues depuis les années 80 des lieux de plus en plus fréquentés où l'homme profite de la nature et peut avoir des contacts avec le sol, notamment lors de pique-niques ou d'activités de loisir (Clergeau, 2007). Ainsi, si des populations de chats sont présentent dans ces parcs, les risques d'exposition aux oocystes de *T. gondii* pour l'homme en milieu urbain apparaissent non négligeables.

Enfin, les fermes d'élevages pourraient représenter des réservoirs particuliers du parasite en milieu rural. D'une part, ils pourraient alimenter les milieux alentours en oocystes et en hôtes contaminés, et d'autre part, contribuer à infecter les hommes qui consomment la viande des animaux élevés. Ce mode de transmission permettrait au parasite de se propager à large échelle et dans différents types d'environnement.

Si la sensibilité des méthodes de détection des oocystes de *T. gondii* dans l'environnement est améliorée, une estimation de la contamination des matrices environnementales (sol et eau) dans les milieux fréquentés par l'homme pourra être envisagée à une échelle fine. Ainsi, à plus long terme, une perspective intéressante dans la recherche des risques d'exposition pour l'homme aux oocystes de *T. gondii* pourrait être la réalisation de cartographies des zones à risque en fonction de la répartition spatiale et quantitative des oocystes dans les matrices environnementales.

4.3. Axes de réflexion

4.3.1. Risques d'exposition aux zoonoses : faut-il nourrir les chats en ville ?

Dans nos travaux, nous avons montré que la séroprévalence pour *T. gondii* d'une population de chats vivant dans un milieu urbain et exerçant peu la prédation était plus faible que celle observée dans d'autres populations de chats prédateurs. A première vue, l'intérêt de l'apport de nourriture supplémentaire réside dans le fait que les chats, en consommant cette ressource, perdent tout ou partie leur motivation à chasser (Turner & Bateson, 2000) et sont donc moins exposés à la contamination par ingestion d'un hôte intermédiaire infecté. Dans leur étude de populations de chats urbains à Brooklyn (Etats-Unis), Calhoon & Haspel (1989) montrent que sur une période cumulée de 180 heures, une seule observation de prédation a été effectuée dans une population de chats vivant dans un site dans lequel oiseaux et micromammifères sont abondants. De même, nous décrivons seulement 26 observations de prédation sur 6820 observations visuelles de chats en activité dans la population de chats domestiques de l'hôpital de la Croix-Rousse (chapitre 2.2). En limitant fortement la prédation, l'apport de nourriture contribue à exposer le chat à deux sources de contamination peu efficaces : la transmission verticale rarement observée (chapitre 2.2) et celle par les oocystes qui sont peu infectieux et peu pathogènes chez le chat (Dubey, 2006). Par ailleurs, au-delà d'un impact sur l'épidémiologie de la toxoplasmose, le fait de nourrir les chats revêt un aspect social : les nourrisseurs sont souvent des personnes dévouées aux chats, qui leur rendent visite tous les jours et consacrent beaucoup de temps au bien-être de « leurs » chats (Haelewyn, 1979 ; Artois et al., 2002). Ce sont souvent des femmes, généralement seules et âgées (Haelewyn, 1979 ; Haspel & Calhoon, 1990), pour lesquelles l'activité de nourrissage peut apporter une motivation et un soutien psychologique (Artois et al., 2002).

Cependant, la présence de détritus liés à l'activité de l'homme suffirait à elle seule à couvrir les besoins alimentaires des chats en milieu urbain, la nourriture ne constituant pas un facteur limitant dans ces populations (Calhoon & Haspel, 1989). L'apport de nourriture

supplémentaire par les amis des chats contribue à expliquer l'installation de populations en très fortes densités (Dards, 1981 ; Tabor, 1981), limitées essentiellement par la présence d'abris (Calhoon & Haspel, 1989). Ces populations, concentrées dans des taches d'habitat (parcs, cimetières, jardins, etc…) et vivant à proximité de l'homme, peuvent contaminer l'environnement par des parasites en rejetant une quantité importante de fèces (Dabritz et al., 2006). Dans le cas de la population de l'Hôpital de la Croix-Rousse à Lyon, nous avons montré que chaque année, 5 à 13 chats pourraient acquérir la toxoplasmose et excréter des millions d'oocystes dans des zones de défécation réduites à quelques mètres carrés dans l'enceinte du site. Nous n'avons pas d'indication sur l'impact de ces sites fortement contaminés sur le risque d'exposition chez l'homme, cependant nous avons montré qu'ils contiennent des quantités importantes d'oocystes qui peuvent contaminer les personnes ayant un contact direct ou indirect avec le sol (jardiniers, gardiens, promeneurs ou propriétaires de chiens).

Le risque de transmission de zoonoses à l'homme dans le cas de populations denses de chats utilisant des zones de défécation communes n'est pas confiné au seul cas de la toxoplasmose. Les chats sont susceptibles d'excréter des formes libres de nombreux autres parasites par leur fèces : *Ascaris lumbricoides* (Schulz & Kroeger, 1992 ; Nurdian, 2004), *Trichuris trichura*, *Hymenolepis diminuta* (Nurdian, 2004), *Toxocara canis* et *Toxocara cati* (Holland et al., 1991 ; Uga et al., 1996 ; Nurdian, 2004) ont été retrouvés dans des zones de défécation de chats en milieu urbain, certaines pouvant être utilisées par 5 à 14 chats (Uga et al., 1996).

Le déterminant de la transmission de *T. gondii* du chat à l'homme est le moment de la première infection chez le chat, qui excrète alors des oocystes dans l'environnement. Bien que nous ayons observé une séroprévalence pour *T. gondii* chez le chat plus faible en milieu urbain qu'en milieu rural, la forte densité de chats en milieu urbain contribue à offrir en permanence la possibilité que de nouvelles contaminations de chats aient lieu. Réduire la densité de chats en ville, par exemple en adoptant une meilleure gestion des déchets liés à l'alimentation, en limitant l'apport supplémentaire de nourriture dans les lieux fortement fréquentés par l'homme (hôpitaux, parcs utilisés pour le loisir), ou encore en condamnant l'accès aux abris, pourrait contribuer à diminuer le risque d'exposition aux formes libres de nombreux parasites.

4.3.2. Réchauffement climatique et toxoplasmose : quel scénario envisager ?

Le réchauffement climatique se traduit par une augmentation à l'échelle mondiale de la température moyenne des océans et de l'atmosphère. L'élévation moyenne de la température du globe au cours du XXe siècle aurait été de 0.6°C, et pourrait atteindre 1.8°C à 3.4°C au cours du XXIe siècle d'après le Groupement Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC, 2007). La modification du climat se traduit essentiellement par des phases de fortes températures et précipitations se répétant de plus en plus souvent dans le temps aux latitudes moyennes et hautes de l'Hémisphère nord, alors que les précipitations deviendraient plus rares dans les zones sub-tropicales de cet Hémisphère. Le réchauffement climatique peut augmenter le développement et la survie de certains parasites, et ainsi leur transmission : on observe ainsi actuellement une extension des zones infestées par des maladies comme le paludisme ou la malaria (Harvell et al., 2002).

Les parasites ayant une phase libre dans l'environnement peuvent être sensibles aux changements de température et d'humidité (Harvell et al., 2002). Les épisodes répétés de températures clémentes et de fortes précipitations pourraient augmenter leurs chances de survie et de transmission à différents hôtes. Les communautés d'hôtes elles-mêmes pourraient voir leurs effectifs augmenter dans de telles conditions (Stenseth et al., 2002). Dans le cas de la toxoplasmose, durant ces dix dernières années, les périodes durant lesquelles les précipitations étaient fortes ou les indices de NAO élevés, avaient les plus fortes prévalences chez le chat. La répétition dans le temps de phases à hiver doux pourrait favoriser le maintien de fortes prévalences chez l'hôte définitif, mais aussi une meilleure survie des oocystes dans l'environnement. De plus, une fréquence importante d'épisodes pluvieux pourrait permettre de disséminer les oocystes par ruissellement. En milieu urbain, ce phénomène ne serait confiné qu'aux endroits où la végétation permet de retenir l'humidité. La couverture de la surface urbaine par des matériaux imperméables tendrait au contraire à ne retenir que la chaleur (qui pourrait être de plus en plus élevée en été) et à diminuer la survie des oocystes. En milieu riche en hôtes intermédiaires, des niveaux de fluctuations importants de la prévalence chez l'hôte définitif pourraient être observés car elle dépend des conditions de survie des oocystes ainsi que de la dynamique de populations d'hôtes intermédiaires.

Le suivi de données géographiques et climatographiques regroupant des informations sur l'humidité et la température locale pourrait être utilisé pour prédire l'évolution de la

propagation de l'infection chez les animaux d'élevage et chez l'homme, comme c'est déjà le cas pour d'autres parasites intestinaux du bétail (Harvell et al., 2002).

4.3.3. Va-t-on vers une spécialisation des souches de *Toxoplasma gondii* en fonction de l'environnement ?

Si on admet que l'importance relative des phases sexuée et asexuée dans le cycle *de T. gondii* diffère en fonction des caractéristiques de l'environnement, on peut supposer que des souches différentes peuvent être favorisées selon le milieu. Les lignées clonales, qui ont émergé au moment du développement de l'agriculture, ont probablement bénéficié des fortes densités d'hôtes intermédiaires qui ont été créées à partir de cette période. Lors de leur émergence, les souches clonales se sont propagées très largement (Su et al., 2003), cependant les souches atypiques ont persisté, notamment en Amérique du sud et en Afrique (Dardé, 2004). Les souches de type II apparaissent comme les plus répandues dans l'environnement : elles sont retrouvées dans 80% des collections d'isolats humains et animaux (Dardé, 2004 ; Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma*, co-géré par le Pr. I. Villena et le Pr. M.-L. Dardé) et pourraient être favorisées par transmission verticale, car elles sont peu virulentes chez la souris et probablement chez d'autres hôtes intermédiaires (Marshall et al., 2004).

Les souches recombinantes ou atypiques sont très rares en Europe et en Amérique du Nord, et sont observées dans des pays en voie de développement, comme en Amérique du sud ou en Afrique, où l'élevage intensif n'est pas pratiqué (Ajzenberg et al., 2004). Ces souches sont toujours associées à des formes sévères de toxoplasmose chez l'homme et chez l'animal (Dardé, 2004). La diversité allélique et génotypique des souches atypiques est beaucoup plus importante que celle observée chez les souches de type I, II, et III. Les souches recombinantes et atypiques peuvent être associées à des modes de transmission particuliers et sont responsables d'épidémies chez l'homme. Au Brésil, les zones de forte endémie de toxoplasmose humaine sont liées à l'ingestion d'oocystes depuis l'environnement, probablement contenus dans l'eau de boisson (Bahia-Oliveira et al., 2003). Les souches atypiques pourraient y être transmises d'une façon fréquente via le cycle sexué, et présenter des caractéristiques particulières de survie dans l'environnement.

Dans les milieux où les hôtes intermédiaires sont nombreux et denses, les souches clonales pourraient être prépondérantes. En milieu rural dans les pays développés, le développement de l'agriculture a favorisé l'émergence de souches adaptées aux animaux domestiques, notamment par des oocystes infectieux chez les hôtes intermédiaires et des bradyzoïtes infectieux chez le chat (Ajzenberg et al., 2004). Dans les milieux où les hôtes intermédiaires sont rares, comme en milieu urbain, des souches dont les oocystes seraient infectieux pour le chat pourraient être sélectionnées. Dans les milieux peu anthropisés comme les grandes zones forestières, les Félidés peuvent être présents en faible densité et le parasite pourrait développer des formes de résistance et de dissémination capables d'atteindre les hôtes intermédiaires.

4.4. Perspectives

Le besoin de recherches sur la dynamique de transmission du cycle de *T. gondii* reste important, notamment parce que la plupart des études actuelles considèrent peu l'écologie des hôtes. Ces recherches pourraient concerner plusieurs axes : l'étude du mode de contamination des hôtes, la présence d'oocystes dans l'environnement et l'expérimentation sur les conditions de survie des oocystes, la structure génétique de *T. gondii*, ainsi que la modélisation.

Etude de la toxoplasmose chez les hôtes

Bien que nous n'ayions pas mis en évidence une différence du niveau d'infection entre deux sous-espèces d'hôte définitif (chat domestique et chat forestier), l'hypothèse d'une différence interspécifique du niveau de prévalence des hôtes définitifs reste à être étudiée plus largement, notamment parce qu'on s'attend à ce qu'une variabilité en terme de sensibilité au parasite, de mode de vie, ou encore de milieu de vie ait des conséquences sur le risque d'infection chez les hôtes définitifs. Chez le chat domestique, l'étude de plusieurs populations vivant dans des milieux contrastés a montré que plusieurs niveaux de variabilité pouvaient être mis en évidence dans le risque que les animaux soient porteurs d'anticorps, et il serait donc nécessaire de poursuivre le suivi de populations naturelles de chats vivant dans des milieux offrant notamment une abondance d'hôtes intermédiaires variables.

Chez les hôtes intermédiaires, aucune étude écologique n'a jusqu'à aujourd'hui été décrite à notre connaissance. Or, il nous semble qu'une étude très locale de la contamination du sol par les oocystes de *T. gondii* et de leur transport par les hôtes paraténiques permettrait de mieux comprendre comment s'infestent les hôtes intermédiaires. La taupe européenne, notamment, apparaît comme une espèce intéressante à étudier car elle pourrait être un indicateur de la présence de *T. gondii* dans l'environnement.

Ces investigations nécessiteraient de pouvoir comparer les résultats des tests sérologiques entrepris chez les hôtes : les nombreuses études de séroprévalence de toxoplasmose chez l'animal pourraient en effet fournir des résultats avec différents seuils de positivité, et la nécessité de fixer un seuil utilisé d'une façon générale s'avère importante.

Contamination environnementale

Nous avons montré que la contamination environnementale par les oocystes de *T. gondii*, de laquelle peut découler la contamination des hôtes intermédiaires dont l'homme, peut être largement déterminée par le comportement défécatoire des chats, ainsi que par les conditions de survie des oocystes. C'est pourquoi, il nous paraîtrait intéressant de poursuivre l'étude du comportement défécatoire du chat dans différents milieux, comme le milieu rural, ou le milieu forestier (en recherchant notamment une différence du comportement défécatoire entre les milieux de prairie et de forêt), ou encore le milieu non anthropisé, afin de prédire les risques de contamination environnementale dans ces milieux.

Cependant, nous estimons que la méthode de détection des oocystes de *T. gondii* dans le sol utilisée dans nos travaux ne permet pas de détecter les contaminations faibles dues à une excrétion d'oocystes ancienne ou une contamination due à la dissémination d'oocystes à partir d'un point d'excrétion de fèces. L'amélioration du protocole de détection des oocystes, notamment en recherchant à obtenir une meilleure sensibilité, permettrait d'estimer la distribution spatiale du parasite en quantifiant l'ADN contenu dans les échantillons de sol.

Ainsi, une étude locale du niveau de contamination des fermes pourrait être entrepris, afin de vérifier l'hypothèse de zones d'hyper-endémie dans le paysage rural. La cartographie de ces zones, ainsi que du niveau d'infection des hôtes et du niveau de contamination de l'environnement, permettrait de situer le risque de contamination pour l'homme et pour les animaux d'élevage.

Par ailleurs, nous avons montré que des variabilités inter-annuelles de séroprévalence des hôtes définitifs étaient fortement reliées aux fluctuations du climat. Cependant, l'utilisation des variables de climat dans nos travaux reste exploratoire (pluviométrie, NAO), et il resterait à identifier les périodes et les paramètres affectant la survie des oocystes, notamment en étudiant plus particulièrement d'éventuelles variations saisonnières de la prévalence.

Les conditions de survie des oocystes ont été expérimentées en laboratoire sur un nombre restreint de souches (Frenkel et al., 1975 ; Dubey, 1998b). Ces études pourraient être reproduites en milieu naturel en prenant en compte plusieurs souches, plusieurs types de sol, différents niveaux d'ensoleillement ou d'humidité, etc. Le protocole de détection des oocystes dans le sol nécessite cependant au préalable d'être amélioré. Dans un contexte de réchauffement climatique, il semble particulièrement important de comprendre le lien entre climat et évolution de la présence de *T. gondii* chez les différents hôtes et dans l'environnement au cours du temps.

Structure génétique de *T. gondii* et modélisation

L'isolement des souches présentes dans différents types d'environnement pourrait permettre de tester l'hypothèse de la spécialisation des souches de *T. gondii* en fonction des caractéristiques du milieu. La modélisation permettrait de tester les hypothèses émises à partir des études épidémiologiques sur l'importance des phases sexuées et asexuées dans la propagation du parasite, et notamment de tester si la densité d'hôtes intermédiaires présents dans l'environnement est un paramètre qui module les flux de transmission de *T. gondii*.

Conclusion générale

« La montagne et l'eau finiront par se rencontrer ».

Proverbe chinois

Comme toute étude écologique, cette thèse souffre de certaines limites (par exemple les périodes de réalisation de captures qui diffèrent entre populations, ou le choix d'un seuil de positivité pour les tests sérologiques ; voir chapitre 4.1), mais dégage cependant des résultats et des perspectives forts. En effet, nous avons montré pour la première fois que la toxoplamose féline n'est pas une maladie endémique. Elle est fortement variable dans le temps (et nous avons montré que cette variabilité est reliée aux variations de climat) et elle est variable dans l'espace à plusieurs échelles de perception.

La variabilité temporelle de la prévalence de toxoplasmose chez le chat a été démontrée à l'échelle d'une population (en considérant les températures et précipitations locales) mais également à une échelle plus vaste, le quart nord-est de la France. Cette relation avec le climat est cohérente dans toutes les études : un climat doux et pluvieux favorise les périodes de forte prévalence, tandis que les périodes de forte chaleur et sécheresse seraient liées aux faibles prévalences chez le chat. Ces variations peuvent être expliquées par différents phénomènes, dont la sensibilité des oocystes aux conditions météorologiques (la survie des oocystes en laboratoire est par exemple mauvaise à partir de 35°C ; Frenkel et al., 1970), mais aussi aux variations des densités d'hôtes intermédiaires qui ont un impact sur les relations prédateur-proies (les densités de mulots ou campagnols roussâtres sont sensibles aux variations du climat).

La variabilité spatiale de la prévalence de toxoplasmose chez le chat est également observée à plusieurs échelles. Nous avons montré qu'entre plusieurs milieux contrastés, il existe une différence de prévalence. Notamment, les chats étaient nettement moins infectés dans le site urbain étudié que dans les autres sites où les hôtes intermédiaires étaient abondants. Par ailleurs, il existait également une hétérogénéité spatiale du niveau d'infection des chats en milieu insulaire, dans les îles Kerguelen : les chats du site de Ratmanoff étaient moins souvent contaminés que ceux des autres sites. Enfin, à l'intérieur du site d'étude urbain, chats du nord et chats du sud du site n'avaient pas le même niveau d'infection. Cette variabilité spatiale à plusieurs échelle peut être mise en relation d'une part avec la composition du paysage et la composition des communautés d'hôtes, et d'autre part avec les caractéristiques locales qui influencent la survie des oocystes.

Nos travaux ont permis de mettre en relation le risque d'acquérir la toxoplasmose chez le chat et certaines caractéristiques de l'environnement. Les caractéristiques locales du paysage, la composition des communautés d'hôtes ou le milieu physico-chimique n'offrent pas les mêmes possibilités de transmission quand ils sont variables. Ainsi, la transmission du parasite semble optimale dans les milieux où les hôtes intermédiaires sont abondants.

L'exposition de l'homme aux oocystes excrétés par le chat va donc dépendre de la densité de chats présents dans le milieu : dans un site urbain où la densité de chat est particulièrement forte, des spots de contamination peuvent être répartis dans une surface restreinte. Cependant, l'utilisation du sol par l'homme est à prendre en compte dans son risque d'exposition : en milieu urbain, peu de personnes ont des contacts directs avec le sol, alors qu'en milieu rural, les activités de jardinage ou les activités agricoles peuvent exposer l'homme au parasite.

Enfin, notre étude suggère que la possibilité d'un cycle simple entre l'hôte définitif et l'environnement n'est pas exclue. Ce cycle pourrait se dérouler dans des milieux pauvres en hôtes intermédiaires, comme certaines taches d'habitat urbain. Cependant, les traits d'histoire de vie de *T. gondii* ne sont actuellement pas optimisés pour un tel cycle : la population de chats urbains était celle qui montrait la plus faible prévalence parmi les populations étudiées, malgré la présence de zones fortement contaminées par des oocystes. A long terme, il est donc envisageable que les traits d'histoire de vie de *T. gondii* évoluent et que les souches permettant une meilleure survie dans l'environnement et une plus forte infectiosité chez l'hôte définitif soient favorisées.

Références bibliographiques

-A-

AFSSA 2005. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. AFSSA Ed., Maisons-Alfort, 316p.

Ajzenberg D., Bañuls A.L., Tibayrenc M., & Dardé M.L. 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology* 32, 27-38.

Ajzenberg D., Bañuls A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., & Dardé M.L. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in Toxoplasma gondii. *International Journal for Parasitology* 34, 1185-1196.

Allan, B.F., Keesing, F., & Ostfeld, R.S. 2003. Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conservation Biology* 17, 267-272.

Almeria, S., Calvete, C., Pagés, A., Gauss, C.B.L., & Dubey, J.P. 2004. Factors affecting the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Spain. *Veterinary Parasitology* 123, 265-270.

Altizer, S., Nunn, C.L., Thrall, P.H., Gittleman, J.L., Antonovics, J., Cunningham, A.A., Dobson, A.P., Ezenwa, V., Jones, K.E., Pedersen, A.B., Poss, M., & Pulliam, J.R.C. 2003. Social organization and parasite risk in mammals: Integrating Theory and Empirical Studies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34, 517-547.

Ancelle, T., Goulet, V., Tirard, V., Baril, L., Mazaubrun, C., Thulliez, P., Wcislo, M., & Carme, B. 1996. La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 51, 227-229.

Anderson, G.D., & Condy, P.R. 1974. A note on the feral house cat and house mouse on Marion Island. *South African Journal of Antarctic Research* 4, 58-61.

Anderson, R.M., & May, R.M. 1979. Population biology of infectious diseases: part I. *Nature* 280, 361-367.

Aramini, J.J., Stephen, C., Dubey, J.P., & Engelstoft, C. 1999. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology and Infection* 122, 305-315.

Arkush, K.D., Miller, M.A., Leutenegger, C.M., Gardner, I.A., Packham, A.E., Heckeroth, A.R., Tenter, A.M., Barr, B.C., & Conrad, P.A. 2003. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytillus galloprovincialis*). *International Journal of Parasitology* 33, 1087-97.

Artois, M., Duchene, M.J., Pericard, J.M., & Xemar, V. 2002. Le chat errant ou haret. Encyclopédie des carnivores de France, n°18. Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères, 50 pp.

-B-

Bahia-Oliveira, L.M.G., Jones, J.L., Azevedo-Silva, J., Alves, C.C.F., Oréfice, F. & Addiss, D.G. 2003. Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 9, 55-62.

Baker, L., Brazel, A.J., Selover, N., Martin, C., McIntyre, N., Steiner, F.R., Nelson, A., & Musacchio, L. 2002. Urbanization and warming of Phoenix (Arizona, U.S.A.): impacts, feedbacks and mitigation. *Urban Ecosystems* 6, 183-203.

Baker, P.J., Ansell, R.J., Dodds, P.A.A., Webber, C.E. & Harris, S. 2003. Factors affecting the distribution of small mammals in an urban area. *Mammal Review* 33, 95-100.

Barbier, D., Ancelle, T., Martin-Bouyer, G. 1983. Seroepidemiological survey of toxoplasmosis in La Guadeloupe, French West Indies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32, 935-942.

Baril, L., Ancelle, T., Thulliez, P., Goulet, V., Tirard, V. & Carme, B. 1996. Facteurs de risque d'acquisition de la toxoplasmose chez les femmes enceintes en France (1995). *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 16, 73-75.

Barratt, D.G. 1997. Home range size, habitat utilisation and movement patterns of suburban and farm cats *Felis catus*. *Ecography* 20, 271-280.

Bayly, C.P. 1976. Observations on the food of the feral cat (*Felis catus*) in an arid environment. *South Australian Naturalist* 51, 22-24.

Benenson, M.W., Takafuji, E.T., Lemon, S.M., Greenup, R.L., & Sulzer, A.J. 1982. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *The New England journal of medicine* 307, 666-669.

Bettiol, S., Obendorf, D., Nowarkowski, M., Milstein, T., Goldsmid, J. 2000. Earthworms as paratenic hosts of toxoplasmosis in eastern barred bandicoots in Tasmania. *Journal of Wildlife Diseases* 36,145-148.

Beverley, J.K.A. 1959 Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. *Nature* 183, 1348-1349.

Biró, Z.S., Lanszki, J., Szemethy, L., Heltai, M., Randi, E. 2005. Feeding habits of feral domestic cats (*Felis catus*), wild cats (*Felis silvestris*) and their hybrids: trophic niche overlap among cat groups in Hungary. *Journal of Zoology* 266, 187-196.

Blair, R.B. 2001. Birds and butterflies along urban gradients in two ecoregions of the U.S. In: Lockwood J.L., McKinney, M.L., Eds. Biotic Homogenization. Norwell (M.A.): Kluwer, pp 33-56.

Blueweiss, L., Fox, H., Kudzma, V., Nakashima, D., Peters, R., & Sams, S. 1978. Relationships between body size and some life history parameters. *Oecologia* 37, 257-272.

Bobić, B., Jevremović, I., Marinković, J., Šibalić, D., & Djurković-Djaković, O. 1998. Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *European Journal of Epidemiology* 14, 605-610.

Bouyer, J. 1991. La régression logistique en épidémiologie. Partie I. *Revue d'Epidémiologie et Santé Publique* 39, 79-87.

Bowie, W.R., King, A., 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 Lancet* 350, 173-177.

Bowman, J., Graham, F., & Dilworth, T. 2001. Landscape context and small-mammal abundance in a managed forest. *Forest ecology and management* 140, 249-255.

Bradley, C.A., & Altizer, S. 2007. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 95-102.

Brézin, A.P., Thulliez, P., Couvreur, J., Nobre, R., Mcleod, R., & Mets, M.B. 2003. Ophthalmic outcomes after prenatal and postnatal treatment of congenital toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology* 135, 779-784.

Brown, C.R., & Brown, M.B. 1986. Ectoparasitism as a cost of coloniality in cliff swallows (*Hirund pyrrhonota*). *Ecology* 1986, 1206-1218.

Butet, A., Paillat, G., Delettre, Y. 2006. Factors driving small rodents assemblages from field boundaries in agricultural landscapes of western France. *Landscape Ecology* 21, 449-461.

Butet, A., & Spitz, F. 2001. Campagnols cycliques : un demi siècle de recherches. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 56, 353-372.

Buxton, D. 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii, Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Veterinary Research* 29, 289-310.

-C-

Cabannes, A., Lucchese, F., Hernandez, J.C., Pelse, H., Biesel, N., Eymonnot, M., Appriou, M., & Tribouley-Duret, J. 1997. Enquête séroépidémiologique sur *Toxoplasma gondii* chez les ovins, bovins et félins dans le département de la gironde. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 15, 10-22.

Cabannes, A., Lucchese, F., Pelse, H., Biesel, N., Eymonnot, M., Appriou, M. & Tribouley-Duret, J. 1998. La prévalence de la toxoplasmose chez les animaux familiers dans le Sud-Ouest de la France. *Médecine et Maladies Infectieuses* 28, 647-651.

Calhoon, R.E., & Haspel, C. 1989. Urban cat populations compared by season, subhabitat and supplemental feeding. *The Journal of Animal Ecology* 58, 321-328.

Calvete, C., Estrada, R., Angulo, E., Cabezas-Ruiz, S. 2004. Habitat factors related to wild rabbit conservation in an agricultural landscape. *Landscape Ecology* 19, 531-542.

Carme, B., Aznar, C., Motard, A., Demar, M., de Thoisy, B. 2002. Serologic survey of *Toxoplasma gondii* in noncarnivorous free-ranging neotropical mammals in French Guiana. *Vector Borne and Zoonotic diseases* 2, 11-17.

Castien, E., & Gosalbez, J. 1995. Caractérisation de la niche trophique de *Talpa europaea* Linnaeus, 1758 dans les Pyrénées occidentales (nord de la péninsule ibérique). *Mammalia* 59, 43-50.

Cleaveland, S., Laurenson, M.K. and Taylor, L.H. 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 356, 991-999.

Chabaud, A.G. 1954. Sur le cycle évolutif des spirurides et des nematodes ayant une biologie comparable : valeur systématique de caractères biologiques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 29, 42-88.

Chagot, P. 1993. Organisation socio-spatiale du chat domestique (*Felis catus*). Cas de la population feline du cimetière parisien de Montmartre. DESS d'Ethologie Appliquée et Chronobiologie du Comportement, Université Paris XIII, 25 pp. *In:* Artois, M., Duchene, M.J., Pericard, J.M., & Xemar, V. 2002. Le chat errant ou haret. Encyclopédie des carnivores de France, n°18. Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères, 50 pp.

Chalmers, R.M., Sturdee, A.P., Bull, S.A., Miller, A., & Wright, S.E. 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitology Research* 83, 478-482.

Chamberlain, P.M., Docton, F.L., & Cole, CR. 1953 Tosoplasmosis. II. Intra-uterine infection in dogs, premature birth and presence of organisms in milk. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 82, 198-200

Chessum, B.S. 1972. Reactivation of *Toxoplasma* oocyst production in the cat by infection with *Isospora felis*. *British Veterinary Journal* 128, 33-36.

Choisy, M., Brown, S.P., Lafferty, K.D. & Thomas, F. 2003. Evolution of trophic transmission in parasites: why add intermediate hosts? *The American Naturalist* 162, 172-181.

Cimon, B., Penn, P., Brun, S. & Chabasse, D. 2002. Comment résoudre les difficultés du sérodiagnostic de la toxoplasmose chez la femme enceinte ? *Immuno-analyse et Biologie spécialisée* 17, 143-147.

Clergeau, P. 2007. *Une écologie du paysage urbain*. Editions Apogée, Rennes, 142 p.

Coman, B.J. 1975. The survival of *Taenia pisiformis* eggs under laboratory conditions and in the field environment. *Australian Veterinary Journal* 51, 560-565.

Coman, B.J., & Brunner, H. 1972. Food habits of the feral cats in Victoria. *The Journal of Wildlife Management* 36, 848-853.

Combes, C. 1995. Interactions durables. Masson, Paris.

Combes, C. 2001. L'art d'être parasite. Les associations du vivant. Flammarion, Paris.

Contesse, P., Hegglin, D., Gloor, S., Bontadina, F. & Deplazes, P. 2004. The diet of urban foxes (*Vulpes vulpes*) and the availability of anthropogenic food in the city of Zurich, Switzerland. *Mammalian Biology - Zeitschrift fur Saugetierkunde* 69, 81-95.

Cook, A.J.C., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E. & Dunn, D.T. 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *British Medical Journal* 321, 142-147.

Corbett, L.K. 1979. Feeding ecology and social organization of wildcats (*Felis silvetris*) and domestic cats (*Felis catus*) in Scotland. Scotland: University of Aberdeen.

Courchamp, F. 1996. Etude de l'épidémiologie du Virus de l'Immunodéficience Féline dans les populations de chats domestiques (*Felis catus*). Rhône-Alpes. Lyon. University Claude Bernard - Lyon I. 212 pp.

Courchamp, F., & Pontier, D. 1994. Feline immunodeficiency virus: an epidemiological review. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* 317, 1123-1134.

Coutinho, S.G., Lobo, R., & Dutra, G. 1982. Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area in Brazil. *The Journal of Parasitology* 68, 866-868.

Croci, S. 2007. Urbanisation et biodiversité : traits biologiques et facteurs environnementaux associés à l'organisation des communautés animales le long d'un gradient rural-urbain. Thèse d'Université, Université de Rennes.

-D-

Dabritz, H.A., Atwill, E.R., Gardner, I.A., Miller, M.A., & Conrad P.A. 2006. Outdoor fecal deposition by free-roaming cats and attitudes of cat owners and nonowners toward stray pets, wildlife, and water pollution. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229, 74-81.

Dajoz, R. 2006. Précis d'écologie. 8e édition, Dunod, 640pp.

D'Amore, E., Falcone, E., Busani, L., & Tollis, M. 1997. A serological survey of feline Immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* in stray cats. *Veterinary Research Communications* 21, 355-359.

Dardé, M.L. 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto superiore di sanità* 40, 57-63.

Dards, J.L. 1981. Habitat utilization by feral cats in Portsmouth Dockyard. *Ecology and Control of Feral Cats,* pp 30-46. Universities Federation for Animal Welfare, London.

Daszak, P., Cunningham, A.A., & Hyatt, A.D. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica* 78, 103-116.

Davies, C.M., Ferguson, C.M., Kaucner, C., Krogh, M., Altavilla, N., Deere, D.A., Ashbolt, N. 2004. Dispersion and transport of *Cryptosporidium* oocysts from fecal pats under simulated rainfall events. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1151-1159.

Degen, A.A., Kan, M., Khokhlova, I.S., Krasnov, B.R., & Barraclough, T.G. 1998. Average daily metabolic rate of rodents: habitat and dietary comparisons. *Functional Ecology* 12, 63-73.

Delattre, P. 1987. La belette et l'Hermine. Encyclopédie des Carnivores de France, n°11-12. Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères, 73 pp.

Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Truchetet, D., Musard, P., Toussaint, M., Stahl, P., Poulle, M.L., Artois, M., Damange, J.P., & Quéré, J.P. 1992. Land use patterns and types of common vole (*Microtus arvalis*) population kinetics. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 39, 153-169.

Delattre, P., De Sousa, B., Fichet-Calvet, E., Quéré, J.P., & Giraudoux, P. 1999. Vole outbreaks in a landscape context: evidence from a six year study of *Microtus arvalis*. *Landscape Ecology* 14, 401-412.

de Moura, L., Bahia-Oliveira, L.M., Wada, M.Y., Jones, J.L., Tuboi, S.H., Carmo, E.H., Ramalho, W.M., Camargo, N.J., Trevisan, R., Graca, R.M., da Silva, A.J., Moura, I., Dubey, J.P., & Garrett, D.O. 2006. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerging Infectious Diseases* 12**,** 326-329.

Deplazes, P., Hegglin, D., Gloor, S., & Romig, T. 2004. Wilderness in the city: the urbanization of *Echnicoccus multilocularis*. *Trends in Parasitology* 20, 77-84.

Derenne, P., 1976. Notes sur la biologie du chat haret de kerguelen. *Mammalia* 40, 532-595.

Derenne, P., & Mougin, J.L. 1976. Données crâniométriques sur le lapin et le chat haret de l'Ile aux Cochons, Archipel Crozet. *Mammalia* 40, 495-516.

Derouin, F., Garin, Y.J.F., Buffard, C. Berthelot, & F. Petithory, J.C. 1994. Groupe de travail toxoplasmose du contrôle national de qualité en Parasitologie. Etude multicentrique de la sérologie toxoplasmique par différents réactifs ELISA commercialisés. *Bulletin of the World Health Organization* 72, 249-256.

De Thoisy B, Demar M, Aznar C, Carme B, 2003. Ecologic correlates of Toxoplasma gondii exposure in free-ranging neotropical mammals. Journal of Wildlife Diseases 39:456-459.

Devillard S, Say L, Pontier D, 2003. Dispersal pattern of domestic cats (*Felis catus*) in a promiscuous urban population: do female disperse or die? *Journal of Animal Ecology* 72, 203-211.

Dickman C.R., 1987. Habitat fragmentation and vertebrate species richness in urban environment. *The Journal of applied ecology* 24, 337-351.

Dickman, C.R., & Doncaster, C.P. 1987. The Ecology of Small Mammals in Urban Habitats. I. Populations in a Patchy Environment. *The Journal of Animal Ecology* 56, 629-640.

Dilks P.J. 1979. Observation on the food of feral cats on Campbell Island. *New Zealand Journal of Ecology* 2, 64-66.

Dobson, A. & Foufopoulos, J. 2000. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 356, 1001-1012.

Doby, J.M., Desmonts, G., Beaucournu, J.C., & Akinchina, G.T. 1974. Recherche immunologique systématique de toxoplasmose chez les petits mammifères sauvages en France. *Folia Parasitologica (Praha)* 21, 289-300.

Dorny, P., Speybroeck, N., Verstraete, S., Baeke, M., De Becker, A., Berkvens, D., & Vercruysse, J. 2002. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *The Veterinary Record* 151, 626-629.

Dubey, J.P. 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *Journal of Parasitology* 81, 410-415.

Dubey, J.P. 1996. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *Journal of Parasitology* 82, 957-961.

Dubey, J.P. 1998a. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal For Parasitology* 28, 1019-1024.

Dubey, J.P. 1998b *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *The Journal of Parasitology* 84, 862-865.

Dubey, J.P. 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Veterinary Parasitology* 140, 69-75.

Dubey, J.P., & Beattie, C.P. 1988. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton.

Dubey, J.P., & Frenkel, J.K. 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. Protozoology 19, 155-177.

Dubey, J.P., & Frenkel, J.K. 1974. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids *Veterinary Pathology* 11, 350-379.

Dubey, J.P., & Frenkel, J.K. 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of Toxoplasma cysts. *The Journal of Protozoology* 23, 537-546.

Dubey, J.P., & Frenkel, J.K. 1998. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary Parasitology* 77, 1-32.

Dubey, J.P., & Hoover, E.A. 1977. Attempted transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kittens. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 170, 538-540.

Dubey, J.P., Lappin, M.R. & Thulliez, P. 1995a. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. *Journal Of American Veterinary Medical Association* 207, 179-185.

Dubey, J.P., Lappin, M.R., & Thulliez, P. 1995b. Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *The Journal of Parasitology* 81, 887-893.

Dubey, J.P., Lunney, J.K., Kwok, O.C.H., Ashford, D.A., & Thulliez, P. 1996a. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *The Journal of Parasitology* 82, 438-443.

Dubey, J.P., Mattix, M.E., & Lipscomb, T.P. 1996b. Lesions of Neonatally Induced Toxoplasmosis in Cats. *Veterinary Pathology* 33, 290-295.

Dubey, J.P., Miller, N.L., & Frenkel, J.K. 1970. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *Journal of Experimental Medicine* 132, 636-662.

Dubey, J.P., Navarro, I.T., Graham, D.H., Dahl, E., Freire, R.L., Prudencio, L.B., Sreekumar, C., Vianna, M.C.B., & Lehmann, T. 2003c. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology* 117, 229-234.

Dubey, J.P., Saville, W.J.A., Stanek, J.F. & Reed, S.M. 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Domestic Cats From Rural Ohio. *Journal of Parasitology* 88, 802-803.

Dubey, J.P., Swan, G.V., & Frenkel, J.K. 1972. A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* from the feces of cats. *The Journal of Parasitology* 58, 1005-1006.

Dubey, J.P., Thulliez, P., Weigel, R.M., Andrews, C.D., Lind, P. & Powell, E.C. 1995d. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *American Journal of Veterinary Research* 56, 1030-1036.

Dubey, J.P., Venturini, M.C., Venturini, L., Piscopo, M., Graham, D.H., Dahl, E., Sreekumar, C., Vianna, M.C.B. & Lehmann, T. 2003a. Isolation and Genotyping of *Toxoplasma gondii* From Free-Ranging Chickens Fom Argentina. *The Journal of Parasitology* 89, 1063-1064.

Dubey, J.P., Weigel, R.M., Siegel, A.M., Thuilliez, P., Kitron, U.D., Mitchell, M.A., Mannelli, A., Mateus-Pinilla, N.E., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., & Todd, K.S. 1995c. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *The Journal of Parasitology* 81, 723-729.

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.H., Romand, S. & Thulliez, P. 2003b. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology* 116, 275-296.

Duncanson, P., Terry, R.S., Smith, J.E., & Hide, G. 2001. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *International Journal for Parasitology* 31, 1699-1703.

Dumètre, A., Dardé, M.L. 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiology Reviews* 27, 651-661.

-E-

Eckert, J., & Deplazes, P. 1999. Alveolar echinococcosis in humans: the current situation in Central Europe and the need for counter-measures. *Parasitology Today* 15, 315-319.

El Nahal, H.S., Morsy, T.A., Bassili, W.R., El Missiry, A.G., & Saleh, M.S. 1982. Antibodies against three parasites of medical importance in *Rattus sp.* collected in Giza Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 12, 287-293.

Ernest, S.K.M. 2003. Life history characteristics of placental non-volant mammals. *Ecology* 84, 3402.

Escutenaire, S., Chalon, P., De Jaegere, F., Karelle-Bui, L., Mees, G., Brochier, B., Rozenfeld, F., & Pastoret, P.P. 2002. Behavioral, physiologic, and habitat influences on the dynamics of *Puumala* virus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerging Infectious Diseases* 8, 930-936.

Euzet, L., & Combes, C. 1980. Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. *Mémoires de la Société Zoologique de France* 40, 239-285.

Ewald, P.W. 1995. The evolution of virulence: a unifying link between parasitology and ecology. *Journal of Parasitology* 81, 659-669.

-F-

Faeth, S.H., Warren, P.S., Shochat, E., & Marussich, W.A. 2005. Trophic dynamics in urban communities. *BioScience* 55, 399-407.

Fagen, R.M. 1978. Population structure and social behavior in domestic cat (Felis catus). *Carnivore Genetics Newsletter* 3, 276–281.

Ferguson, D.J.P. 2002. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends in Parasitology* 18, 351-355.

Fernandez, F., Ouvina, G., Clot, E., Fernandez Guido, R. & Codoni, C. 1995. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats in the western part of Great Buenos Aires, Argentina, 1993. *Veterinary Parasitology* 59, 75-79.

Fichet-Calvet, E., Giraudoux, P., Quéré, J.P., Ashford, R.W., & Delattre, P. 2003. Is the prevalence of *Taenia taeniaeformis* in *Microtus arvalis* dependent on population density? *The Journal of Parasitology* 89, 1147-1152.

Fitzgerald, B.M., & Karl, B.J. 1979. Foods of feral house cats (*Felis catus* L.) in forest of the Orongorongo Valley, Wellington. *New Zealand journal of zoology* 6, 107-126.

Frenkel, J.K., Hassanein, K.L., Hassanein, R.S., Brown, E., Thulliez, P., & Quintero-Nunez, R. 1995. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama city, Panama: A five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53, 458-468.

Frenkel, J.K., Miller, N.L. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 164, 893-896.

Frenkel, J.K., Ruiz, A. & Chinchilla, M. 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24, 439-443.

Freyre, A., Dubey, J.P., Smith, D.D., & Frenkel, J.K. 1989. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *Journal of Parasitology* 75, 750-755.

Frölich, K., Wisser, J., Schmüser, H., Fehlberg, U., Neubauer, H., Grunow, R., Nikolaou, K., Priemer, J., Thiede, S., Streich, W., & Speck, S. 2003. Epizootiologic and ecologic investigations of European brown hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. *J Wildl Dis* 39, 751-761.

Fromont, E. 1997. Analyse comparative de la transmission de cinq virus dans des populations de chats domestiques (*Felis catus*). Thèse d'université, Université Claude Bernard Lyon 1, France, 160 pp.

-G-

Galvan Ramirez, M.L., Sanchez-Vargas, G., Vielma Sandoval, M. & Soto-Mancilla, J.L. 1999. Presence of anti-*Toxoplasma* antibodies in humans an their cats in the urban zone of Guadalajara. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32, 483-488.

Garcia, J.L., Navarro, I.T., Ogawa, L., de Oliveira, R.C. 1999. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e case de propriedades rurais do municipio de Jaguapita, Estado do ParanaÂ, Brasil. *Ciênc Rural (Santa Maria)* 29, 99-104.

Gascoyne, S.C., Laurenson, M.K., Lelo, S., & Borner, M. 1993. Rabies in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Serengeti region, Tanzania. *Journal of Wildlife Diseases* 29, 396-402.

Gauss, C.B.L., Almeria, S., Ortuno, A., Garcia, F., Dubey, J.P. 2003. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Domestic Cats from Barcelona, Spain. *The Journal of Parasitology* 89, 1067-1068.

Genchi, G., Polidori, G.A., Zaghini, L., & Lanfranchi, P., 1991. Aspetti epidemiologici della toxoplasmosi nell'allevamento intensivo del suino. Arch. Vet. Ital. 42, 105–111. *In*: Dubey, J.P., & Frenkel, J.K. 1998. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary Parasitology* 77, 1-32.

Geuse, P., Bauchau, V., & Le Boulengk, E. 1985. Distribution and population dynamics of rodent in a patchy woodland habitat of central Belgium: preliminary results. *Acta Zoologica Fennica* 173, 65-68.

Gethings, P.M., Stephens, G.L., Wills, J.M., Howard, P., Balfour, A.H., Wright, A.I., Morgan, K.L. 1987. Prevalence of chlamydia, toxoplasma, toxocara and ringworm in farm cats in south-west England. *The Veterinary Record* 121, 213-216.

GIEC (Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat). 2007. Climate change 2007 : the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Summary for Policymakers. IPCC Secretariat, Geneva, Switzerland. 21p.

Giraudoux, P., Delattre, P., Habert, M., Quéré, J.P., Deblay, S., Defaut, R., Duhamel, R., Moissenet, M.F., Salvi, D., & Truchetet, D. 1997. Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris scherman*): a land usage and landscape perspective. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 66, 47-60.

Giraudoux, P., Craig, P.S., Delattre, P., Bao, G., Bartholomot, B., Harraga, S., Quéré, J.P., Raoul, F., Wang, Y., Shi, D., & Vuitton, D.A. 2003. Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology* 127, S121-S131.

Grigg, M.E., Bonnefoy, S., Hehl, A.B., Suzuki, Y., & Boothroyd, J.C. 2001. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 294, 161-165.

Guislain M.H. 2006. Etude à différentes fenêtres de perception des facteurs impliqués dans la transmission d'*Echinococcus multilocularis*. Thèse d'Université, Université de Franche-Comté, France, 163pp.

Guislain M.H., Raoul F., Poulle M.L., & Giraudoux P. 2007. Fox faeces and vole distribution on a local range: ecological data in a parasitological perspective for *Echinococcus multilocularis. Parasites* 14, 299-308.

Gustafsson, K., & Uggla, A. 1994. Serologic survey for Toxoplasma gondii infection in the brown hare (Lepus europaeus P.) in Sweden. *J Wildl Dis* 30, 201-204.

Gustafsson, K., Uggla, A., & Järplid, B. 1997. *Toxoplasma gondii* infection in the montain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). I. Pathology. *Journal of Comparative Pathology* 117, 351-360.

-H-

Haddadzadeh, H.R., Khazraiinia, P., Aslani, M., Rezaeian, M., Jamshidi, S., Taheri, M. & Bahonar, A. 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in stray and household cats in Tehran. *Veterinary Parasitology* 138, 211-216.

Haelewyn, C.M. 1979. Le comportement du chat et des chats errants. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Hall, S.M., Pandit, A., Golwilkar, A., & Williams, T.S. 1999. How do Jains get toxoplasma infection? *The Lancet* 354, 468-487.

Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., & Samuel, M.D. 2002. Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Science* 296, 2158-2162.

Haspel, C., & Calhoon, R.E. 1989. Home ranges of free ranging cats (*Felis catus*) in Brooklyn, New York. *Canadian Journal of Zoology* 67, 178-181.

Haspel, C., & Calhoon, R.E. 1990. The interdependence of humans and free-ranging cats in Brooklyn, New York. *Anthrozoös* 3, 155-161.

Hole, F. 1994. *In:* Origins of Agriculture, S. Bunney, ED. (Cambrige Encyclopedia of Human Evolution, Cambrige University Press, Cambridge, 1994), pp. 373-379.

Holland, C., O'Connor, P., Taylor, M.R.H., Hughes, G., Girdwood, R.A., & Smith, H. 1991. Families, parks, gardens and toxocariosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 23, 225-231.

Holland, G.N. 2003. Ocular toxoplasmosis: A global reassessment. Part I: epidemiology and course of the disease. *American Journal of Ophthalmology* 136, 973-988.

Holshuh, H.J., Sherrod, A.E., Taylor, C.R., Andrews, B.F., & Howard, E.B. 1985. Toxoplasmosis in a feral northern fur seal. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 187, 1229-1230.

Howe, D.K., Sibley, L.D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases* 172, 1561-1566.

Hubálek, Z. 2005. North Atlantic weather oscillation and human infectious diseases in the Czech Republic, 1951-2003. *European Journal of Epidemiology* 20, 263-270.

Hubbs, E.L. 1951. Food habits of feral house cats in the Sacramento Valley. *California Fish and Game* 37, 177-189.

Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., & Dobson, A.P. 2002. Ecology of wildlife diseases. In: Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., & Dobson, A.P. (Eds). *The ecology of wildlife diseases.* Oxford University Press, Oxford, 2002.

Hurrell, J.W. 1995. Decadal Trends in the North Atlantic Oscillation: Regional Temperatures and Precipitation. *Science* 269, 676-679.

Hutchison, W.M. 1967. The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 61, 80-89.

-I-

IFEN (Institut Français de l'Environnement). 2006. L'environnement en France. Les dynamiques socio-économiques. Synthèse, octobre 2006, 500pp.

Isaac-Renton, J.L., Bowie, W.R., King, A., Irwin, G.S., Ong, C.S., Fung, C.P., Shokeir, M.O., & Dubey, J.P. 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2278-2280.

Ishida, Y., & Shimizu, M. 1998. Influence of social rank on defecating behaviors in feral cats. *Journal of Ethology* 16, 15-21.

Izawa, M., Doi, T., Ono, Y. 1982. Grouping patterns of feral cats (*Felis catus*) living on small island in Japan. *Japanese Journal of Ecology* 32, 373-382.

-J-

Jackson, M.H., & Hutchison, W.M. 1986. Toxoplasmosis in a wild rodent population of central Scotland and a possible explanation of the mode of transmission. *Journal of Zoology, London (A)* 209, 549-557.

Jittapalapong, S., Nimsupan, B., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Kabeya, H. & Maruyama, S. 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. *Veterinary Parasitology* 145, 138-141.

Johnson, A.M. 1997. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus toxoplasma. *Parasitology Today* 13, 393-397.

Jones, E. 1977. Ecology of the feral cat, *Felis catus* L. (Carnivora: Felidae) on Macquarie Island. *Australian Wildlife Research* 4, 249-262.

-K-

Kapperud, G. 1978. Survey for toxoplasmosis in wild and domestic animals from Norway and Sweden. *Journal of Wildlife Diseases* 14, 157-162.

Kniel, K.E., Lindsay, D.S., Sumner, S.S., Hackney, C.R., Pierson, M.D., Dubey, J.P. 2002. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. *The Journal of Parasitology* 88, 790-793.

Konecny, M.J. 1983. Behavioural ecology of feral house cats in the Galapagos Islands, Ecuador. Ph. D. Thesis, University of Florida Gainsville. 127 p.

Kowarik, I. 1995. On the role of alien species in urban flora and vegetation. In: Pysek, P, Prach, K., Rejmánek, M., Wade, P.M., eds. Plant Invasions – General aspects and special problems. Amsterdam (Netherlands): SPB Academic, pp 85-103.

Krebs, J. 1997. Report on bovine tuberculosis in cattle and badgers. London: MAFF Publications.

Kruse, H., Kirkemo, A.M., & Handeland, K. 2004. Wildlife as source of zoonostic infections. *Emerging Infectious Diseases* 10, 2067-2072.

Kuczynska, E., & Shelton, D.R. 1999. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2820-2826.

Kuo, I., & Rao, N.A. 1999. Ocular disease in AIDS. *Seminars in Immunopathology* 21, 161-177.

-L-

Lappin, M.R., Marks, A., Greene, C.E., Collins, J.K., Carman, J., Reif, J.S., & Powell, C.C. 1992. Serologic prevalence of selected infectious diseases in cats with uveitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210, 1005-1009.

Laundre, J. 1977. The daytime behaviour of domestic cats in a free-roaming population. *Animal Behaviour* 25, 990-998.

Lavelle, P. 1988. Earthworm activities and the soil system. *Biology and Fertility of Soils* 6, 237-251.

Legay, J.M., & Pontier, D. 1983. Age, courbe de survie et taille des groupes dans les populations de chats. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 296/III, 33-36.

Lehmann, T., Graham, D.H., Dahl, E., Sreekumar, C., Launer, F., Corn, J.L., Gamble, H.R., Dubey, J.P. 2003. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infection, Genetics and Evolution* 3, 135-141.

Le Louarn, H., & Quéré, J.P. 2003. Les Rongeurs de France. Faunistique et biologie. INRA éditions, Paris, 256pp.

Leport, C., & Remington, J.S. 1992. Toxoplasmose au cours du SIDA. *Presse Medicale* 21,1165-1171.

Liberek, M. 1999. Eco-éthologie du chat sauvage *Felis s. silvestris*, Schreber 1777 dans le Jura vaudois (Suisse); influence de la couverture neigeuse. Thèse d'Université, Neuchâtel, Suisse, 257pp.

Liberg, O. 1980. Spacing pattern in a population of rural free-roaming domestic cats. *Oikos* 35, 336-349.

Liberg, O. 1981. Predation and social behaviour in a population of domestic cats. An evolutionary perspective. Ph. D. Thesis, Univ. Lund (Sweden), 135 p.

Liberg, O. 1984. Food habits and prey impact by feral and house-based domestic cats in a rural area in southern Sweden. *Journal of Mammalogy* 65, 424-432.

Lickey, A.L.A., Kennedy, M., Patton, S., & Ramsay, E.C. 2005. Serologic survey of domestic felids in the Peten region of Guatemala. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36, 121-123.

Lin, D.S., Bowman, D.D., Jacobson, R.H. 1992. Immunological changes in cats with concurrent *Toxoplasma gondii* and Feline Immunodeficiency Virus infections. *Journal of Clinical Microbiology* 30,17-24.

Lin, D.S., Lai, S.S., Bowman, D.D., Jacobson, R.H., Barr, M.C., & Giovengo, S.L. 1990. Feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus, *Toxoplasma gondii*, and intestinal parasitic infections in Taiwanese cats. *The British Veterinary Journal* 146, 468- 475.

Lind, P., & Buxton, D. 2000. Veterinary aspects of *Toxoplasma* infection. In: "Congenital toxoplasmosis", Ambroise-Thomas, P., & Pedersen, E., Ed., Springer-Verlag, Paris, 261-269.

Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., & Dubey, J.P. 1997. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. *The Compendium* 19, 448-461.

Lindsay, D.S., Collins, M.V., Mitchell, S.M., Cole, R.A., Flick, G.J., Wetch, C.N., Lindquist, A, & Dubey, J.P. 2003. Sproulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *The Journal of Eukaryotic Eicrobiology* 50, 687-688.

Lindsay, D.S., Phelps, K.K., Smith, S.A., Flick, G., Sumner, S.S., & Dubey, J.P. 2001. Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, S197-S198.

Lindstedt, S.L., Miller, B.J., & Buskirk, S.W. 1986. Home range, time and body size in mammals. *Ecology* 67, 413-418.

LoGiudice, K., Ostfeld, R.S, Schmidt, K.A., & Keesing, F. 2003. The ecology of infectious disease: Effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 100, 567-571.

Loison, A., Jullien, J.M., Menaut, P. 1999. Relationship between chamois and isard survival and variation in global and local climate regimes: contrasting examples from the Alps and Pyrenees. *Ecological Bulletins* 47, 126-136.

Lombardi, L., Fernández, N., Moreno, S., & Villafuerte, R. 2003. Habitat-related differences in rabbit (Oryctolagus cuniculus) abundance, distribution, and activity. *Journal of Mammalogy* 84, 26-36.

Lubroth, J.S., Dreesen, D.D., Ridenhour, R.A. 1983. The role of rodents and other wildlife in the epidemiology of swine toxoplasmosis. *Preventive Veterinary Medicine* 1, 169–178.

Lucas, S.R.R., Hagiwara, M.K., Loureiro, V., Ikesaki, J.Y.H. & Birgel, E.H. 1999. *Toxoplasma gondii* infection in brazilian domestic outpatient cats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 41, 221-224.

Lucet, J.C., Bailly, M.P., Bedos, J.P., Wolff, M., Gachot, B., & Vachon, F. 1993. Septic shock due to toxoplasmosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Chest* 104, 1054-1058.

Luft, B.J., Hafner, R., Korzun, A.H., Leport, C., Antoniskis, D., Bosler, E.M., Bourland, D.D. 3rd, Uttamchandani, R., Fuhrer, J., Jacobson, J., Morlat, P., Vilde, J.L., & Remington, J.S. 1993. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine* 329, 995-1000.

Luria, B. J., Levy, J. K., Lappin, M.R., Breitschwerdt, B., Legendre, A.M., Hernandez, J.A., Gorman, S.P. & Lee, I.T. 2004. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6, 287-296.

-M-

Macdonald, D.W. 1983. The ecology of carnivore social behaviour. *Nature* 301, 379-384.

Mackin-Rogalska, R., Pinowski, J., Solon, J., & Wojcik, Z. 1988. Changes in vegetation, avifauna, and small mammals in a suburban habitat. *Polish Ecological Studies* 14, 293-330.

Malo, A.F., Lozano, J., Huertas, D.L., & Virgos, E. 2004. A change of diet from rodents to rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Is the wildcat (*Felis silvestris*) a specialist predator? *Journal of Zoology, London (A)* 263, 401-407.

Marpeau, L. 2006. La femme enceinte et le risque infectieux : obligations, recommandations, precautions et... surconsommation. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34, 185-186.

Marshall, W.H. 1961. A note on the food habits of feral cats on Little Barrier Island, New Zealand. *New Zealand journal of Science* 4, 822-824.

Marshall, P.A., Hughes, J.M., Williams, R.H., Smith, J.E., Murphy, R.G., & Hide, G. 2004. Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus. Parasitology* 128, 39-42

Maruyama, S., Hiraga, S., Yokoyama, E., Naoi, M., Tsuruoka, Y., Ogura, Y., Tamura, K., Namba, S., Kameyama, Y., Nakamura, S. & Katsube, Y. 1998. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* Infections among Pet Cats in Kanagawa and Saitama Prefectures. *Journal of veterinary medical Science* 60, 997-1000.

Maruyama, S., Kabeya, H., Nakao, R., Tanaka, S., Sakai, T., Xuan, X., Katsube, Y. & Mikami, T. 2003. Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV Infections in Domestic Cats in Japan. *Microbiology and Immunology* 47, 147-153.

Marzluff, J.M. 2001. Worldwide urbanization and its effects on birds. In: Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World (Marzluff, J.M. et al., Eds), pp 19-38, Kluwer Academic Publishers.

McIntyre, N.E. 2000. Ecology of urban arthropods: a review and a call to action. *Annals of the Entomological Society of America* 93, 825-835.

McKinney, M.L. 2002. Urbanization, biodiversity, and conservation. *BioScience* 52, 883-890.

McOrist, S., Boid, R., Jones, T.W., Easterbee, N., Hubbard, A.L., Jarrett, O. 1991. Some viral and protozool diseases in the European Wildcat (*Felis silvestris*). *Journal of Wildlife Diseases* 27, 693-696.

Meehan, A. 1984. Rats and mice: their biology and control. The Rentokil library, Rentokil, Kent: Brown & Knight & Truscott Ltd, 383 pp.

Meireles, L.R., Galisteo, A.J., Pompeu, E. & Andrade, H.F. 2004. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Tropical Medicine and International Health* 9, 876-881.

Meunier, V., Jourda, S., Deville, M. & Guillot, J. 2006. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in serum and aqueous humor samples from cats with uveitis or systematic diseases in France. *Veterinary Parasitology* 138, 362-365.

Metzgar, L.H. 1967. An experimental comparison of screech owl predation on resident and transient white-food mice (*Peromyscus leucopus*). *Journal of Mammalogy* 48, 387-391.

Mir, N.A., Chhabra, M.B., Bhardwaj, R.M., & Gautam, O.P. 1982. Toxoplasma infection and some other protozoan parasites of the wild rat in India. *Indian Veterinary Journal* 59, 60-63.

Miró, G., Montoya, A., Jimenez, S., Frisuelos, C., Mateo, M. & Fuentes, I. 2004. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. *Veterinary Parasitology* 126, 249-255.

Moors, S.S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases* 1, 7-15.

Morgan, E.R., Milner-Gulland, E.J., Torgerson, P.R., & Medley, G.F. 2004. Ruminating on complexity: macroparasites of wildlife and livestock. *Trends in Ecology and Evolution* 19**,** 181-188.

-N-

Natoli, E. 1985. Spacing pattern in a colony of urban stray cats (*Felis catus L.*) in the historic centre of Rome. *Applied Animal Behaviour Science* 14, 289-304.

Natoli, E., & De Vito, E. 1991. Agonistic behaviour, dominance rank and copulatory success in a large multi-male feral cat, *Felis catus* L., colony in central Rome. *Animal Behaviour* 42, 227-241.

Neville, P. 1982. The control of feral cats in Tunisia. *In:* Feral cats: suggestions for control" The Universities Federation for Animal Welfare Ed., Potters Bar Herts.

Neville, P.F., & Remfry J., 1984. Effect of neutering on two groups of feral cats. *Veterinary Record* 114, 447-450.

Nicolas, J.A., & Pestre-Alexandre, M. 1993. Toxoplasmose : une zoonose transmissible à l'homme. *Médecine et maladies infectieuses* 23, 129-138

Niemelä, J. 1999. Is there a need for a theory of urban ecology? *Urban Ecosystems* 3, 57-65.

Nogami S, Moritomo T, Kamata H, Tamura Y, Sakai T, Nakagaki K, Motoyoshi S, 1998. Seroprevalence against *Toxoplasma gondii* in domiciled cats in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 60, 1001-1004.

Nurdian, Y. 2004. Soil contamination by intestinal parasite eggs in two urban villages of Jember. *Jurnal ILMU DASAR* 5, 50-54.

-O-

Olden, J.D., LeRoy Poff, N., & McKinney, M.L. 2006. Forecasting faunal and floral homogenization associated with human population geography in North America. *Biological Conservation* 127, 261-271.

Olsson, G.E., White, N., Hjältén, J., Ahlm, C. 2005. Habitat factors associated with bank voles (*Clethrionomys glareolus*) and concomitant hantavirus in northern Sweden. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 5, 315-323.

Oppenheimer, E. 1980. *Felis catus* population densities in urban areas. *Carnivore Genetics Newsletter* 4, 72-80.

Ostfled, R.S., & Holt, R.D. 2004. Are predators good for your health? Evaluating evidence for top-down regulation of zoonotic disease reservoirs. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2, 13-20.

Ottaviani, D., Cairns, S.C., Oliveiro, M., & Boitani, L. 2006. Body mass as a predictive variable of home-range size among italian mammals and birds. *Journal of Zoology* 269, 317-330.

Ottersen, G., Planque, B., Belgrano, A., Post, E., Reid, P., & Stenseth, N. 2001. Ecological effects of the North Atlantic Oscillation. *Oecologia* 128, 1-14.

Owen, M.R., & Trees, A.J. 1998. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology* 116, 299-304.

-P-

Page, R.J.C., Ross, J., & Bennett, D.H. 1992. A study of the home ranges, movements and behaviour of the feral cat population at Avonmouth docks. *Wildlife Research* 19, 263-277.

Page, R.J.C, Ross, J., & Bennett, D.H. 1993. Home ranges of feral cats at Avonmouth Docks (United Kingdom). *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 12, 23-26.

Pascal, M. 1980. Structure et dynamique de la population de chats harets de l'archipel des Kerguelen. *Mammalia* 44, 161-182.

Patz, J.A., Graczyk, T.K., Geller, N., Vittor, A.Y. 2000. Effects of environmental change on emerging parastic diseases. *International Journal For Parasitology* 30, 1395-1405.

Pestre-Alexandre, M., Dardé, M.L., Bouteille, B., Ben Naceur, S., Desnoyers, P. & Nicolas, J.A. 1984. Etude sérologique de la toxoplasmose chez le chat. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 2, 109-112.

Pontier, D. 1984. Contribution à la biologie et à la génétique des populations de chats domestiques (*Felis catus*). Thèse d'université, Université Claude Bernard Lyon 1, France, 145 pp.

Pontier, D. 1993. Analyse de la variabilité des traits d'histoire de vie chez les mammifères. Mémoire d'habilitation à diriger les recherches. University of Lyon, France.

Pontier, D., & Natoli, E. 1996. Male reproductive success in the domestic cat (*Felis catus* L.): a case history. *Behavioural Processes* 37, 85-88.

Pontier, D., Rioux, N., Heizmann, A. 1995. Evidence of selection on the orange allele in the domestic cat *Felis catus*: the role of social structure. *Oikos* 73, 299-308.

Pontier, D., Say, L., Debias, F., Bried, J., Thioulouse, J., Micol, T., & Natoli, E. 2002. The diet of feral cats (*Felis catus* L.) at five sites on the Grande Terre, Kerguelen archipelago. *Polar Biology* 25, 833-837.

Poulin, R. 1998. Evolutionary ecology of parasites: from individuals to communities. Chapman & Hall, London.

Powell, C.C., Brewer, M. & Lappin, M.R. 2001. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentaly infected lactating cats. *Veterinary Parasitology* 102, 29-33.

Price, P.W. 1980. Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, Princeton.

Price, P.W., Westoby, M., Rice, B., & Astatt, P.R. 1977. General concepts on the evolutionary biology of parasites. *Evolution* 31, 405-420.

-R-

Rabaud, C., May, T., Lucet, J.C., Leport, C., Ambroise-Thomas, P., & Canton, P. 1996. Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey. *Clinical Infectious Diseases* 23, 1249-1254.

Raimer, F., & Schneider, E., 1983. Vorkommen und Status der Wildkatze *Felis silvestris silvestris* Schreber, 1777 im Harz. *Säugetierkundliche Mitteilungen* 31, 61-68. *In*: Stahl, P., & Léger, F. 1992. Le chat sauvage d'Europe (*Felis silvestris* Schreber, 1777). Encyclopédie des carnivores de France, n°17. Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères, 50 pp.

Randa, L.A., & Yunger, J.A. 2006. Carnivore occurence along a urban-rural gradient: a landscape-level analysis. *Journal of Mammalogy* 87, 1154-1164.

Raoul, F. 2001. Ecologie de la transmission d'Echinococcus multilocularis chez le renard dans l'Est de la France : dépendance au paysage et à la relation proie-prédateur? Thèse d'Université, Université de Franche-Comté, France, 164pp.

Raoul, F., Defaut, R., Michelat, D., Montadert, M., Pépin, D., Quéré, J., Tissot, B., Delattre, P., & Giraudoux, P. 2001. Landscape effects on the population dynamics of small mammal communities and prey-resource variations: a preliminary analysis. *Revue d'Ecologie, Terre et Vie* 56, 339-352.

Raw, F. 1959. Estimating earthworm populations by using formalin. *Nature* 184, 1661-1662.

Robertson, L.J., Campbell, A.T., & Smith, H.V. 1992. Survival of Cryptosporidium oocysts under various environmental pressures. Applied Environmental Microbiology 58, 3494-3500.

Romand, S., Fromont, E., Pontier, D., & Thulliez, P. 2003. Détection par PCR en temps réel de *Toxoplasma gondii* dans les prélèvements de sol. Congrès de la Société Française de Parasitologie, 16-18 Décembre 2003, AFSSA, Maisons-Alfort.

Root, J.J., Calisher, C.H., & Beaty, B.J. 1999. Relationships of deer mouse movement, vegetative structure, and prevalence of infection with sin nombre virus. *Journal of Wildlife Diseases* 35, 311-318.

Remington, J.S. 1961. Experiments on the transmission of toxoplasmosis. *Survey of Opthalmology* 6, 856-867.

Ruiz, A., Frenkel, J.K., & Cerdas, L. 1973. Isolation of *Toxoplasma* from soil. *The Journal of Parasitology* 59, 204-206.

Ruiz, A., & Frenkel, J.K. 1980: Intermediate and transport hosts of Toxoplasma gondii in Costa Rica. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29, 1161-1166.

-S-

Salant, H., & Spira, D.T. 2004. A cross-sectional survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Jerusalem cats. *Veterinary Parasitology* 124, 167-177.

Salant, H., Markovics, A., Spira, D.T., & Hamburger, J. 2007. The development of a molecular approach for coprodiagnosis of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology* 146, 214-220.

Samad, M.A., Dey, B.C., Chowdhury, N.S., Akhtar, S. & Khan, M.R. 1997. Sero-epidemiological studies on *Toxoplasma gondii* infection in man and animals in Bangladesh. *Southeast Asian Journal of Tropical Medecine and Public Health* 28, 339-343.

Sanger, V.L., Chamberlain, D.M., Chamberlain, K.W., Cole, C.R., & Farrell, R.L. 1953. Toxoplasmosis. V. Isolation of Toxoplasma from cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 123, 87-91.

Sanger, V.L., & Cole, C.R. 1955. Toxoplasmosis. VI. Isolation of *Toxoplasma* from milk, placentas, and newborn pigs of asymptomatic carrier sows. *American Journal of Veterinary Research* 16, 536-539.

Sato, K., Iwamoto, I., & Yoshiki, K. 1993. Experimental toxoplasmosis in pregnant cats. *The Journal of veterinary medical science* 55, 1005-1009.

Saunders, G., White, P.C.L., Harris, S., & Rayner, J.M.V. 1993. Urban foxes (*Vulpes vulpes*): food acquisition, time and energy budgeting of a generalized predator. In: Mammals as Predators (vol. 65) (Dunstone, N., et Gorman, M.L. Eds), pp. 215-234, Oxford University Press.

Say, L., Pontier, D., & Natoli, E. 1999. High variation in multiple paternity of domestic cats (Felis catus) in relation to environmental conditions. *Proceedings of the Royal Society of London - B - (Biological Sciences)* 266, 2071-2074.

Say, L., Gaillard, J.M., & Pontier D. 2002. Spatio-temporal variation in cat population density in a sub-Antarctic environment. *Polar Biology* 25, 90-95.

Seabrook, W. 1990. The impact of the feral cat (*Felis catus*) on the native fauna of Aldabra atoll, Seychelles. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 45, 135-145.

Sedlák, K., Literák, I., Pavlásek, I., & Benák, J. 2001. Susceptibility of common voles to experimental toxoplasmosis. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 640-642.

Schulz, S., & Kroeger, A. 1992. Soil contamination with *Ascaris lumbricoides* eggs as an indicator of environmental hygiene in urban areas of north-east Brazil. *Journal of Tropical Medicine and Hygyene* 95, 95-103.

Shochat, E., Warren, P.S., Faeth, S.H., McIntyre, N.E., & Hope, D. 2006. From patterns to emerging processes in mechanistic urban ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 21, 186-191.

Sillero-Zubiri, C., King, A.A., & Macdonald, D.W. 1996. Rabies and mortality in Ethiopian wolves (*Canis simensis*). *Journal of Wildlife Diseases* 32, 80-86.

Silva, J.C.R., Gennari, S.M., Ragozo, A.M.A., Amajones, V.R., Magnabosco, C., Yai, L.E.O., Ferreira-Neto, J.S., & Dubey, J.P. 2002. Prevalence of Toxoplasma gondii antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and São Paulo, Brazil. *Journal of Parasitology* 88, 419-420.

Smith, D.D., & Frenkel, J.K. 1978. Cockroaches as vectors of *Sarcocystis muris* and other coccidia in the laboratory. *The Journal of Parasitology* 64, 315-319.

Sobrino, R., Cabezon, O., Millan, J., Pabon, M., Arnal, M.C., Luco, D.F., Gortazar, C., Dubey, J.P., & Almeria, S. 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 148, 187-192.

Sohn, W.M., Nam, H.W. 1999. Western blot analysis of stray cat sera against *Toxoplasma gondii* and the diagnostic availability of monoclonal antibodies in sandwitch-ELISA. *The Korean Journal of Parasitology* 37, 249-256.

Speakman, J.R. 2005. Body size, energy metabolism and lifespan. *The Journal of Experimental Biology* 208, 1717-1730.

Sroka, J., Wojcik-Fatla, A., & Dutkiewicz., J. 2006. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13, 169-175.

Stagno, S., Dykes, A.C., Amos, C.S., Head, R.A., Juranek, D.D., & Walls, K. 1980. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. *Pediatrics* 65, 706-712.

Stahl, P., Artois, M., & Aubert, M.F.A. 1988. Organisation spatiale et déplacements des chats forestiers adultes (*Felis silvestris* Schreber, 1777) en Lorraine. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 43, 113-132.

Stahl, P., & Léger, F. 1992. Le chat sauvage d'Europe (*Felis silvestris* Schreber, 1777). Encyclopédie des carnivores de France, n°17. Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères, 50 pp.

Stenseth, N.C., Viljugrein, H., Jedrzejewski, W., Mysterud, A., & Pucek, Z. 2002. Population dynamics of *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*: seasonal components of density dependence and density independence. *Acta Theriologica* 47 suppl. 1, 39–67.

Strürchler, D., Berger, R., & Just, M. 1987. Die konnatale Toxoplasmose in der Schweiz. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 117, 161-167. *In*: AFSSA. 2005. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. AFSSA Ed., Maison-Alfort, 316pp.

Su, C., Evans, D., Cole, R.H., Kissinger, J.C., Ajioka, J.W., & Sibley, L.D. 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299, 414-416.

Sumner, B., & Ackland, M. 1999. *Toxoplasma gondii* antibody in domestic cats in Melbourne. *Australian Veterinary Journal* 77, 447-449.

Sutmoller, P., Thomson, G.R., Hargreaves, S.K., Foggin, C.M. & Anderson, E.C. 2000. The foot-and-mouth disease risk posed by African buffalo within wildlife conservancies to the cattle industry of Zimbabwe. *Preventive Veterinary Medicine* 44, 43-60.

Svobodova, V., Knotek, Z. & Svoboda, M. 1998. Prevalence of IgG and IgM antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in cats. *Veterinary Parasitology* 80, 173-176.

-T-

Tabor, R. 1981. General biology of feral cats. *The Ecology and Control of Feral Cats*, pp 5-11. Universities Federation for Animal Welfare, London.

Taverne, J. 2002. Toxoplasmosis in Brazil. *Trends in Parasitology* 18, 203-204.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., & Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal For Parasitology* 30, 1217-1258.

Théron, A. 1984. Early and late shedding patterns of *Schistosoma mansoni* cercariae: ecological significance in transmission to human and murine hosts. *The Journal of Parasitology* 70, 652-655.

Thevenet, P.S., Ñancufil, A., Oyarzo, C.M., Torrecillas, C., Raso, S., Mellado, I., Flores, M.E., Cordoba, M.G., Minvielle, M.C., & Basualdo, J.A. 2004. An eco-

epidemiological study of contamination of soil with infective forms of intestinal parasites. *European Journal of Epidemiology* 19, 481-489.

Thulliez, P. 1995. ISAGA/SDA: reference tests, p. 19-21. *In*: Toxoplasmosis diagnosis. bioMerieux, Marcy l'Etoile, France.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., & Ayala, F.J. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichonomas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2414-2418.

Trewhella, W.J., Harris, S., & McAllister, F.E. 1988. Dispersal Distance, Home-Range Size and Population Density in the Red Fox (*Vulpes vulpes*): A Quantitative Analysis. *The Journal of Applied Ecology* 25, 423-434.

Turner, D.C. & Bateson, P.B. 2000. The Domestic cat. The biology of its behaviour. Cambridge University Press.

-U-

Uga, S., Minami, T., & Nagata, K. 1996. Defecation habits of cats and dogs and contamination by *Toxocara* eggs in public park sandpits. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 122-126.

-V-

Valle, J.V., Moro, R.P., Garvin, M.H., Trigo, D., & Diaz Cosin, D.J. 1997. Annual dynamics of the earthworm *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) in central Spain. *Soil Biology & Biochemistry* 29, 309-312.

Van Aarde, R.J. 1980. The diet and feeding behaviour of feral cats at Marion Island. *South African Journal of Wildlife Research* 13, 12-16.

Villena, I., Aubert, D., Gomis, P., Ferté, H., Inglard, J.C., Denis-Bisiaux, H., Dondon, J.M., Pisano, E., Ortis, N., & Pinon, J.M. 2004. Evaluation of a Strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4035-4039.

Vollaire, M.R., Radecki, S.V., & Lappin, M.R. 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in clinically ill cats in the United States. *American Journal of Veterinary Research* 66, 874-877.

-W-

Wallace, G.D. 1969. Serologic and epidemiologic observations on toxoplasmosis on three pacific atolls. *American Journal of Epidemiology* 90, 103-111.

Wallace, G.D, Marshall, L., Marshall, M. 1972. Cats, rats, and toxoplasmosis on a small pacific island. *American Journal of Epidemiology* 95, 475-482.

Wallace, G.D. 1973. Intermediate and transport hosts in the natural history of *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 22, 456-464.

Wallon, M., Kodjikian, L., Binquet, C., Garweg, J., Fleury, J., Quantin, C., Peyron, F. 2004. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 113, 1567-1572.

Weber, J.M., & Aubry, S. 1993. Predation by foxes, *Vulpes vulpes*, on the fossorial form of the water vole, *Arvicola terrestris scherman*, in western Switzerland. *Journal of Zoology, London* 229, 553-559.

Webster, J.P. 1994. Prevalence and transmission of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats *Rattus norvegicus*. *Parasitology* 108, 407-411.

Webster, J.P. 2001. Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behaviour. *Microbes and Infection* 3, 1037-1045.

Weigel, R.M., Dubey, J.P., Siegel, A.M., Kitron, U.D., Mannelli, A., Mitchell, M.A., Mateus-Pinilla, N.E., Thuilliez, P., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., & Todd, K.S. 1995. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *Journal of Parasitology* 81, 736-741.

Weigel, R.M., Dubey, J.P., Dyer, D., & Siegel, A.M. 1999. Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms in illinois. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 793-798.

Western, D. 1979. Size, life history and ecology in mammals. *African Journal of Ethology* 17, 185-204.

Whitt, C.J., Moench, T.R., Gittelsohn, A.M. 1989. Epidemiological observation in FIV and *Toxoplasma gondii* coinfection in cats in Baltimore. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 194, 229-233.

WHO. 2004. The world health report 2004 – changing history. Geneva: World Health Organization.

Woolhouse, M.E.J., Taylor, L.H. & Haydon, D.T. 2001. Population Biology of Multihost Pathogens. *Science* 292, 1109-1112.

Wright, A.N., & Gompper, M.E. 2005. Altered parasite assemblages in racoons in response to manipulated resource availability. Oecologia 144, 148-156.

-Y-

Yalden, D.W. 1980. Urban small mammals. *Journal of Zoology (London)* 191, 403-406.

Yamaguchi, N., Macdonald, D.W., Passanisi, W.C., Harbour, D.A., & Hopper, C.D. 1996. Parasite prevalence in free-ranging farm cats, *Felis sivestris* catus. *Epidemiology and Infection* 116, 217-223.

Young, K.D., & Thackston, E.L., 1999. Housing density and bacterial loading in urban streams. *Journal of Environmental Engineering* 125, 1177-1180.

-Z-

Zaunbrecher, K.I., & Smith, R.E. 1993. Neutering of feral cats as an alternative to eradication programs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 203, 449-452.