

was obtained fairly readily in response to mechanical stimulation alone, and much more readily in response to mechanical and olfactory (probably pheromonal) stimulation combined, the experiments suggest that the female's acceptance response to a live, courting male might similarly be mediated by mechanical stimulation alone, but more readily by mechanical and pheromonal stimulation combined.

In the course of attempts to refine the method of stimulation, solitary females and females in groups were both treated with the air jet. Surprisingly, no acceptance responses were recorded during 41 observations of solitary females, although 10 of these females showed the 'fully receptive' posture. During 57 observations of 'group' females, however, 15 acceptance postures were recorded, 14 of which were obtained from a total of 37 females displaying the 'fully receptive' posture. These and similar data, and detailed observations of the diel activity

rhythms of solitary and 'group' females, suggested that solitary females were generally less likely than group females to assume the 'fully receptive' posture and were more likely to locomote spontaneously as well as in response to stimulation. The presence of neighbouring females evidently exerted a profound influence on the behaviour of individuals, in such a way that solitary females seemed unsuitable as candidates for the experimental treatment.

In any case, these experiments describe the basis of an assay for the identification of male sex pheromones in this and similar species. The female's response is identical with that which normally leads to mating; it is obtained fairly readily in the absence of live males by means of easily applied mechanical stimuli; it is easy to combine olfactory stimuli with the mechanical stimuli; and male wing scent scale pheromone appears to accentuate the female's response.

Isolement de deux chlamydiales (rickettsies) chez un arachnide: L'araignée *Pisaura mirabilis* Cl. Two chlamydiales (rickettsias) in an arachnida: The spider *Pisaura mirabilis* Cl.

G. Morel

Laboratoire de Zoologie (Morphologie et Ecologie) et Laboratoire de Pathologie Comparée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, F-34060 Montpellier Cédex (France), 22 août 1977

Summary. 2 chlamydia-like microorganisms are associated with fatal diseases of the spider *Pisaura mirabilis* Cl. The general characteristics of these organisms are indicated and place them inside the genus *Poro-chlamydia* (order Chlamydiales).

Lors de l'étude de la fréquence chez l'araignée *Pisaura mirabilis* Cl. d'une maladie à *Baculovirus*¹, 2 types de particules d'allure rickettsiennes, différentes de celles notées précédemment chez cette espèce², ont été observées chez près de 10% des individus. Elles vont faire l'objet de cette communication.

Méthodes. Les formes infectieuses, nécessaires aux infections expérimentales, sont obtenues par broyage des cadavres d'araignées dans de l'eau distillée. Elles sont concentrées, après une clarification de 20 min à 1000 × g, par centrifugation du surnageant à 5000 × g durant 20 min. Pour l'étude au microscope électronique, les formes infectieuses concentrées sont contrastées négativement sur grilles par du phosphotungstate de sodium neutre à 2%. L'étude histologique est réalisée sur des coupes de matériel fixé par le liquide de Helly³, après coloration selon la technique de Mann-Dominici³. Pour la microscopie électronique, les coupes fines colorées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb sont réalisées à partir de fragments de tissus inclus dans le mélange de Spurr⁴ après double fixation par du glutaraldéhyde à 3% et de l'acide osmique à 2% dans un tampon cacodylate de sodium (0,2 M, pH 7,2) additionné de saccharose (3%).

Résultats. 2 types de rickettsies (rickettsie de type I et de type II) sont reconnues au microscope électronique lors de l'examen des formes infectieuses contrastées négativement (figures 1 et 2). Celles de type I sont ovoïdes, d'aspect homogène et mesurent en moyenne 560 nm de long sur 240 nm de large (figure 1); celles de type II, de plus grande taille (en moyenne 950 nm de long sur 300 nm de large), ont un aspect hétérogène (figure 2). Les araignées, infectées expérimentalement par voie buccale avec l'une ou l'autre des rickettsies, commencent à mourir 4 semaines après l'infection. On note alors la présence de microcolonies dans les cellules de l'hépatopancréas. En

microscopie électronique, ces microcolonies apparaissent composées de divers types de particules qui traduisent l'existence d'un cycle de développement intracellulaire identique à celui des Chlamydiales⁵. Au cours de ce cycle, les formes infectieuses (corps élémentaires) se transforment en formes de multiplication (corps initiaux) dont les cellules filles évoluent vers de nouveaux corps élémentaires en fin de cycle en passant par des formes de transition (corps intermédiaires).

Les corps élémentaires (figures 1-6). Chez la rickettsie de type I, ils ont la forme d'un ovoïde aplati de 600 nm de long sur 200 nm de large et 70 nm d'épaisseur (figures 3 et 4). Chez la rickettsie de type II, de morphologie plus complexe, les sections transversales sont piriformes (figures 5 et 6); ils mesurent jusqu'à 1100 nm de long sur 250 nm de large et leur épaisseur varie de 70 nm dans la zone mince à 150 nm dans la région la plus épaisse. Ils sont dans les 2 cas limités par un ensemble pentalaminaire formé par 2 membranes unitaires accolées. Cet ensemble présente parfois un aspect perforé, identique à celui signalé chez d'autres microorganismes d'arachnides^{6,7}. Le matériel nucléaire entoure le cytoplasme chez la rickettsie de type I (figures 3 et 4); il le longe en occupant la partie étroite des particules chez la rickettsie de type II (figures 5 et 6). Dans le cytoplasme, les ribosomes sont régulièrement alignés (figures 4 et 5). Une structure mem-

- 1 G. Morel, M. Bergoin et C. Vago, C. r. Acad. Sci. Paris 285, 933 (1977).
- 2 G. Morel, Anns Microbiol. Inst. Pasteur 128, A49 (1977).
- 3 R. Martoja et M. Martoja-Pierson, Initiation aux techniques de l'histologie animale. Ed. Masson et Cie, Paris 1967.
- 4 R. Spurr, J. Ultrastruct. Res. 26, 31 (1969).
- 5 J. Storz et L. A. Page, Int. J. syst. Bact. 21, 332 (1971).
- 6 H. Osaki, Acta arachn. Tokyo 25, 23 (1973).
- 7 G. Morel, J. invert. Path. 28, 167 (1976).

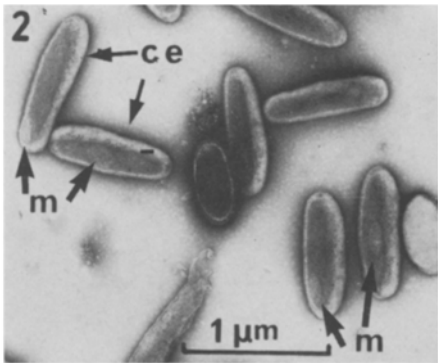
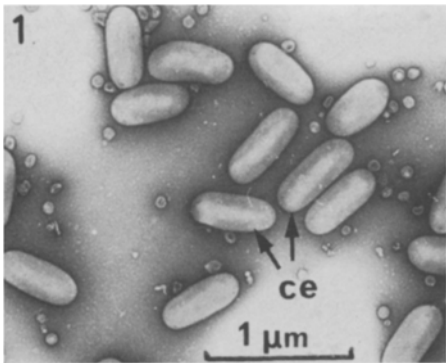


Fig. 1. Rickettsiose de type I. Suspension de formes infectieuses ou corps élémentaires (ce).
Fig. 2. Rickettsiose de type II. Suspension de formes infectieuses ou corps élémentaires (ce). Le système membranaire interne (m) est visible.

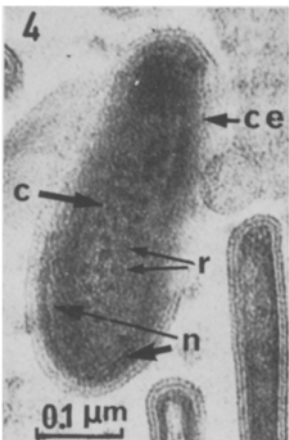


Fig. 3. Rickettsiose de type I. Section d'une microcolonie renfermant des corps initiaux (ci), des corps intermédiaires (ct) et des corps élémentaires (ce).
Fig. 4. Rickettsiose de type I. Détail d'un corps élémentaire (ce) en section longitudinale. Le matériel nucléaire (n) entoure le cytoplasme (c) qui renferme les ribosomes (r) alignés.

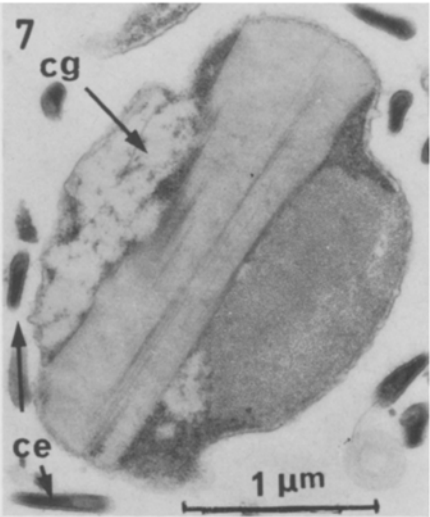
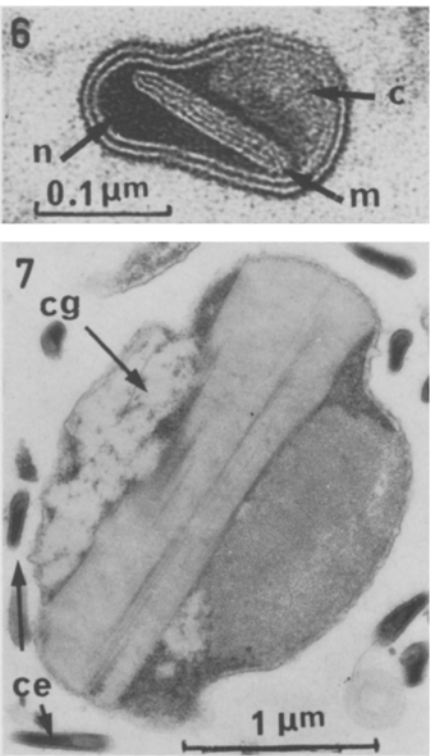
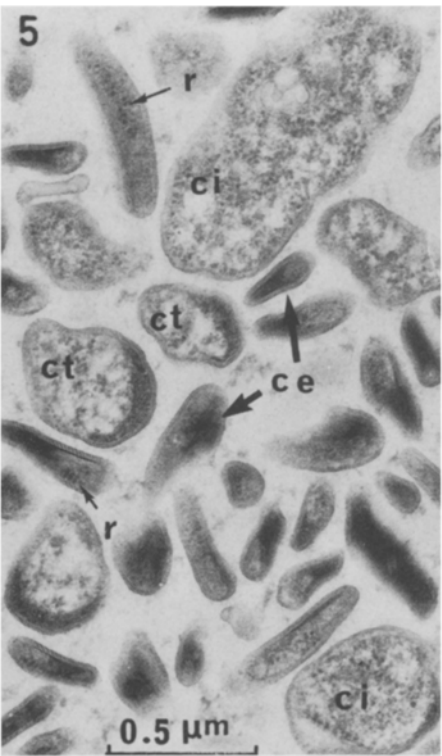


Fig. 5. Rickettsiose de type II. Section d'une microcolonie renfermant des corps initiaux (ci), des corps intermédiaires (ct) et des corps élémentaires (ce). r, ribosomes.
Fig. 6. Rickettsiose de type II. Section d'un corps élémentaire mettant en évidence le système membranaire (m) dans le matériel nucléaire (n). Le cytoplasme (c) occupe la partie large de la particule.
Fig. 7. Rickettsiose de type II. Corps géant (cg) et corps élémentaire (ce).

branaire existe dans le matériel nucléaire. Elle est décelable sur les contrastes négatifs (figure 2) de la rickettsie de type II chez laquelle elle est très développée (figure 6). Les corps initiaux (figures 3 et 5). Les corps initiaux de la rickettsie de type I (figure 3) sont coccoïdes, d'environ 400 nm de diamètre; ceux de la rickettsie de type II (figure 5) sont bacilliformes, de 1200 pm de long sur 450 nm de large. Ils montrent cependant la même organisation: limités par 2 membranes unitaires séparées, ils ont un cytoplasme clair aux électrons au sein duquel sont visibles de nombreuses fibrilles denses ainsi que des granules ribosomiens.

Les corps intermédiaires (figures 3 et 5). Formes de transition entre les 2 formes précédentes, on y observe une densification latérale correspondant au regroupement du matériel nucléaire et une restructuration progressive des limites cellulaires. Lenticulaires chez la rickettsie de type I (figure 3), les corps intermédiaires sont bacilliformes chez la rickettsie de type II (figure 5).

Chez la rickettsie de type II, des corps géants sont visibles (figure 7). Parasphériques, ils atteignent 2,5 µm de diamètre et renferment des structures allongées constituées de fibres accolées. En section transversale, ces structures présentent une maille cristalline.

Discussion. Le cycle intracellulaire des 2 microorganismes permet de les placer dans l'ordre des Chlamydiales⁶. Leurs caractères ultrastructuraux, en particulier ceux des corps élémentaires, traduisent leur appartenance au genre *Porochlamydia*⁷ qui va donc s'enrichir d'une ou de deux espèces nouvelles. Il n'est pas en effet certain que la rickettsie de type I soit une nouvelle espèce. Trouvée chez les araignées dans des stations très voisines de celles où les scorpions sont infectés par *Porochlamydia buthi*⁷, elle ne présente, avec ce microorganisme, que de légères différences morphologiques au niveau des corps initiaux et des corps intermédiaires. Son élévation au rang d'espèce est donc subordonnée à la mise en évidence de caractères spécifiques, d'ordre immunologique par exemple, et aux résultats d'essais d'infections croisées montrant la spécificité d'hôte des 2 microorganismes. En ce qui concerne la rickettsie de type II, qui possède des caractères ultrastructuraux originaux, on peut en revanche la considérer dès à présent comme une nouvelle *Porochlamydia*. L'établissement de la diagnose de cette espèce nécessite un complément d'information sur ses affinités immunologiques ainsi que sur son cycle où l'on note la présence de corps géants, jusqu'alors inconnus dans l'ordre des Chlamydiales.

Neutrophils are mediators of antiviral immunity¹

B. T. Rouse, L. A. Babiuk and P. M. Henson

Department of Veterinary Microbiology, University of Tennessee, Knoxville (Tennessee 37916, USA); Department of Veterinary Microbiology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon (Saskatchewan, Canada) and National Jewish Hospital, Denver (Colorado, USA), 4 July 1977

Summary. The paper presents evidence that polymorphonuclear neutrophils upon stimulation with herpesvirus-induced antigens release a material inhibitory to virus infection. The material does not appear to be identical to type I or II interferon.

It has been customary to consider the polymorphonuclear neutrophil (PMN) as an effector cell primarily involved in antibacterial rather than in antiviral defense. Recovery from viral infections seems to be the domain of the macrophage, type I interferon produced by virus-infected cells and several components of specific immunity²⁻⁶. Amongst these latter specific components, antiviral cytotoxic T cells and the lymphokine type 2 interferon are assumed to be the most important effector mechanisms of recovery. Although PMN could play a role in antiviral defense by phagocytosing opsonized virus particles, the importance of this process in controlling virus dissemination in vivo has not been defined. Since PMN produce

little or no interferon^{7,8}, they may not be involved in recovery from viral infections. However, some recent observations have suggested a part for PMN in antiviral immunity⁹⁻¹². For instance, PMN were shown to act as effector cells in antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), which in turn was assumed to provide an in vitro model of antiviral defense^{6,13,14}. In fact, in the bovine species, PMN were the most efficient of all cell types tested at mediating antiviral ADCC¹⁰. Furthermore, PMN, in the presence of antibody, could prevent virus dissemination when added to virus-infected monolayers^{9,15}. We now report further evidence that PMN may be involved in antiviral immunity by showing that the PMN's are induced, by exposure to herpesvirus antigens, to release subcellular mediators which can render cells resistant to virus infection.

Materials and methods. Bovine PMN from animals with no known exposure to the viruses under investigation were isolated from the mammary glands by methods reported previously¹⁶. These cells consisted of 98-99% PMN and were contaminated by macrophages. The cells were suspended in Eagles' base minimal essential medium (MEM) containing 1% fetal calf serum at a cell concentration of 5×10^6 /ml.

Preparation of cell and viral stimulants. The following cell lines were cultured in 100-mm petri dishes (approximately 8×10^6 cells) in MEM containing 5% FCS - Georgia bovine kidney cells (GBK), 2 monkey kidney cell lines - BSC-1 and VeRo and dog kidney cells. The viruses shown

Table 1. Stimulants examined which failed to cause bovine neutrophils to release virus inhibitor

Vesicular stomatitis virus infected GBK cells
Bovine rotavirus infected BSC-1 cells
Bovine virus diarrhoea infected GBK cells
Parainfluenza III virus infected GBK cells
Newcastle disease virus infected GBK cells
Herpes simplex virus infected VeRo cells
Canine distemper virus infected dog kidney cells
Heat aggregated bovine gamma globulin (500 µg/ml)
Purified protein derivative of human tuberculin (500 µg/ml)
Antibody and complement opsonized zymosan particles