

particles observed contained completely formed nucleoid (figure d). These morphological findings complement and extend the biochemical demonstration that only during the terminal stages of the disease are particulates with reverse transcriptase and 60-70S RNA indistinguishable from tissue-culture-induced GP-B type retransvirus found²³. This is also in line with the demonstration that BrdU-induced viral genes are transcribed in L2C leukemic cells²¹.

The morphological evidence for the presence of the B-type retransvirus in the late stages of leukemogenesis indicates that a positive correlation exists between the morphologically complete expression of endogenous viral genes in L2C leukemic cells and malignancy, particularly leukemia, in guinea-pigs.

- 1 This study was supported partly by the Israel Cancer Association.
- 2 C. Congdon and E. Lorenz, *Am. J. Path.* 30, 337 (1954).
- 3 Workshop on guinea-pig L2C leukemia: Immunological, virological and clinical aspects. *Fedn Proc.* 36, 2247 (1977).
- 4 S. G. Murphy and A. F. Lobuglio, *Fedn Proc.* 36, 2281 (1977).
- 5 K. Perk, J. W. Pearson, J. A. Torgersen and M. A. Chirigos, *Int. J. Cancer* 13, 863 (1974).
- 6 S. R. Opler, *J. natl Cancer Inst.* 38, 797 (1967).

- 7 E. Nadel, W. Banfield, S. Burstein and A. J. Tousimis, *J. natl Cancer Inst.* 38, 379 (1967).
- 8 D. G. Feldman and L. Gross, *Cancer Res.* 30, 2702 (1970).
- 9 B. I. Ma, D. C. Swartzendruber and W. H. Murphy, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 130, 586 (1969).
- 10 V. C. Dunkel, R. C. Bast, B. I. Gerwin, U. Heine, M. Cottler-Fox and T. Borsos, *J. natl Cancer Inst.* 53, 595 (1974).
- 11 V. H. Black, *J. natl Cancer Inst.* 52, 545 (1974).
- 12 H. K. Andersen and T. Jeppeson, *J. natl Cancer Inst.* 49, 1403 (1972).
- 13 S. R. Opler, *Nature* 215, 184 (1967).
- 14 H. T. Wepsic, B. Zbar, J. Whang-Peng, T. Borsos and H. J. Rapp, *J. natl Cancer Inst.* 45, 99 (1970).
- 15 G. D. Hsiung, *J. natl Cancer Inst.* 49, 567 (1972).
- 16 P. A. Gross, C. Y. K. Fong and G. D. Hsiung, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 143, 367 (1973).
- 17 J. S. Rhim, F. G. Duh, H. Y. Cho, K. D. Wu and M. L. Vernon, *J. natl Cancer Inst.* 51, 1327 (1973).
- 18 D. P. Nayak and P. R. Murray, *J. Virol.* 12, 177 (1973).
- 19 J. E. Dahlberg, K. Perk and A. J. Dalton, *Nature* 249, 828 (1974).
- 20 D. P. Nayak and A. R. Davis, *Fedn Proc.* 36, 2305 (1977).
- 21 J. E. Dahlberg, K. Perk and R. Michalides, *Fedn Proc.* 39, 2290 (1977).
- 22 R. Michalides, J. Schlom, J. E. Dahlberg and K. Perk, *J. Virol.* 16, 1039 (1975).
- 23 R. Michalides, J. Schlom, J. Pearson, K. Perk and J. E. Dahlberg, *J. Virol.* 18, 1120 (1976).

Effet de la neuraminidase sur l'activité phagocytaire d'*Amoeba proteus* Effect of neuraminidase on phagocytosis activity in *Amoeba proteus*

P. Marsot

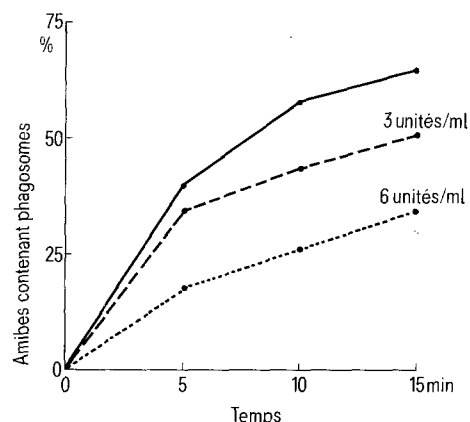
INRS-Océanologie, 310, avenue des Ursulines, Rimouski, Québec G5L 3A1 (Canada), 29 mai 1978

Summary. Phagocytosis activity of *Amoeba* is greatly reduced after treatment with neuraminidase, at concentrations that do not affect normal motile behavior.

Presque toutes les cellules animales possèdent une couche de mucopolysaccharide (glycocalyx) sur la surface externe de leur membrane plasmique. Chez l'amibe d'eau douce, *Amoeba proteus*, ce revêtement est particulièrement important; son développement peut atteindre une épaisseur de 2000 Å¹. Sa composition chimique est de nature polysaccharidique avec la présence, probable, d'acides sialiques^{2,3}. Le rôle du glycocalyx de l'amibe dans certaines activités cellulaires telles que la pinocytose⁴⁻⁷ et la chimiotaxie^{8,9} semble maintenant bien établi. Cependant, son intervention dans les phénomènes phagocytaires - phénomène impliquant des mouvements protoplasmiques associés à la capture et à l'ingestion d'une proie - est moins bien connue. Les expériences de Lindberg¹⁰ sont les seules, à notre connaissance, qui mettent en relief cette fonction du glycocalyx chez l'amibe. L'auteur observe une inhibition de la phagocytose chez des amibes immergées dans des solutions d'enzymes protéolytiques (pronase, trypsine, papaïne). La présente note vise à préciser le rôle du glycocalyx dans la phagocytose chez *A. proteus*, en utilisant une enzyme plus spécifique; la neuraminidase.

Matériel et méthodes. *Amoeba proteus* a été cultivée suivant la méthode de Prescott et Carrier¹¹. Les amibes subissent un jeûne de 48 h et sont lavées 5 fois dans leur milieu de culture (milieu de Chalkley¹²) avant chaque expérience. Les amibes traitées à la neuraminidase subissent en plus, une préincubation de 5 min dans l'enzyme (3 et 6 unités/ml de milieu Chalkley). Le pH du milieu est maintenu à 5.7. La neuraminidase de *Vibrio cholerae* provient de la maison General Biochemicals, Ohio.

Calcul de l'activité phagocytaire. Essentiellement, nous reprenons la méthode mise au point par Marsot et Couillard¹³ pour la phagocytose de cellules dissociées de l'hydre, avec les modifications suivantes: a) Coloration vitale de *Tetrahymena pyriformis* (cilié). Les cellules préalablement lavées avec le milieu Chalkley (3 fois), sont resuspendues,



Effet de la neuraminidase sur la phagocytose de *Tetrahymena* par *Amoeba proteus*. Des populations identiques d'amibes (1500/ml) sont en présence d'un nombre toujours constant de ciliés (800/ml). La neuraminidase a été utilisée aux concentrations de 3 unités/ml (ligne brisée) et 6 unités/ml (ligne pointillée). La ligne unie représente l'expérience témoin (sans enzyme).

durant 15 h dans un milieu semblable contenant de l'orangé d'acridine (1 µg/ml). Avant l'expérience, elles sont remises dans un milieu sans colorant. b) Des volumes connus d'une suspension d'amibes (1500/ml) et de cellules de *Tetrahymena* (800/ml) sont mélangés dans une fiole conique de 15 ml. Une aliquote est aussitôt transférée sur une lame à puits et observée au microscope en fluorescence. Le pourcentage d'amibes contenant un phagosome (spot fluorescent), ou plus, est déterminé à divers temps.

Résultats. L'activité phagocytaire de l'amibe en présence de neuraminidase subit une réduction de 15 et 30%, après 10 min seulement, aux concentrations respectives d'enzyme de 3 à 6 unités/ml (figure). Au bout de 15 min l'inhibition de la phagocytose peut atteindre facilement 50%, à 6 unités/ml.

Une étude du mouvement de l'amibe, à ces concentrations (3 et 6 unités/ml), relève un comportement et un déplacement tout à fait normal des cellules, si on les compare aux témoins (sans enzyme). Ce comportement se traduit par la formation de pseudopode et l'adoption d'un mouvement polarisé. D'ailleurs il a été démontré qu'à des concentrations en neuraminidase beaucoup plus élevées (25 unités/0.1 ml) et pour une durée d'immersion beaucoup plus longue (60 min), les amibes conservaient une apparence normale².

Discussion. L'effet inhibiteur de la neuraminidase sur l'activité phagocytaire, à des concentrations qui n'affectent pas le mouvement ou l'apparence de l'amibe, met en relief un rôle important que semblerait jouer le glycocalyx de l'amibe dans le processus de capture et d'ingestion de ses proies. Des inhibitions analogues ont été observées chez les leucocytes affectés par le virus de l'influenza¹⁴⁻¹⁷ et l'on a établi que la neuraminidase, en libérant les acides neuraminiques de la surface cellulaire, provoquait un affaïssement

des charges négatives qui se traduit par une baisse de la phagocytose.

Egalement chez *A. proteus*, il y aurait lieu de croire que l'intégrité du glycocalyx et surtout la présence d'acides sialiques pourrait jouer un rôle de premier ordre dans la perception des substances chimiotactiques libérées par les proies naturelles de l'amibe^{9,13,18,19}.

- 1 G.D. Pappas, J. Sci. 54, 195 (1954).
- 2 P.K. Ray et S. Chatterjee, Experientia 31, 1075 (1975).
- 3 S. Chatterjee et P.K. Ray, Indian J. exp. Biol. 13, 294 (1975).
- 4 J.M. Marshall et V.T. Nachmias, J. Histochem. Cytochem. 13, 92 (1965).
- 5 P.W. Brandt et G.D. Pappas, J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, 675 (1960).
- 6 P.W. Brandt, Exp. Cell Res. 15, 300 (1958).
- 7 C. Chapman-Andresen, C. r. Trav. Lab. Carlsberg 33, 73 (1962).
- 8 J.E. Brewster et L.G.E. Bell, J. Cell Sci. 4, 17 (1969).
- 9 J.E. Brewster et L.G.E. Bell, J. Cell Sci. 7, 549 (1970).
- 10 R.E. Lindberg, J. Protozool. 21, 444 (1974).
- 11 D.M. Prescott et F.F. Carrier, dans: Methods in cell physiology, vol. I, p. 85. Academic Press, New York 1964.
- 12 J.L. Griffin, dans: The biology of *Amoeba*, p. 83. Ed. K.W. Jeon. Academic Press, New York 1973.
- 13 P. Marsot et P. Couillard, Can. J. Zool. 50, 745 (1972).
- 14 D.J. Merchant et H.R. Morgan, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74, 651 (1950).
- 15 T.N. Fisher et H.S. Ginsberg, Virology 2, 656 (1956).
- 16 E.J. Ambrose, dans: Cell Electrophoresis. Symp. Br. Biophys. Soc. J.A. Churchill Ltd, 1965.
- 17 M.F. Tsan et P.A. McIntyre, J. exp. Med. 143, 1308 (1976).
- 18 P. Marsot et P. Couillard, Can. J. Zool. 56, 1497 (1978).
- 19 K.W. Jeon et L.G.E. Bell, Exp. Cell Res. 38, 536 (1965).

Triple cones found in retinas of 3 fish species

B.A. Collins and E.F. MacNichol, Jr¹

Laboratory of Sensory Physiology, Marine Biological Laboratory, Woods Hole (Massachusetts 02543, USA) 17 May 1978

Summary. Triple cones were found in the retinas of 3 species of fishes indigenous to the Woods Hole area. The function of these triple cones can not be deduced from the behavior patterns of these fishes.

In our laboratory, a histological survey of the retinas of fishes indigenous to the Woods Hole area is in progress. Many histological slides have been screened in choosing the tissue that best represents the retina of a particular species of fish to be included in this survey. The age and sex of the fishes used in this study are not determined. The tissue is prepared so that transverse and tangential sections through some region of the retina can be obtained. While scanning the numerous slides that have been made for this survey, we have found triple cones in 3 fish species, out of approximately 30 species examined to date. Since we were not looking expressly for unusual cone formation, many more local fish species may have triple cones than those we have, by chance, observed. Perhaps it is significant that triple cones have been found in nearly 10% of the fish species observed in this survey.

Ali and Ancil² report on several fish species in which triple cones have been found. Approximately 170 families of fish are described in their text, of which only 8 species, including the yellowtail, are described as having triple cones. Most of these 8 species can be found in the waters surrounding Woods Hole. We have seen these unusual photo-

receptors in the yellowtail, the white hake and the American pollock.

Materials and methods. These 3 fishes were caught in the waters of the Woods Hole area. The eyes were removed, the lens and cornea were dissected away, and the remaining eye cup was immersed in 3% glutaraldehyde in 0.066 M phosphate buffer (pH 7.4). The eye cup was then post fixed in 2% osmium tetroxide in 0.14 M Veronal-acetate buffer (pH 7.4). The retinal tissue was embedded in Epon and approximately 10-µm thick sections were cut. The sections were unstained, because the contrast offered by the osmium is adequate when a Zeiss Nomarski Differential Interference-Contrast Microscope³ is used to view the sections. The tissue sections were photographed with Polaroid Positive/Negative Land Film, type 665, through a ×12.5 eyepiece installed in a Polaroid camera. A ×40 objective was used on the Nomarski microscope.

Results. Triple cones were seen in 3 of more than 30 fish species we have examined so far. In the yellowtail, Ali and Ancil² found triple cones in a confined spot near the area retinae. We found these unusual photoreceptors near the optic nerve in the pollock. Because no attempt was made to