# Expériences sur la nature de particules trouvées dans des cas d'hépatite virale: type coronavirus, antigène Australia et particules de Dane[1,2]

H.-W. ACKERMANN
*Département de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec 10, Qué.*

G. CHERCHEL, J.-P. VALET ET J. MATTE
*Service d'Hématologie, Centre hospitalier de l'Université Laval, Québec 10, Qué.*

S. MOORJANI
*Centre de Recherches sur les Maladies lipidiques, Centre hospitalier de l'Université Laval, Québec 10, Qué.*

ET

R. HIGGINS
*Laboratoire de Pathologie vétérinaire, Ministère de l'Agriculture du Québec, Complexe scientifique, Québec 12, Qué.*

Approuvé le 19 octobre 1973

ACKERMANN, H.-W., G. CHERCHEL, J.-P. VALET, J. MATTE, S. MOORJANI et R. HIGGINS. 1973. Expériences sur la nature de particules trouvées dans des cas d'hépatite virale: type coronavirus, antigène Australia et particules de Dane. Can. J. Microbiol. **20**: 193–203.

Des particules sériques de type coronavirus, l'antigène Australia et des particules de Dane ont été traités par divers agents chimiques et des enzymes. Les effets ont été observés au microscope électronique. Les particules de type coronavirus, dépourvues d'une nucléocapside et apparemment d'acide nucléique, sont sans relations antigéniques avec l'antigène Australia et semblent être des phospholipoprotéines. Des particules similaires ont été trouvées dans des sérums de cobaye et au niveau de fractions lipoprotéiques de sérums humains, notamment dans les fractions HDL et VHDL. L'antigène Australia qui paraît dépourvu d'acide nucléique, et l'enveloppe des particules de Dane sont sensibles à la plupart des agents et se comportent comme des phospholipoprotéines. La phospholipase C provoque la formation d'anneaux. Les résultats diffèrent notablement de ceux obtenus par d'autres auteurs. La capside des particules de Dane résiste à la plupart des agents. Elle est séparée de l'enveloppe par le Tween 80, l'urée et d'autres agents. Les particules de Dane semblent contenir de l'acide nucléique.

ACKERMANN, H.-W., G. CHERCHEL, J.-P. VALET, J. MATTE, S. MOORJANI, and R. HIGGINS. 1973. Expériences sur la nature de particules trouvées dans des cas d'hépatite virale: type coronavirus, antigène Australia et particules de Dane. Can. J. Microbiol. **20**: 193–203.

Coronavirus-like serum particles, Australia antigen, and Dane particles were treated by various chemicals and enzymes. Results were studied by electron microscopy. Coronavirus-like particles have no nucleocapsid, no detectable nucleic acid, no antigenic relationships with Australia antigen, and seem to be phospholipoproteins. Similar particles have been found in sera of guinea pigs and in human lipoproteins, especially in the HDL and VHDL fractions. Australia antigen which appears devoid of nucleic acid, and the envelope of Dane particles are sensitive to most agents and behave as phospholipoproteins. Phospholipase C produces ring-like structures. Results differ markedly from those obtained by other workers. The capsid of Dane particles is resistant to most agents. It is separated from the envelope by Tween 80, urea, and other agents. Dane particles seem to contain nucleic acid.

## Introduction

L'étude au microscope électronique de sérums de sujets atteints d'hépatite virale a permis de mettre en évidence différents types de particules: l'antigène Australia classique, les particules de Dane (16) et, dans certains cas, des particules globuleuses d'environ 80 nm de diamètre et pourvues d'une frange. Ces particules, décrites comme ressemblant à des corona- ou des paramyxovirus, ont été observées dans des sérums et des coupes de foies humains (26, 42, 43, 45, 49, 54), ainsi que dans le sérum de singes infectés artificiellement avec du sérum d'hépatiques (7, 25). Jusqu'à preuve du contraire, ces particules pouvaient être considérées comme agents possibles de l'hépatite virale, même si leur présence doit être interprétée avec prudence (51, 52, 53, 55).

[1]Reçu le 10 avril 1973.
[2]Présenté en partie au 40e Congrès de l'ACFAS, Ottawa, Canada, septembre 1972, et à la 73e Réunion Annuelle de l'American Society for Microbiology, Miami, Fla., mai 1973.

ABRÉVIATIONS COURANTES: nm, nanomètre; I.E.O.P., immuno-électro-osmophorèse; SGOT, transaminase oxaloglutamique; U.I., unité internationale; SGPT, transaminase phosphoglutamique; VLDL, "very low density lipoprotein"; LDL, "low density lipoprotein"; HDL, "high density lipoprotein"; VHDL, "very high density lipoprotein"; SDS, dodécylsulfate de sodium; RNase, ribonucléase; DNase, déoxyribonucléase; ARN, acide ribonucléique; ADN, acide déoxyribonucléique.

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

Les essais de dégradation de l'antigène Australia (4, 8, 12, 21, 33, 35, 36, 46, 47) comportent peu d'observations au microscope électronique et ne sont pas toujours concluants. En outre, les propriétés des particules de Dane, le candidat le plus probable à être un virus d'hépatite (1, 2, 13, 14, 17, 19, 28) sont très peu connues.

A partir de sérums de malades atteints d'hépatite aiguë, nous avions obtenu des fractions riches en particules de type coronavirus, en antigène Australia et en particules de Dane. Ceci nous incitait à entreprendre des essais de dégradation contrôlée. Notre but était de rechercher si les particules de type coronavirus possédaient ou non une nucléocapside et, d'autre part, d'étudier au microscope électronique l'action de différents enzymes et de produits chimiques sur l'antigène Australia et les particules de Dane. Des expériences additionnelles comprenaient la recherche de particules de type coronavirus dans d'autres sérums humains, dans des sérums de cobayes sains ou infectés avec des leptospires, et enfin dans des fractions lipoprotéiques de sérums humains.

## Matériel et méthodes

*Sérums*

Toutes les expériences de dégradation sont faites sur deux sérums purifiés, riches soit en particules de type coronavirus, soit en antigène Australia et particules de Dane. Ils proviennent respectivement des malades GI et LA, âgés de 24 et de 21 ans, tous les deux toxicomanes et atteints d'hépatite aiguë avec présence d'antigène Australia. Chez le malade GI, il s'agit probablement d'hépatite sérique. Dans les deux cas, l'évolution de la maladie n'a présenté aucune particularité. Au moment du prélèvement de nos échantillons, les tests de laboratoire ont donné les résultats suivants:

| Malade | GI | LA | |
|---|---|---|---|
| Antigène Australia | 1:64 | 1:32 | en I.E.O.P. |
| SGOT | 920 | 820 | U.I. |
| SGPT | 670 | 1300 | U.I. |
| Bilirubine totale | 5.4 | 4.5 | mg% |

Des particules de type coronavirus sont recherchées dans 11 autres sérums bruts et des fractions purifiées, provenant de cas d'hépatite aiguë (7) ou chronique (1), de porteurs sains d'antigène Australia (2) et de sujets sains (1). Ces particules sont également recherchées dans des sérums de cobayes et dans des fractions de lipoprotéines sériques provenant de quatre cas d'hépatite aiguë. Les sérums de cobaye proviennent de cinq animaux et sont prélevés avant et après inoculation avec *Leptospira icterohaemorrhagiae* en broyat de foie; la dernière saignée a lieu 4 jours après l'infection, peu avant la mort des animaux qui survient le 5e jour.

*Procédés de purification*

Les sérums humains et de cobaye sont traités d'après la méthode de Gerin *et al.* (21) modifiée. Elle comprend les étapes suivantes.

(*a*) Ultracentrifugation de flottaison en gradient isopycnique (CsCl 1.1 à 1.4 g/ml, ultracentrifugeuse Spinco L2-65B, rotor SW-40, 40 000 t/min pendant 18 h, ou rotor SW-27, 25 500 t/min pendant 48 h, à +5°C).

(*b*) Tamisage des fractions antigéniques sur sépharose 6B (élution par tampon Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.0).

(*c*) Concentration sur membrane Amicon XM100 de la fraction de tête (du volume mort à la dernière fraction antigénique).

(*d*) Ultracentrifugation de sédimentation en gradient de CsCl (1.05 à 1.2 g/ml, rotor SW-27, 25 500 t/min pendant 9 h 30 min).

(*e*) Collection de fractions de 50 gouttes par le fond du tube et dialyse (NaCl 0.85% pendant 24 h). Les particules de Dane sont récupérées dans les trois premières fractions. Le pool de ces fractions qui contient, d'après notre estimé, approximativement $10^8$ particules de Dane par millilitre, a un titre d'antigène Australia de $\frac{1}{8}$ en I.E.O.P. et sert aux essais de dégradation et de coloration. Les préparations sont dépourvues de protéines humaines, tel que déterminé par immunodiffusion double et I.E.O.P. contre des antisérums anti-protéines sériques. Il est à noter que les sérums de cobaye ont subi les étapes *a*, *b* et *c* seulement.

Dans certains cas, les préparations sont concentrées par ultracentrifugation (Spinco L, rotor SW-39, 30 000 t/min pendant 90 min) et lavées ou non en acétate d'ammonium (0.1 M, pH 7.2).

Les lipoprotéines sériques sont fractionnées par ultracentrifugation séquentielle dans des solutions de densité appropriée (24). Les fractions (VLDL, LDL, HDL et VHDL) correspondent respectivement à des densités de 1.006, 1.063, 1.21 et > 1.21 g/ml de CsCl.

*Essais de dégradation et recherche d'acides nucléiques*

Les principaux produits et leurs conditions d'emploi sont groupés dans le Tableau 1, à l'exception des temps d'incubation qui sont indiqués dans les Tableaux 2 et 3.

De façon générale, produits et substrats sont mélangés dans des tubes vissés de 10 mm de diamètre et agités avant incubation. Les enzymes sont employés dans les conditions indiquées dans le catalogue de Worthington Biochemicals Co. Les mélanges sont examinés sans autre traitement, à l'exception de l'étude de l'action du SDS, du Tween 80 et de l'urée sur l'antigène Australia où les échantillons sont centrifugés et lavés après incubation. L'action du pH est étudiée en traitant des spécimens sur grille, avec du phosphotungstate de pH 3 à 10.

La recherche d'acides nucléiques se fait par microscopie électronique ou par fluorescence. Dans le premier cas, les préparations sont colorées par l'acétate ou le formiate d'uranyle, avec ou sans traitement préalable par la DNase ou la RNase. Pour la recherche de la fluorescence, les préparations centrifugées et lavées sont colorées à l'orange d'acridine d'après la technique de Bradley (11), et exami-

TABLEAU 1

| Agent | Fournisseur | Concn., mg/ml | Relation agent/ substrat, gouttes | pH | Temp., °C |
|---|---|---|---|---|---|
| Chloroforme | Baker[a] | | 10:2 | | 25 |
| Ether éthylique | Squibb[b] | | 10:2 | | 25 |
| Ether–éthanol, 1:1 v/v | | | 10:2 | | 4 |
| SDS | BDH[c] | 5 | 2:2* | 7.3 | 25 |
| Tween 80 | Fisher[d] | 10 | 2:2* | 6.7 | 25 |
| Urée | Baker | 240 (4 M) | 2:2* | 7.2 | 25 |
| α-Amylase | Worthington[e] | 1 | 2:2 | 6.9 | 25 |
| Déoxyribonucléase | GBI[f] | 1 | 2:2 | 7.0 | 37 |
| Lipase du germe de blé | NBC[g] | 1 | 2:2 | 5.0 | 37 |
| Lipase pancréatique | Worthington | 1 | 2:2 | 8.0 | 25 |
| Papaïne | BDH | 1 | 2:2 | 7.0 | 25 |
| Pepsine | Fisher | 10 | 2:2 | 3.0 | 37 |
| Phospholipase C | Sigma[h] | 1 | 2:2 | 7.0 | 37 |
| Ribonucléase | GBI | 1 | 2:2 | 5.0 | 37 |
| Trypsine | Fisher | 10 | 2:2 | 8.1 | 25 |

NOTE: *6:6 pour l'étude de l'antigène Australia et des particules de Dane.
[a]J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J.
[b]Squibb & Sons, Ltd., Montréal, Qué.
[c]BDH Chemicals, Montréal, Qué.
[d]Fisher Scientific Co., Montréal, Qué.
[e]Worthington Biochemicals Co., Freehold, N.J.
[f]General Biochemicals, Chagrin Falls, Ohio.
[g]Nutritional Biochemicals Co., Cleveland, Ohio.
[h]Sigma Chemical Co., St-Louis, Mo.

nées avec une lampe Mineralight (Ultraviolet Products Inc., San Gabriel, Calif.). Les phages MS2, T2 et ϕX174 servent de témoins.

*Agglutinations*

Les affinités antigéniques des particules sont recherchées avec du sérum anti-Australia (Behringwerke A. G., Marburg-Lahn, Allemagne), d'après la technique de Kelen *et al.* (31). La lecture est faite après 1 et 2 h.

*Microscopie électronique*

Les spécimens sont déposés sur des grilles de cuivre portant un film de formvar carboné. Les colorations sont généralement faites avec du phosphotungstate de sodium (2%, pH 7.0). D'autres colorants sont utilisés avec des buts spécifiques: l'acétate et le formiate d'uranyle (2%, pH 4.5) pour la recherche d'acides nucléiques, et l'acide osmique (4%) pour la coloration de lipides osmiophiles; les durées de ces colorations sont indiquées dans le Tableau 3. Les colorations prolongées à l'acétate d'uranyle se font dans une chambre humide. Les préparations sont examinées à 60 kV avec un microscope électronique Philips EM 300. L'appréciation des résultats est faite en comparant, par des examens répétés au moins deux fois, les échantillons traités par un même agent avec un témoin non traité. Le critère le plus important est l'intégrité morphologique des particules, notamment la netteté de leur contour. Dans une moindre mesure, nous avons tenu compte aussi de leur fréquence apparente et relative.

## Résultats

Les résultats des expériences avec les préparations GI et LA sont résumés dans les Tableaux 2 et 3.

*Particules de type coronavirus*

*1. Sérum GI*

*a. Particules non traitées* (Figures 1 à 6)—Le sérum GI contient des particules globuleuses de taille variable. Elles sont généralement rondes, d'un diamètre de 80 (60 à 105) nm, ou allongées, mesurant 45 à 50 × 70 à 90 nm, et elles montrent souvent une frange floue de 5 à 10 nm (Figures 1, 2 et 4) qui se termine parfois en queue (Figures 5 et 6). Il n'y a pas de spicules en forme de clou. Lorsqu'elles se trouvent dans une couche épaisse de phosphotungstate, les particules présentent parfois un halo uniforme (Fig. 3). Ces particules se rencontrent seules ou en petits groupes et peuvent être reliées entre elles par un pont (Fig. 2). En outre, le sérum GI contient la forme ronde de l'antigène Australia.

Les grandes particules, rares dans le sérum non fractionné et dilué (1:20), sont fréquentes et faciles à voir dans les préparations purifiées ou leur titre est estimé à $10^7$ à $10^8$ par millilitre. Elles flottent surtout à la densité de 1.23 g/ml, mais se rencontrent dans toute la zone de 1.14 à 1.28 g/ml. Elles ne sont pas agglutinées par le sérum anti-Australia.

*b. Expériences de dégradation* (Tableau 2, Figures 12 à 18)—Les grandes particules résistent aux agents suivants: pH acide, α-amylase, lipase du germe de blé, pepsine et trypsine. L'action du

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

TABLEAU 2

Expériences de dégradation

| Agents | Temps | Particules de type coronavirus | Antigène Australia | Particules de Dane | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | En général | Enveloppe | Capside |
| pH 3 à 8 | 1 min | − | − | − | | |
| pH 9 à 10 | 1 min | + | +++ | +++ | | |
| Chloroforme | 30 min | ++ | ++ | ++ | d | R? |
| Chloroforme | 2 h | +++ | ××× | ××× | | |
| Ether | 30 min | ++ | + | + | d | R |
| Ether | 2 h | +++ | ++ | ++ | d | R |
| Ether–éthanol | 18 h | ××× | ××× | ××× | | |
| SDS | 2 et 18 h | +++ | +++ | ××× | | |
| Tween 80 | 2 h | ? | ++ | ++ | d | R |
| Tween 80 | 18 h | ? | +++ | ××× | | |
| Urée | 2 et 18 h | ? | + | + | r | R |
| α-Amylase | 2 et 18 h | − | − | − | | |
| Lipase, germe de blé | 2 et 18 h | − | +++ | +++ | r | R |
| Lipase pancréatique | 2 h | ++ | + | + | r | R |
| Lipase pancréatique | 18 h | ++ | ++ | ++ | r | R |
| Papaïne | 2 h | + | ++ | + | d | R? |
| Papaïne | 18 h | ++ | +++ | + | d | |
| Pepsine | 2 h | − | + | −? | | |
| Pepsine | 18 h | −? | ++ | + | d | R |
| Phospholipase C | 2 h | + | ++ | ++ | r | R |
| Phospholipase C | 18 h | ++ | +++ | +++ | r | R |
| Trypsine | 2 h | − | ++ | + | d | |
| Trypsine | 18 h | − | ××× | ××× | | |

NOTE: h = heures, min = minutes; d = digestion, r = rupture, R = résistance; − = absence d'effet, +, ++ et +++ = degrés croissants de dégradation, ××× = disparition de toute particule.

TABLEAU 3

Colorations positives et fluorescence

| Agents | Temps | Particules de type coronavirus | Antigène Australia | Particules de Dane |
|---|---|---|---|---|
| Acétate d'uranyle | 5 et 30 min | − | − | + |
| Acétate d'uranyle | 6 et 18 h | − | − | NT |
| Formiate d'uranyle | 5 et 30 min | − | − | + |
| DNase + AcU } | 2 et 18 h, et | − | − | + |
| RNase + AcU } | 30 min (AcU) | − | − | −? |
| Chloroforme + AcU | 30 et 30 min | − | NT | NT |
| Acide osmique | 30 min | (+) | (−) | (−) |
| Orange d'acridine | 5 min | NT | −F | +F |

NOTE: AcU = acétate d'uranyle; h = heures, min = minutes; NT = non testé; + et − = présence ou absence de coloration positive ou de fluorescence (+F, −F).

Tween 80 et de l'urée n'a pu être interprétée. Leur présence sur les grilles génait beaucoup les observations, tandis que le manque de matériel empêchait de répéter les expériences dans d'autres conditions.

Par contre, ces particules sont sensibles aux agents suivants: pH alcalin, chloroforme, éther, mélange éther-alcool, SDS, lipase pancréatique, papaïne et phospholipase C. Les solvants des lipides sont les agents les plus actifs (Figures 13 et 14). La digestion se manifeste surtout à la périphérie: les contours deviennent flous, et il y a accentuation des franges (Figures 12, 14, 17*a* et 18). Les particules n'éclatent pas, et on ne rencontre pas de membranes vides et encore moins un constituant interne quelconque, tout au plus de rares formes creuses à contour flou. Le stade final est une masse amorphe. Quelques agents donnent lieu à des effets particuliers:

Chloroforme: polymorphisme extrême et gonflement suivi de dissolution (Fig. 13).

SDS: aplatissement (Fig. 15).

Lipase pancréatique: formes transparentes, souvent pourvues d'une queue (Fig. 17*b*).

Phospholipase C: gonflement et aplatissement (Fig. 18).

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

*c. Colorations positives* (Tableau 3, Figures 19 à 21)—Tous les essais de coloration positive par l'acétate ou le formiate d'uranyle ont été sans succès (Fig. 19), avec ou sans traitement préalable par la DNase ou la RNase, et ce même après coloration prolongée jusqu'à 18 h. La combinaison de chloroforme qui était employé dans le but "d'ouvrir" les particules et faciliter ainsi la coloration d'un composant interne éventuel, et d'acétate d'uranyle provoque la formation de membranes granuleuses (Fig. 20). L'acide osmique colore très faiblement les particules (Fig. 21).

*2. Autres sérums*

*a. Sérums humains*—Onze sérums ont été examinés. De grandes particules ont été observées dans tous les huit cas d'hépatite, chez l'un des deux porteurs sains d'antigène Australia, et chez un sujet sain. Toutefois, ces particules étaient rares ou différaient de celles du sérum GI; ainsi, un sérum contenait surtout des particules allongées, et un autre des particules plates et larges de 120 nm. Pour ces raisons, les recherches ont été abandonnées; elles indiquent tout au plus que le sérum humain peut contenir des particules inconnues. Il est à noter que deux cas d'hépatite aiguë étaient Australia-négatifs en I.E.O.P., et que l'antigène Australia fut décelé par microscopie électronique.

*b. Sérums de cobaye* (Fig. 7*a*, *b*)—Les sérums de cobayes sains contiennent des particules morphologiquement identiques à celles du sérum GI. Toutefois, il y a relativement plus de particules allongées. Les mêmes particules se rencontrent aussi après inoculation des cobayes avec *L. icterohaemorrhagiae*, mais la leptospirose ne semble pas augmenter leur fréquence.

*c. Fractions lipoprotéiques de sérums humains* (Figures 8 à 11)—En dehors des lipoprotéines normales, la plupart des quatre fractions, VLDL, LDL, HDL et VHDL, des quatre sérums contient des particules dont l'aspect et la taille sont comparables à celles du sérum GI. Elles sont relativement fréquentes dans les fractions HDL et VHDL dans lesquelles se retrouve également l'antigène Australia.

*Antigène Australia et particules de Dane (sérum LA)*

*1. Particules non traitées* (Figures 22 à 24 et 30)

Le sérum LA est riche en antigène Australia et en particules de Dane. Les grandes particules de 80 nm de diamètre sont très rares. L'antigène Australia comprend des formes rondes de 20 nm de diamètre et des formes allongées, de même diamètre mais de longueur variable (Fig. 22). Une faible proportion de ces deux variétés est creuse et pénétrée par le phosphotungstate. Les formes allongées sont polymorphes. Elles présentent parfois des angles droits et des aspects bizarres, telle la particule illustrée dans la Figure 23 qui est peut-être l'antigène Australia le plus curieux qui ait été observé. En aucun cas, nous n'avons vu des sous-unités ou des stries transversales.

Les particules de Dane sont généralement rondes, mais présentent parfois un contour hexagonal (Fig. 24). La moitié sont pleines. Après coloration au phosphotungstate, les particules vides montrent les dimensions suivantes: diamètre total 45 nm, épaisseur de la couche externe ou "enveloppe" 6 nm, diamètre du composant interne ou "capside" 31 nm, épaisseur de la capside 2.5 à 3 nm. Enveloppe et capside sont séparées par une distance de 3 nm. L'enveloppe est flexible. La capside paraît le plus souvent ronde et ne montre pas de sous-unités apparentes. Nous n'avons jamais rencontré des particules enroulées en spirale. L'antigène Australia et les particules de Dane sont agglutinés par le sérum anti-Australia (Fig. 30).

*2. Expériences de dégradation* (Tableau 2, Figures 25 à 29 et 33 à 43)

Antigène Australia et particules de Dane sont sensibles à tous les agents du Tableau 2, à l'exception du pH acide et de l'α-amylase. Les solvants des lipides sont très efficaces (Figures 33 et 34), tandis que la lipase pancréatique et la pepsine (Figures 39 et 41) ont relativement peu d'effet.

La réponse de l'antigène Australia aux différents agents est assez uniforme. Les formes rondes et allongées se comportent de la même façon. La digestion commence généralement à la périphérie: l'antigène Australia perd ses contours, devient flou et semble se dissoudre (Fig. 33). Le stade final qui n'est pas toujours atteint, est une masse amorphe et granuleuse; cependant, il arrive qu'à côté de particules digérées à peu près complètement, on en observe d'autres qui sont plus ou moins intactes (Fig. 34). L'effet maximal des enzymes est généralement visible après 2 h. Plusieurs agents ont un effet particulier:

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

pH alcalin, SDS, Tween 80 et urée: aplatissement et apparition de formes creuses (Figures 35 à 37).

Phospholipase C: à côté d'antigène Australia digéré (Fig. 42*a*), apparition de nombreux anneaux complets ou incomplets (Fig. 42*b*), groupés en amas ou isolés, mesurant 40 nm de diamètre et 5 nm d'épaisseur et composés de deux feuillets séparés par un espace de 2 nm. Ces anneaux se rencontrent aussi après traitement de fractions ne contenant que de l'antigène Australia. La solution-témoin de phospholipase C ne contient que de minces filaments droits.

Si les particules de Dane sont sensibles aux mêmes agents que l'antigène Australia, ceci est vrai surtout pour leur enveloppe qui devient généralement floue et semble se dissoudre. L'urée et les lipases cependant causent surtout une rupture de l'enveloppe qui garde des contours nets (Figures 25, 38 et 39). En outre, après traitement par la phospholipase C et la lipase pancréatique, nous avons observé des particules partiellement digérées qui montrent des spicules à la place de l'enveloppe (Figures 26 et 27).

La capside est beaucoup plus résistante que l'enveloppe. Elle résiste notamment au Tween 80 (Fig. 28), à l'urée (Fig. 29) et aux lipases (Figures 25 à 27, 38 et 39). L'action de la papaïne et de la trypsine n'a pu être déterminée. Après digestion de l'enveloppe, nous avons parfois observé des capsides hexagonales ou pentagonales (Figures 28 et 29).

*3. Colorations positives et fluorescence* (Tableau 3, Figures 31 et 32)

L'acétate et le formiate d'uranyle colorent l'antigène Australia et la plupart des particules de Dane en négatif, en les épaississant (Fig. 31). Ainsi, le diamètre de l'antigène Australia devient 23 nm et celui des particules de Dane 48 nm. Chez ces dernières, l'enveloppe est épaissie et atteint 8 à 10 nm de largeur. Si les particules de Dane sont suffisamment isolées, on observe chez une partie d'entre elles une faible coloration positive (Fig. 32). Le traitement préalable à la DNase est sans effet visible, tandis que la RNase semble entraîner la disparition de la coloration positive. Antigène Australia et particules de Dane ne sont guère colorables par l'acide osmique.

Après coloration par l'orange d'acridine, les préparations riches en particules de Dane présentent une faible fluorescence rouge. Celle-ci est absente des fractions riches en antigène Australia seulement et provenant du même malade. Toutefois, cette fluorescence disparaît après traîtement par l'acide molybdique ou l'acide tartrique.

## Discussion

Une étude morphologique de particules rondes ou polymorphes et plus ou moins inconnues comporte de grandes difficultés d'interprétation. Ainsi, des particules intactes sont plus faciles à déceler que des particules digérées, et l'appréciation des résultats, nécessairement subjective, a été parfois difficile. Par contre, il est à souligner que la présence d'enzymes ne gène pas les observations.

*Particules de type coronavirus*

Les grandes particules du sérum GI ressemblent étroitement à celles décrites par Zuckerman *et al.* (54) et, dans une moindre mesure, à celles observées par Stannard *et al.* (45) dans le sérum humain. Elles diffèrent cependant des particules rencontrées dans le sérum de singes (7). Nous ne pouvons nous prononcer sur les autres observations, faites sur des coupes de foie (42, 43) ou publiées sans photos (25) ou encore sous forme de communications personnelles (*in* 51). Il est à noter que Wright (49), ayant observé les mêmes particules que Zuckerman *et al.*, n'a pu établir de corrélation entre elles et des maladies du foie.

Ces particules ne ressemblent que très vaguement à des coronavirus authentiques (3, 9, 10, 30, 34, 38). Par contre, elles sont morphologiquement voisines de celles que nous avons observées dans les sérums de cobayes et dans les fractions lipoprotéiques de sérums humains. Des particules similaires sont présentes dans la fraction VLDL de sérums humains et de rat (22, 23). Dans ce travail, elles ont été observées essentiellement dans les mêmes fractions que l'antigène Australia: HDL et VHDL. Ceci explique qu'on les retrouve dans les fractions purifiées du sérum GI. Cependant, leur présence dans les quatre fractions VLDL à VHDL indique qu'elles sont hétérogènes, et on ne peut les assigner à une fraction lipoprotéique précise.

Les essais de dégradation n'ont pas permis de mettre en évidence une nucléocapside. Les seules

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

modifications visibles sont l'accentuation de la frange ou la dissolution pure et simple des particules. L'éther et le SDS ne causent ni leur rupture ni la formation de membranes comme chez des coronavirus authentiques (9, 30). En outre, il n'y a pas de coloration positive même après 18 h, alors que 6 h suffisent pour colorer de petits virus cubiques à ARN (27). D'après les résultats des digestions enzymatiques, les particules se comportent comme des phospholipoprotéines avec prédominance des lipides, contenant des phosphatides, de la lécithine et des acides gras. Leur faible colorabilité par l'acide osmique indique qu'elles sont pauvres en acides gras non saturées. Nous pouvons en conclure que les grandes particules du sérum GI sont des lipoprotéines et non pas des corona- ou des paramyxovirus; les assimilations faites par d'autres auteurs (7, 25, 26, 42, 43, 45, 54) restent à prouver.

*Antigène Australia*

Les résultats des essais de dégradation démontrent la nature lipoprotéique de l'antigène Australia. Ainsi, sa structure est affectée par les solvants des lipides, les lipases et les protéases essayées. Ces résultats sont en accord, notamment en ce qui concerne la présence de phospholipides (33), avec ceux d'autres auteurs qui ont étudié la composition de l'antigène Australia par des méthodes biochimiques (18, 20, 29, 33, 46), physicochimiques (6, 36, 46) et histochimiques (28). Des acides gras non saturés semblent être absents. Nous n'avons pu assigner une localisation précise aux constituants lipidiques ou protéiques, bien que les résultats de Kim *et al.* (33) indiquent qu'au moins une partie des lipides se trouve à la surface des particules.

En comparant nos résultats à ceux d'autres auteurs qui ont fait des essais de dégradation (Tableau 4), on constate la rareté des observations au microscope électronique et des différences importantes. Celles-ci s'expliquent en partie par les modes d'investigation employés: les méthodes immunologiques se réfèrent à l'activité biologique, tandis que la microscopie électronique permet de noter des altérations de structure. En outre, les conditions d'expérimentation (concentration des agents, température et durée d'incubation) varient d'un auteur à l'autre, et il est à noter que les résultats des tests immunologiques n'ont pas toujours été quantifiés. En ce qui concerne le présent travail, nous avons délibérément choisi des concentrations élevées d'enzymes et prolongé le temps d'incubation. Néanmoins, il paraît que certains agents comme l'urée, la lipase pancréatique, la trypsine et peut-être aussi la lipase du germe de blé affectent la morphologie des particules en laissant apparemment intacte leur activité antigénique. On doit tenir compte de ces faits lors de la purification de l'antigène Australia dans le but d'études biophysiques et biochimiques.

Par ailleurs, nous avons confirmé que le Tween 80 provoque l'apparition de formes creuses (4), mais ceci est un phénomène plus général, causé aussi par le pH alcalin, le SDS et l'urée. Cependant, nous n'avons pu confirmer que l'éther et le chloroforme n'affectent pas l'antigène Australia (36), ou encore que sa forme allongée soit sélectivement détruite par l'éther (8).

L'observation la plus intéressante est cependant l'apparition, après traitement par la phospholipase C, d'anneaux réguliers. Ces anneaux sont trop nombreux pour provenir uniquement de l'enveloppe des particules de Dane et se retrouvent dans des préparations ne contenant que l'antigène Australia classique. Des anneaux identiques ont été observés, toujours après traitement par la phospholipase C, dans des préparations d'érythrocytes (32), du virus grippal (39, 40), du virus de Rauscher (32, 37) et du virus de la stomatite vésiculeuse (41). Ils sont formés par l'assemblage d'une substance non identifiée, présente dans les préparations de l'enzyme, et de cholestérol ou de sphingomyéline (40). Ces deux composés étant présents dans l'antigène Australia (33), les anneaux que nous avons observés sont donc des produits de cette même réaction.

Nos résultats de coloration par des sels d'uranyle indiquent que l'antigène Australia ne contient pas d'acide nucléique, en contradiction avec le travail de Józwiak *et al.* (29) qui ont trouvé 5% d'ARN. Plus récemment, Brzosko *et al.* (12) ont affirmé que l'antigène Australia est sensible à la RNase, mais sans explications ou photographies à l'appui. Par contre, la présence d'acides nucléiques n'a pu être confirmée par analyse chimique (36), par absorption de lumière ultraviolette (20, 36) ou par coloration (28), et elle est peu compatible avec la faible densité de l'antigène (36). En outre, il n'y a pas de fluorescence après coloration par l'orange d'acridine. Comme d'autres auteurs, nous pensons donc que l'anti-

TABLEAU 4
Comparaison des essais de dégradation

| | | Résultats | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Travaux antérieurs | | | Ce travail |
| Références | Agent | mg/ml* | PA | ME | ME |
| 21, 33 | pH 2 à 5 | | − | NT | − |
| 33 | pH 9 à 10 | | − | NT | + |
| 36 | Chloroforme | ? | + | − | + |
| 21, 33 | Éther | 20% | − | NT | + |
| 8 | Éther | 50% | NT | + | |
| 36 | Éther | ? | + | − | |
| 33 | SDS | 1 et 5 | − | NT | + |
| 21, 33 | SDS | 10 et 20 | + | NT | |
| 3, 35 | Tween 80 | 5 et 20 | NT | + | + |
| 21 | Tween 80 | 10 | − | NT | |
| 33, 46, 47 | Urée | 6 et 8 M | − | NT | + |
| 35 | α-Amylase | ? | − | NT | − |
| 35 | Lipase, germe de blé | ? | − | NT | + |
| 33 | Lipase pancréatique | 0.3 | − | NT | + |
| 33 | Pepsine | 0.2 | − | NT | + |
| 35 | Phospholipase C | ? | − | NT | + |
| 33, 35 | Trypsine | 0.5 et ? | − | NT | + |

NOTE: * = sinon indiqué autrement; PA = propriétés antigéniques, généralement déterminées par immunodiffusion ou fixation du complément; ME = microscopie électronique; NT = non testé; + et − = présence ou absence d'effets.

gène Australia n'est pas un virus (17, 35, 48), mais du matériel viral synthétisé en excès (1, 2, 4, 13, 14, 16, 20, 28, 36).

*Particules de Dane*

Les dimensions des particules de Dane sont légèrement supérieures à celles des meilleures descriptions (16, 28); de telles divergences sont courantes en microscopie électronique. Nous avons confirmé la présence de capsides hexagonales ou pentagonales (16, 50) indiquant une structure icosaédrique, mais non pas de sous-unités globuleuses (28) ou de particules enroulées en spirale (17, 55).

L'enveloppe des particules de Dane, sensible aux mêmes agents que l'antigène Australia, est probablement de nature lipoprotéique. Ce fait était d'ailleurs à prévoir, puisque les particules de Dane sont agglutinées par le sérum anti-Australia (1, 2, 15, 16, 17, 19, 28), tandis que la présence de lipides avait été suggérée par la colorabilité de l'enveloppe au permanganate de potassium (28). Quant aux spicules observées après traitement par la phospholipase C et la lipase pancréatique, elles peuvent représenter des sous-unités ou des macromolécules ayant résisté à la digestion.

La capside est beaucoup plus résistante que l'enveloppe et résiste à l'éther et aux lipases. Ceci indique qu'elle est de nature protéique. Elle peut être séparée de l'enveloppe par le Tween 80, ce qui confirme les observations d'Almeida *et al.* (4). D'autres agents, surtout l'urée, ont le même effet et peuvent être utilisés pour préparer des capsides isolées.

De même que Jokelainen *et al.* (28), nous avons obtenu une coloration positive par l'acétate d'uranyle, indiquant la présence d'acides nucléiques et peut-être d'ARN: la coloration observée a été faible, et l'on sait que les virus à ARN se colorent mal à l'acétate d'uranyle (27, 44). Nos expériences de digestion par la DNase et la RNase suggèrent aussi la présence d'ARN, mais ne sont pas concluantes. Pour en être certain, il faudrait disposer de préparations ne contenant que des particules pleines, seules susceptibles de contenir de l'acide nucléique. L'orange d'acridine indique également que les particules de Dane contiennent de l'acide nucléique. La fluorescence rouge suggère qu'il s'agit d'ADN ou d'ARN monocaténaire (11). Cependant, la fluorescence ayant disparu après traitement par l'acide molybdique ou l'acide tartrique, nous n'avons pu trancher entre ces deux constituants possibles. Ces expériences doivent être reprises avec des préparations plus riches. En conclusion, nous

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

pensons que nos résultats appuient l'hypothèse de la nature virale des particules de Dane.

## Remerciements

Ce travail a bénéficié des octrois 604-7-804 et D-1-8112 du Ministère des Affaires Sociales de la Province de Québec.

Nous remercions Mlles C. Montégu et H. Plante et MM. C. Beaulieu et J.-P. Dubé pour leur assistance technique, et les docteurs G. Bertrand et M. Lacerte pour nous avoir fourni les sérums utilisés dans les expériences.

1. Almeida, J. D. 1971. Electron microscopic observations and speculations on Australia antigen. Postgrad. Med. J. **47**: 484–487.
2. Almeida, J. D. 1972. Individual morphological variations seen in Australia antigen positive sera. Am. J. Dis. Child. **123**: 303–309.
3. Almeida, J. D., A. P. Waterson, J. M. Trowell et G. Neale. 1970. The finding of virus-like particles in two Australia-antigen positive human livers. Microbios, **6**: 145–153.
4. Almeida, J. D., D. Rubenstein et E. J. Stott. 1971. New antigen–antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. Lancet, **2**: 1225–1227.
5. Almeida, J. D., et D. A. J. Tyrrell. 1967. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. J. Gen. Virol. **1**: 175–178.
6. Alter, H. J., et B. S. Blumberg. 1966. Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia antigen). Blood J. Hematol. **27**: 297–309.
7. Apodaca, J., W. Lange, G. Tochtermann et H. Köhler. 1970. Nachweis von virusähnlichen Partikeln im Serum von Affen mit experimentell erzeugter infektiöser Hepatitis. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. **214**: 480–481.
8. Barker, L. F., K. O. Smith, W. D. Gehle et N. R. Shulman. 1969. Some antigenic and physical properties of virus-like particles in sera of hepatitis patients. J. Immunol. **102**: 1529–1532.
9. Berry, D. M., J. G. Cruickshank, H. P. Chu et R. J. H. Wells. 1964. The structure of infectious bronchitis virus. Virology, **23**: 403–407.
10. Bradburne, A. F., et D. A. J. Tyrrell. 1971. Coronaviruses of man. Prog. Med. Virol. **13**: 373–403.
11. Bradley, D. E. 1966. The fluorescent staining of bacteriophage nucleic acids. J. Gen. Microbiol. **44**: 383–391.
12. Brzosko, W. J., R. A. Mäntyjärvi et K. Madalinski. 1972. Structure of Australia antigen. Acta Virol. **16**: 440–443.
13. Cossart, Y. E. 1972. What is Australia antigen? Am. J. Dis. Child. **123**: 321–322.
14. Couleru, O. G., R. Moulias et A. German. 1972. Morphologic evolution of the Australia antigen in one case of hepatitis. Am. J. Dis. Child. **123**: 318–319.
15. Cross, G. F., M. Waugh, A. A. Ferris, I. D. Gust et J. Kaldor. 1971. Virus-like particles associated with a faecal antigen from hepatitis patients and with Australia antigen. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. **49**: 1–9.
16. Dane, D. S., C. H. Cameron et M. Briggs. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet, **1**: 695–698.
17. Desmyter, J., W. T. Liu et J. Creemers. 1972. The large particle of Australia antigen. Am. J. Dis. Child. **123**: 315–318.
18. Dreesman, G. R., F. B. Hollinger, J. F. Suriano, R. S. Fujioka, J. P. Brunschwig et J. L. Melnick. 1972. Biophysical and biochemical heterogeneity of purified hepatitis B antigen. J. Virol. **10**: 469–476.
19. Ferris, A. A. 1972. Antigen in infectious hepatitis. Br. Med. Bull. **28**: 131–133.
20. Gerin, J. L., P. V. Holland et R. H. Purcell. 1971. Australia-antigen: large-scale purification from human serum and biochemical studies of its protein. J. Virol. **7**: 569–576.
21. Gerin, J. L., R. H. Purcell, M. D. Hoggan, P. V. Holland et R. M. Chanock. 1969. Biophysical properties of Australia antigen. J. Virol. **4**: 763–768.
22. Hamilton, R. L. 1968. Ultrastructural aspects of hepatic lipoprotein synthesis and secretion. Proc. Deuel Conf. Lipids 1968. *Rédigé par* C. Cowgill. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. pp. 2–31.
23. Hamilton, R. L., R. J. Havel, J. P. Kane, A. E. Blaurock et T. Sata. 1971. Cholestasis: lamellar structure of the abnormal human serum lipoprotein. Science (Wash.), **172**: 475–478.
24. Hatch, F. T., et R. S. Lees. 1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. Adv. Lipid Res. **6**: 1–68.
25. Holmes, A. W., F. Deinhardt, W. Harris, F. Ball et G. Cline. 1970. Coronaviruses and viral hepatitis. J. Clin. Invest. **49**: 45*a*.
26. Hunter, J., M. Carrella, R. Williams, P. E. Taylor, A. J. Zuckerman et R. G. Bird. 1970. Hepatitis associated antigen and paramyxovirus-like particles in heroin addicts and patients with chronic liver disease. Proc. 5th Meet. Eur. Assoc. Study Liver, Berne. Hans Huber Publ., Berne. p. 21. (*Cité d'après* Zuckerman, références 51 et 52.)
27. Huxley, H. E., et G. Zubay. 1961. Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. **11**: 273–296.
28. Jokelainen, P. T., K. Krohn, A. M. Prince et N. D. C. Finlayson. 1970. Electron microscopic observations on virus-like particles associated with SH antigen. J. Virol. **6**: 685–689.
29. Józwiak, W., J. Koščielak, K. Madalinski, W. J. Brzosko, A. Nowoslawski et M. Kloczewiak. 1971. RNA of Australia antigen. Nat. New Biol. (Lond.), **229**: 92–94.
30. Kaye, H. S., J. C. Hierholzer et W. R. Dowdle. 1970. Purification and further characterization of an "IBV-like" virus (coronavirus). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **135**: 457–463.
31. Kelen, A. E., A. E. Hathaway et D. A. McLeod. 1971. Rapid detection of Australia/SH antigen and antibody by a simple and sensitive technique of immunoelectronmicroscopy. Can. J. Microbiol. **17**: 993–1000.
32. Kemp, C. L., et A. F. Howatson. 1966. Action of phospholipase C on erythrocyte membranes and Rauscher virus. Virology, **30**: 147–151.
33. Kim, C. Y., et D. M. Bissell. 1971. Stability of the lipid and protein of hepatitis-associated (Australia) antigen. J. Infect. Dis. **123**: 470–476.
34. Marsolais, G., L. Berthiaume, E. DiFranco et P. Marois. 1971. Rapid diagnosis by electron microscopy of avian coronavirus infection. Can. J. Comp. Med. **35**: 285–288.

35. MILLMAN, I., H. HUTANEN, F. MERINO, M. E. BAYER et B. S. BLUMBERG. 1971. Australia antigen: physical and chemical properties. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. **2**: 667–686.
36. MILLMAN, I., L. A. LOEB, M. E. BAYER et B. S. BLUMBERG. 1970. Australia antigen (a hepatitis-associated antigen). J. Exp. Med. **131**: 1190–1199.
37. PADGETT, F., et A. S. LEVINE. 1965. Ultrastructure of Rauscher virus after phospholipase C treatment. Virology, **27**: 633–637.
38. PARKER, J. C., S. S. CROSS et W. P. ROWE. 1970. Rat coronavirus (RCV): a prevalent, naturally occurring pneumotropic virus of rats. Arch. Gesamte Virusforsch. **31**: 293–302.
39. SIMPSON, R. W., et R. E. HAUSER. 1965. Structures associated with influenza virus suspensions treated with phospholipase C. Virology, **27**: 642–646.
40. SIMPSON, R. W., et R. E. HAUSER. 1966. Influence of lipids on the viral phenotype. I. Interaction of myxoviruses and their lipid constituents with phospholipases. Virology, **30**: 684–697.
41. SIMPSON, R. W., et R. E. HAUSER. 1966. Structural components of vesicular stomatitis virus. Virology, **29**: 654–667.
42. SIRTORI, C. 1970. Evidenza di virus al microscopio elettronico in biopsie epatiche di bambini con epatite infettiva trattati con azathioprine. Tentative di cultura *in vitro* del virus. Rapporti fra epatite e cancro epatico. Gaslini, **2**: 5–48.
43. SIRTORI, C. 1970. Virus-like particles in infectious hepatitis. Lancet, **2**: 824.
44. SMITH, K. O., et J. L. MELNICK. 1962. A method for staining virus particles and identifying their nucleic acid in the electron microscope. Virology, **17**: 480–490.
45. STANNARD, L. M., J. MOODIE, G. A. KEEN et A. KIPPS. 1973. Electron microscopic study of the distribution of the Australia antigen in individual sera of 50 serologically positive blood donors and two patients with serum hepatitis. J. Clin. Pathol. (Lond.), **26**: 209–216.
46. SUKENO, N., R. SHIRACHI, J. YAMAGUCHI et N. ISHIDA. 1972. Reduction and reoxidation of Australia antigen: loss and reconstitution of particle structure and antigenicity. J. Virol. **9**: 182–183.
47. VYAS, G. N., K. R. RAO et A. B. IBRAHIM. 1972. Australia antigen (hepatitis B antigen): a conformational antigen dependent on disulfide bonds. Science (Wash.), **178**: 1300–1301.
48. WEINBREN, K., et G. A. STIRLING. 1972. Pathology of viral hepatitis. Br. Med. Bull. **28**: 125–130.
49. WRIGHT, R. 1972. Chronic hepatitis. Br. Med. Bull. **28**: 120–124.
50. ZALAN, E., J. J. HAMVAS, B. A. TOBE, O. KUDEREWKO et N. A. LABZOFFSKY. 1971. Association of virus-like particles with Australia antigen in serum of patients with serum hepatitis. Can. Med. Assoc. J. **104**: 145–147.
51. ZUCKERMAN, A. J. 1970. A conceptual basis of viral hepatitis. Vox Sang. **19**: 304–310.
52. ZUCKERMAN, A. J. 1971. The multiple aetiology of viral hepatitis. Postgrad. Med. J. **47**: 476–480.
53. ZUCKERMAN, A. J. 1971. Ultrastructural features of antigens associated with human hepatitis. Can. Med. Assoc. J. **106**: 497–502.
54. ZUCKERMAN, A. J., P. E. TAYLOR et J. D. ALMEIDA. 1970. Presence of particles other than the Australia-SH antigen in a case of chronic active hepatitis with cirrhosis. Br. Med. J. **1**: 262–264.
55. ZUCKERMAN, A. J., P. E. TAYLOR et R. G. BIRD. 1970. Review: antigens and viruses in acute hepatitis. Clin. Exp. Immunol. **7**: 439–452.

## EXPLICATION DES FIGURES

FIGS. 1 à 11. Particules de type coronavirus non traitées; phosphotungstate de sodium; × 297 000. Les traits représentent 100 nm. Figs. 1 à 6. Particules du sérum GI. Noter le pont en Fig. 2, le halo en Fig. 3 et les queues sur les Figures 5 et 6. Fig. 7. Particules rencontrées dans le sérum de cobayes sains (*a*) ou infectées avec des leptospires (*b*). Figs. 8 à 11. Particules trouvées dans les fractions lipoprotéiques de sérums humains: fraction VLDL (Figures 8 et 9), HDL (Fig. 10) et VHDL (Fig. 11). Les Figures 8 et 9 montrent probablement des lipoprotéines normales et illustrent le risque de confusion entre lipoprotéines et particules de type coronavirus. Comparer les Figures 6 et 8.

FIGS. 12 à 21. Particules du sérum GI après dégradation et essais de coloration positive. Figs. 12 à 18. Phosphotungstate de sodium. Figs. 19 et 20. Acétate d'uranyle. Fig. 21. Acide osmique. × 297 000. Les traits représentent 100 nm. h = heures, min = minutes. Figs. 12 à 18. Expériences de dégradation. Fig. 12. pH 9; Figs. 13*a* et *b*. Chloroforme, 2 h. Figs. 14*a* et *b*. Ether, 2 h. Fig. 15. SDS, 18 h. Fig. 16. Papaïne, 18 h. Figs. 17*a* et *b*. Lipase pancréatique, 2 h. Fig. 18. Phospholipase C, 18 h. Noter l'accentuation de la frange (Figs. 12, 14, 17*a* et 18), l'absence d'un composant interne (Fig. 13) et des particules devenues transparentes (Fig. 17*b*, flèches). Figs. 19 à 21. Essais de coloration positive. Fig. 19. Acétate d'uranyle, 30 min; l'acétate d'uranyle donne lieu à une coloration négative seulement; les particules traitées par la DNase ou la RNase présentent le même aspect. Fig. 20. Chloroforme, 30 min, et acétate d'uranyle, 30 min. Fig. 21. Acide osmique, 30 min; la Figure est artificellement contrastée.

FIGS. 22 à 32. Antigène Australia et particules de Dane non dégradés, structure des particules de Dane et coloration positive. Figs. 22, 31 et 32. Acétate d'uranyle. Figs. 23 à 30. Phosphotungstate de sodium. Fig. 22. × 148 500. Figs. 23 à 32. × 297 000. Les traits représentent 100 nm. h = heures, min = minutes. Figs. 22 à 24, 30 et 31. Particules avant dégradation. Fig. 22. Aspect général des préparations. Fig. 23. Antigène Australia d'aspect inhabituel. Figs. 24, 30 et 31: voir plus bas. Figs. 24 à 30. Structure des particules de Dane. Fig. 24. Particule non traitée, pleine et à contour plus ou moins hexagonal. Fig. 25. Rupture de l'enveloppe et libération d'une capside pleine, phospholipase C, 18 h; cette photographie rare montre que les particules pleines possèdent effectivement un composant interne et ne sont pas des lipoprotéines. Figs. 26 et 27. Apparition de spicules après digestion de l'enveloppe; phospholipase C et lipase pancréatique, 18 h. Fig. 28. Capside hexagonale; Tween 80, 2 h. Fig. 29. Capside pentagonale; urée, 2 h, à gauche. Fig. 30. Antigène Australia et une particule de Dane agglutinés par du sérum anti-Australia; les spicules correspondent à des anticorps. Fig. 31. Coloration négative par l'acétate d'uranyle; une des deux particules de Dane est vide et pénétrée par le colorant, tandis que l'intérieur de la particule pleine est resté incolore. Noter l'épaississement des structures et comparer avec Fig. 23. Fig. 32. Coloration positive par l'acétate d'uranyle seul, 15 min, et après traitement par la DNase, 18 h, à droite.

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

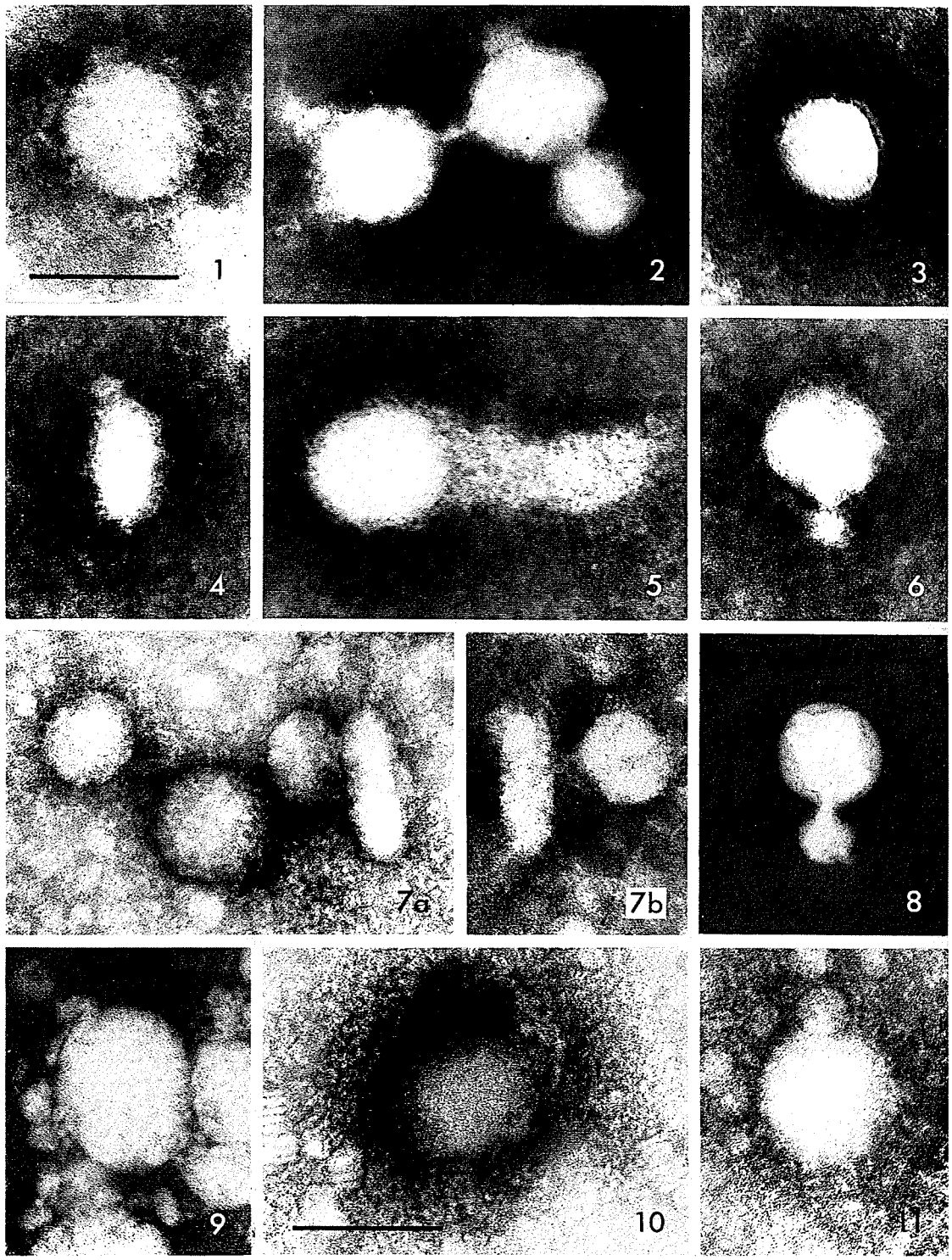
FIGS. 33 à 43. Antigène Australia et particules de Dane dégradés; phosphotungstate de sodium; × 297 000. Les traits représentent 100 nm. h = heures. Fig. 33. Chloroforme, 2 h. Fig. 34. Ether, 2 h; remarquer les restes de particules allongées (flèches). Fig. 35. SDS, 18 h. Fig. 36. Tween 80, 18 h. Fig. 37. Urée, 2 h; noter les formes creuses sur les deux dernières Figures. Fig. 38. Lipase du germe de blé, 18 h; remarquer l'épaississement des enveloppes des particules de Dane. Fig. 39. Lipase pancréatique, 18 h: antigène Australia et une particule de Dane éclatée. Fig. 40. Papaïne, 2 h. Fig. 41. Pepsine, 18 h: présence de particules intactes ou fortement digérées. Fig. 42. Phospholipase C, 2 et 18 h: antigène Australia digéré (*a*) et anneaux en amas (*b*); remarquer les filaments qui semblent représenter la phospholipase C elle-même (flèche). Fig. 43. Trypsine, 2 h: deux particules fortement endommagées.

NOTE: Les figures 1–43 suivent.

Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

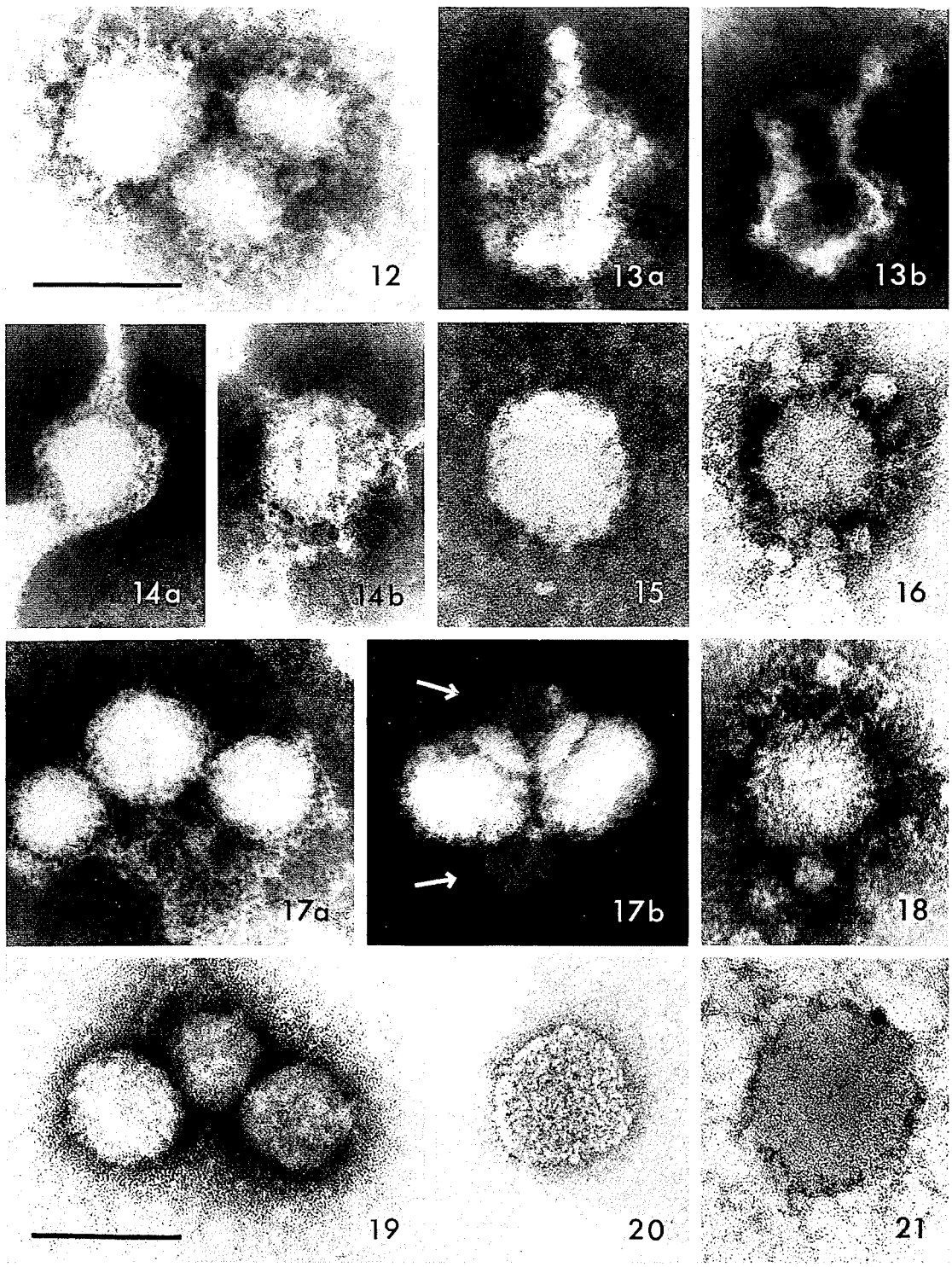
Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.





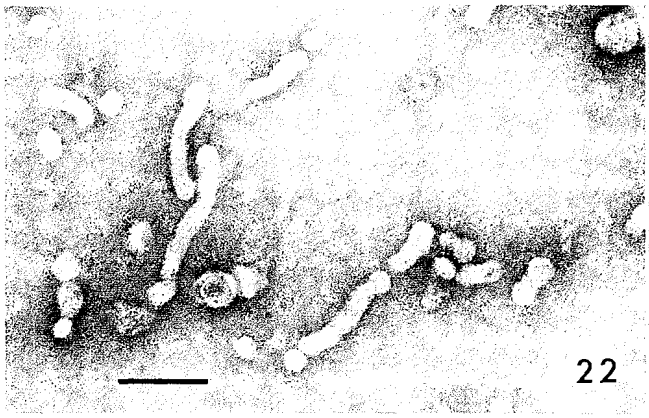
Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

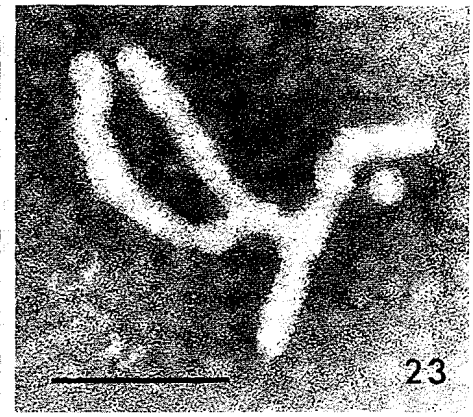


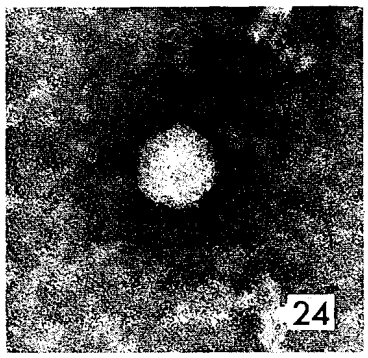


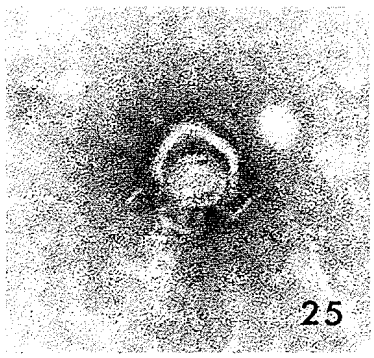
Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.

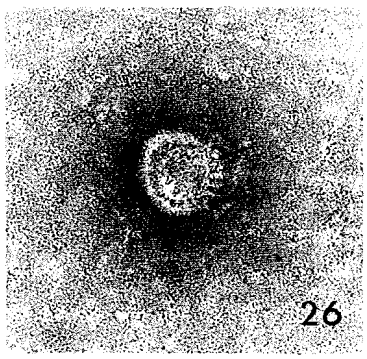


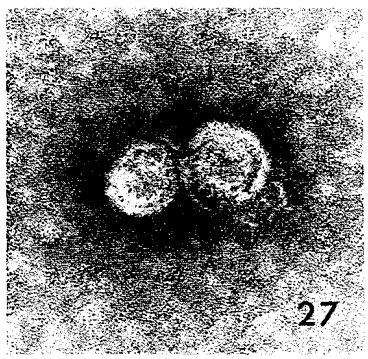


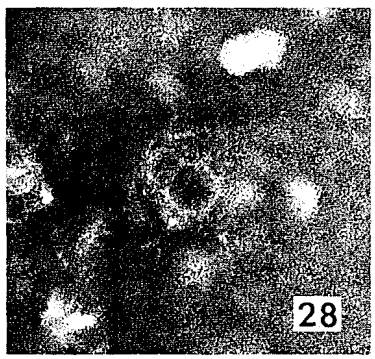



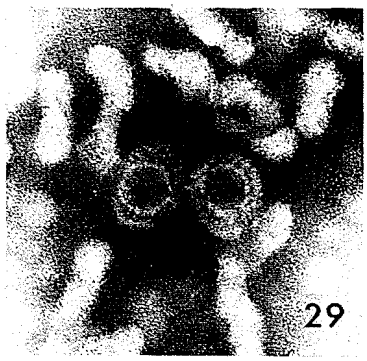



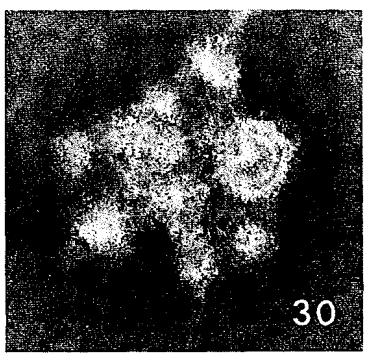



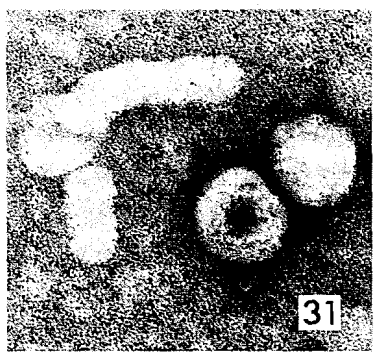



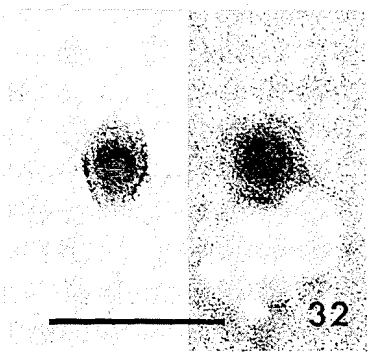
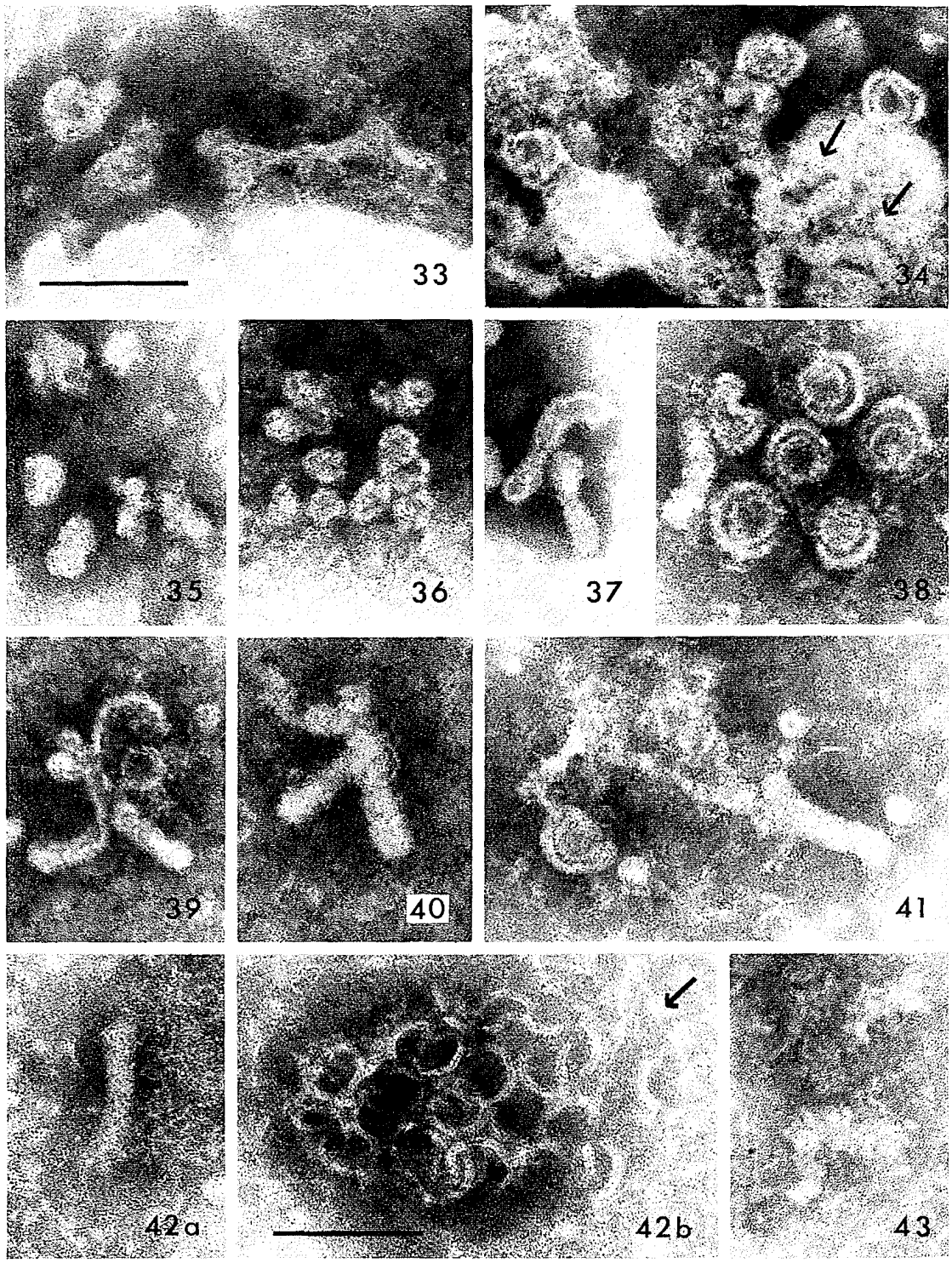






Can. J. Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by University of P.E.I. on 11/18/14
For personal use only.