

ANNALES
DE LA
SOCIÉTÉ LINNÉENNE
DE LYON

Année 1914

(NOUVELLE SÉRIE)

TOME SOIXANTE UNIÈME

LYON
H. GEORG, LIBRAIRE-ÉDITEUR
36, PASSAGE DE L'HOTEL-DIEU
MÊME MAISON A GENÈVE ET A BALE

1915

DE LA PLACE

OCCUPÉE PAR

LA BIOPHOTOGÉNÈSE

DANS LA SÉRIE DES PHÉNOMÈNES LUMINEUX ⁽¹⁾

PAR

LE D^r RAPHAEL DUBOIS

Professeur de Physiologie générale et comparée à l'Université de Lyon.

Mémoire présentée à la Société Linnéenne de Lyon,
dans sa séance du 12 janvier 1914.

I. — Propriétés et caractères physico-chimiques de la luciférase et de la luciférine.

J'ai établi expérimentalement et d'une manière irréfutable que l'on peut extraire séparément des organes lumineux deux substances photogènes distinctes, et qu'après destruction complète des cellules d'où elles proviennent et filtration de leurs sols, on peut les faire réagir l'une sur l'autre *in vitro*, et obtenir ainsi une lumière en tout semblable à celle des organes où elles existent pendant la vie.

Le phénomène physiologique se trouve ainsi réduit à un phénomène physico-chimique.

L'analyse peut être poussée plus loin.

Quelle est la nature de ce phénomène ultime? E. Wiedemann a donné le nom de *luminescence* à cette transformation en lumière des formes de l'énergie autres que l'énergie calorifique. Il y aura luminescence chaque fois que l'émission lumineuse ne suivra pas les lois établies pour le rayonnement d'un corps à température homogène, en particulier quand un

(1) V. Raphaël Dubois : *la Vie et la Lumière*, 1 vol., 340 p., 46 fig., chez Alcan, édit., Paris, 1914.

corps émettra de la lumière à basse température. C'est bien le cas des organismes vivants lumineux, et d'ailleurs, nos recherches sur la lumière des Pyrophores, celles moins anciennes de Véry et Langley, de W. Coblentz (1), etc., ne prouvent-elles pas jusqu'à l'évidence qu'il convient de ranger la biophotogénèse parmi les processus de *lumière froide* ? Il est vrai que l'on pourra toujours soutenir que nous ne connaissons pas la température des *parties lumineuses*, qu'en chauffant au rouge avec un courant électrique un fil de platine fin et court tendu dans l'air, il émet un rayonnement calorifique normal, mais que, plongé dans l'eau ou dans un liquide peu conducteur, ce fil rougit encore, et pourtant un thermomètre plongé dans le liquide accusera une basse température. Sans doute ; mais ce qu'il faut envisager surtout, c'est la nature physique de la lumière émise, la température à laquelle elle peut encore être émise ; or, mes expériences de jadis ont montré qu'elle pouvait survivre à la congélation, résultat vérifié par d'autres expérimentateurs, et qu'elle ne renferme que des quantités infinitésimales d'énergie calorifique et chimique. La biophotogénèse a donc incontestablement droit de cité parmi les luminescences : cette lumière est une *luminescence*.

Mais elles sont nombreuses les luminescences connues. Wiedemann en comptait quatorze espèces et Guichant a porté ce nombre à dix-sept, et encore cet auteur déclare-t-il qu'il n'a pas la prétention de cataloguer toutes les observations faites jusqu'à ce jour (2). On pourrait réduire à seize les cas qu'il a envisagés, car il est bien évident que la réaction que je provoque *in vitro* peut rentrer dans le groupe n° 1 de sa classification, si l'on veut considérer les zymases comme quelque chose de chimique, ce qui est discutable. Cependant, et alors, la biophotogénèse devient un phénomène de *chimieluminescence*. Mais, dans ce groupe, on peut établir des subdivisions. Il y a des chimieluminescences qui sont le résultat d'hydratations, telle que celle qui accompagne la dissolution de

(1) William W. Coblentz : « A physical study of the Firefly. » (*Published by the Carnegie Institution of Washington, 1912.*)

(2) J. Guichant : « L'émission de la lumière à basse température. » (*Revue scientifique, 28 juillet 1906.*)

l'acide sulfurique concentré, de l'anhydride sulfurique dans l'eau, la réhydratation du sulfate de quinine après qu'il a été chauffé, etc. Elles peuvent se montrer dans l'action du chlore, du brome, de l'iode, sur les tranches fraîches de potassium et de sodium, etc., etc.

Mais le sous-groupe le plus important des chimieluminescences est incontestablement celui des *oxyluminescences*. C'est dans ce dernier que se trouvent les plus brillantes : celle du phosphore est connue depuis longtemps ; mais elles peuvent aussi s'opérer par voie humide. Les anciens apothicaires savaient que les graisses chauffées à un certain degré dégagent des lueurs phosphorescentes, et c'est ce qui amena, avec les expériences de Callaud, d'Annecy et de Pelletier, Radziszewski à découvrir la chimieluminescence de plusieurs corps quand on les chauffe avec de la potasse alcoolique, ou, plus exactement, avec une solution concentrée de potasse caustique dans l'alcool. Il put même obtenir à froid la luminescence avec la lophine, et substituer à la potasse des alcalis moins énergiques, d'origine animale. Il avait soupçonné que la lumière produite par les animaux pourrait bien être un phénomène de chimieluminescence, mais il n'apporta aucune preuve expérimentale du bien-fondé de cette hypothèse, car il ne fit aucune recherche sur les animaux, ni sur les végétaux lumineux (1).

Aux corps chimiquement luminescents découverts par Radziszewski, j'en ai ajouté un nombre important (2). J'ai montré que plusieurs essences brillent à froid en présence de la potasse alcoolique et que c'est un moyen de découvrir certaines falsifications, de déterminer pratiquement et rapidement la nature réelle et le degré de pureté de certains produits. Ainsi, l'essence de rose ou roséol donne de la luminescence, tandis que celles du pélargonium, du géranium, du bois de rose, ne fournissent aucune lumière. Quelques résultats nou-

(1) Radziszewski : « Ueber die phosphorescenz der organischen und inorganisirten Körper. » (In *J. Liebig's Ann. d. Chem.*, V, 262, p. 305-306, 1880.) — « Untersuchungen über hydrobenzamid amarine und Lophin. » (*Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft*, V, 10, p. 70, Berlin, 1877.) — « Sur les corps organiques phosphorescents. » (*C. R. Ac. des Sc.*, t. 84, p. 305, 1877.)

(2) Raphaël Dubois : « Sur la luminescence obtenue avec certains composés organiques. » (*C. R. Ac. des Sc.*, p. 431, 1901.)

veaux ont été ajoutés par E. Bridon dans un travail intitulé : *Sur quelques phénomènes de fluorescence d'origine mécanique* (Lyon, 1903) inspiré par mes recherches.

Les essences contenant des phénols et leurs dérivés paraissent être celles qui donnent les meilleurs résultats [essence de thym, de giroflée (eugénol), de badiane (anéthol)]. Vient ensuite les acétones : le carvone (essence de Carvi), la thuyone (essence d'absinthe), les terpènes et sesquiterpènes [essence de térébenthine (vieille), de citron, de genièvre]; les aldéhydes plus rarement (essence de cumin). Radziszewski pensait que c'est l'oxydation lente des aldéhydes à l'état naissant ou la réaction alcaline qui est la cause immédiate de la luminescence. Blanchetière, malgré des essais nombreux (1), n'a pu savoir quels sont les noyaux organiques dont dépend la production de la luminescence de divers corps, provoquée par oxydation. Il n'a pas davantage pu comparer la lumière ainsi obtenue avec celle fournie par les animaux lumineux : « A l'œil, dit-il, l'analogie est frappante entre la luminosité des composés organiques et celle des organismes lumineux. La comparaison des spectres fournira les plus précieux renseignements sur l'origine de cette lumière. » Il convient de rappeler que la composition physique de la lumière fournie par les phénomènes de luminescence est connue depuis longtemps; elle est, en effet, très analogue à celle des organismes vivants. Mais ce n'est pas cette méthode comparative qui nous a livré le secret de la biophotogénèse.

Max Frank (2) a obtenu une belle lumière en mélangeant de l'acide pyrogallique en solution à 20 % avec quelques gouttes de formol, un peu de soude ou de potasse caustique, et du perhydrol ou eau oxygénée à 100 volumes. Le spectre de cette luminescence ressemblerait, d'après l'auteur, à celui du Ver luisant.

On a conseillé d'ajouter une trace de sulfite de soude.

Les corps les plus divers peuvent donner de la luminescence par des processus d'oxydation, à condition que celle-ci soit assez lente. La chaleur favorise la production de l'oxylumines-

(1) Blanchetière : « Oxydation et luminescence. » (*C. R.*, 15 juin, 1913.)

(2) *V. Zeitsch. f. Phys.-Chem.*, V, 53, p. 1-111, 1905.

cence jusqu'à une température voisine de 30 degrés, et paraît augmenter la rapidité de la réaction, en même temps qu'elle diminue la longueur d'onde des radiations émises et la durée du phénomène. C'est ce qui explique les variations que subit la lumière de certains organismes (Pyrosomes, etc.) quand on élève la température du milieu ambiant. Une foule de corps organiques de composition différente peuvent donner, par oxydation, de la lumière. En dehors de ceux dont j'ai déjà parlé, citons les corps gras, les siccatifs surtout, la glu, les peptones dans certaines conditions, parfois l'urine, l'extrait de viande, etc., et cela est intéressant pour le point de vue auquel nous sommes placés, ainsi qu'on le verra bientôt à propos de la luciférine. Mais la luminescence qui se rapproche le plus de celle des organismes vivants est certainement celle que j'ai découverte en 1901 : je veux parler de l'oxyluminescence de l'esculine. Non seulement ce glucoside — le seul signalé comme luminescent — est un produit naturel, mais il est fluorescent et brille à froid dans des conditions à peu près identiques à celles de la luciférine (1). Sa luminescence est aussi belle que celle du mucus lumineux de la Pholade; l'ammoniaque l'excite, le froid, même au-dessous de zéro, ne l'éteint pas.

Il serait superflu d'insister davantage sur ce point après ce qui a été dit dans mon dernier mémoire présenté à la Société Linnéenne de Lyon, le 23 juin 1913 (2). Ajoutons seulement que, de l'ensemble de ces faits, il résulte manifestement que *la biophotogénèse est une luminescence — une chimieluminescence — une oxyluminescence.*

II. — Caractères et propriétés, de la luciférase.

Cette oxyluminescence a pourtant quelque chose de très spécial, de très original, et qui n'avait pas été compris avant la découverte que j'ai faite en 1886 (2). Elle est produite par une zymase : la luciférase.

(1) Raphaël Dubois : « Mécanisme intime de la production de la lumière par les organismes vivants. » (*Ann. de la Soc. Linn. de Lyon*, 1913.)

(2) Raphaël Dubois : « Contribution à l'étude de la production de la

La luciférase est bien une zymase, car tout ce qui favorise, entrave, suspend, détruit ou respecte les zymases agit de même sur elle.

Mais les zymases sont nombreuses : à quelle catégorie la luciférase appartient-elle? et quels sont ses caractères spécifiques?

La luciférase est une zymase oxydante; tout le prouve.

Son caractère principal, spécifique, est de donner de la lumière par son mélange avec la luciférine en présence de l'eau, tout en présentant les propriétés générales des zymases.

Son rôle de zymase oxydante est défini par ce fait qu'elle peut être remplacée dans la réaction photogène par des oxydants chimiques nettement définis : permanganate de potasse, bioxyde de plomb, bioxyde de baryum, eau oxygénée avec ou sans addition d'hématine, de liqueur cupro-potassique, hypochlorites, etc., qui donnent tous de la lumière avec la luciférine. J'ajouterai, pour qu'il ne reste aucun doute sur son action oxydante, les réactions suivantes :

Pyrogallol, coloration brun marron accentuée par l'ammoniaque.

Tannin, coloration verdâtre, accentuée par l'ammoniaque.

Hydroquinone, coloration brun marron, fortement accentuée par l'ammoniaque.

Gaïacol, coloration jaune, accentuée par l'ammoniaque.

Quinone, coloration brun-rouge, accentuée par l'ammoniaque.

Réactif de Tromsdorf, coloré par une trace de sulfite et d'acide sulfurique, est décoloré par la luciférase et recoloré par la poudre de zinc.

Chlorhydrate de diamidophénol, coloration d'abord bleuâtre, puis verdâtre, puis brune, activée par l'ammoniaque.

Paraphénylène, diamine et naphтол, coloration bleue.

Naphтол B, coloration bleue plus lente.

Teinture de gaïac, pas de coloration bleue.

Teinture de gaïac et eau oxygénée neutre, coloration bleue.

lumière par les êtres vivants : les Elatérides lumineux » (*thèse de la Fac. des Sciences de Paris*, 1886 (ouvrage récompensé par l'Institut, grand prix des Sciences physiques, 1887).

Par ces deux derniers caractères, la luciférase s'éloignerait des oxydases pour se rapprocher des peroxydases.

En réalité, cette division, établie pour les différentes zymases oxydantes est devenue absolument insuffisante. C'est un cadre beaucoup trop étroit, comme l'ont d'ailleurs bien montré les belles recherches de Stern et Batelli, sur les oxydases.

La luciférase, qui jouit de certaines propriétés des oxydases et des peroxydases, se rapproche aussi des oxydones par quelques caractères, principalement par la difficulté que l'on éprouve à l'isoler, par sa labilité très grande, surtout en présence de l'alcool fort, et des anesthésiques généraux solubles tels que le chloroforme et l'éther. La trypsine la détruit. Elle constitue, pour ainsi dire, le trait d'union entre les oxydases, les peroxydases, les oxydones et la substance vivante ou bioprotéon proprement dit, et c'est précisément ce qui, pendant si longtemps, m'a fait hésiter à déclarer que le processus intime, ultime de la biophotogénèse, était ou n'était pas un processus vital. C'est une nouvelle confirmation de ce que j'ai toujours soutenu, à savoir qu'entre ce qui vit et ce qui est considéré comme non vivant, il n'y a aucune limite précise. On passe insensiblement de ce qui vit à ce qui ne vit pas, ou ne vit plus, et ce n'est pas là le point le moins intéressant de nos études que d'avoir, par la luciférase, jeté un pont entre la vie et la mort !

Composition de la luciférase. — C'est donc une zymase, et c'est une zymase oxydante d'une nature spéciale. La nature et le mode d'action des zymases n'est pas aussi obscur que paraît le supposer M. Achalme, qui trouve qu'en établissant que la biophotogénèse est le résultat d'une action zymasique, on ne fait que reculer le problème sans le résoudre (1). Disons d'abord que tous les savants compétents en matière de zymases sont d'accord pour admettre que, toujours, à côté des propriétés protéiques des zymases, on peut distinguer celles qui appartiennent à de certains métaux, et particulièrement ceux qui sont susceptibles de donner des peroxydes : manganèse (Bertrand) cuivre (Bourquelot), fer (Sarhou).

(1) Achalme : *Electrotonique en biologie*, Masson, Paris, 1913.

C'est à la catégorie des zymases ferriques qu'appartient la luciférase.

Si, après avoir, pendant longtemps, soumis à la dialyse dans un courant d'eau de la luciférase, en sol dans des solutions de sels neutres, pour en séparer ces derniers, on ajoute à ce sol purifié contenant la luciférase un peu d'acide sulfurique très dilué et du ferrocyanure de potassium, on obtient un précipité floconneux blanc teinté de bleu. Mais si l'on a chauffé préalablement ce mélange, de façon à détruire la luciférase, on obtient alors avec le ferrocyanure de potassium, une magnifique coloration bleue. Aucune trace d'un autre métal ne peut être mise en évidence.

On peut conclure avec certitude :

- 1° Que la luciférase est une zymase;
- 2° Que c'est une zymase oxydante;
- 3° Qu'elle constitue un passage des oxydases aux peroxydases et aux oxydones d'une part, et, d'autre part, à la substance vivante ou bioprotéon ;
- 4° Que c'est une oxyzymase ferrique.

III. — Caractères et propriétés de la luciférine.

La luciférine présente tous les caractères généraux des matières *protéiques* : il est bien inutile de les énumérer ici.

Quelle place doit-on lui assigner dans cette classe de composés organiques ?

La luciférine est totalement précipitée par le sulfate d'ammoniaque à saturation et par l'alcool à 82 degrés : elle est coagulée par la chaleur à 70 degrés. Elle n'est pas précipitée par le sulfate de magnésie ni par le chlorure de sodium à saturation. Elle ne précipite pas par l'acide acétique, sauf en présence de sels neutres. Elle ne précipite pas par l'acide carbonique en solutions neutres et ne se dissout pas dans la glycérine non diluée. La luciférine donne un trouble par l'ammoniaque par formation d'un alcali-albumine insoluble. Elle possède un pouvoir réducteur très accentué.

Elle traverse difficilement les filtres en porcelaine et dialyse lentement vers les solutions renfermant 3 à 5 % de chlorure de sodium.

Par ces dernières opérations, sa constitution est notablement

modifiée, comme il arrive pour d'autres matières protéiques (caséine, ovo-albumine, etc.).

Elle ne contient pas de phosphore.

Elle s'oxyde facilement en donnant de la lumière avec divers oxydants chimiquement définis et avec une zymase, la luciférase, ce qui constitue un caractère spécifique de premier ordre.

Son oxydation étant facilitée par les alcalis et en particulier par l'ammoniaque, il y a lieu de lui attribuer une fonction acide.

En résumé, *la luciférine est une albuminoïde naturelle à fonction acide ; c'est un corps réducteur labile, facilement oxydable. Son caractère spécifique est de donner de la lumière par oxydation à froid avec divers oxydants chimiques en même temps qu'avec une zymase : la luciférase. Elle est extraite des organismes photogènes où elle se rencontre exclusivement. Les résidus ultimes de son oxydation physiologique paraissent être de même ordre que ceux des autres albumines naturelles* (1).

(1) J'ai signalé depuis longtemps la présence de la leucine, de la guanine, de la tyrosine, de l'acide urique, etc., dans les organes lumineux des Insectes, dans les bouillons de culture liquides des Photobactéries, etc., et, dans ces dernières années, O. Emmerling, par l'hydrolyse, a retiré de la substance des Noctiluques de la lysine, de l'arginine, de l'histidine, de la tyrosine, du glyocolle, de l'alanine, de la leucine, de la proline et de l'asparagine. L'ensemble de ces substances a fourni 71 % d'azote. (O. Emmerling : « Hydrolyse der Meerseuchteninfusorien der Nordsee, *Noctiluca miliaris* », in *Biochemische Zeitsch.*, V, 18, 1909.)

Il est difficile, en opérant sur des matières aussi complexes que des organes lumineux ou des Infusoires phosphorescents, de déterminer, au juste, quels sont les produits ultimes d'oxydation de la seule luciférine. On ne peut y arriver qu'en agissant, ce à quoi je m'essaye, sur de la luciférine purifiée. J'ai déjà pu reconnaître que l'oxydation totale, définitive, ne se fait pas d'emblée, mais par étapes successives, pourrait-on dire. Ainsi, j'ai pu reconnaître dans un de ces stades la formation de cristaux prismatiques tronqués semblables à ceux que j'ai rencontrés dans la sécrétion photogène de l'*Orya barbarica* rapidement desséchée sur une lame de verre.

Dans mes expériences, ces cristaux se sont détruits par une oxydation plus avancée, en laissant à leur place des amas arrondis de fines granulations semblables à celles qui se rencontrent dans les organes lumineux des Insectes, dans les Noctiluques, etc., etc. En même temps que ceux-ci, j'ai vu également se former d'autres cristaux que l'on rencontre aussi dans le produit de sécrétion pathogène de l'*Orya barbarica*, dans le mucus lumineux de la Pholade après extinction, etc.

Malgré la formation de ces cristaux, je ne pense pas que la biooxylumi-

Conclusions. — Le phénomène de la lumière physiologique est, en dernière analyse, le résultat de l'oxydation d'une albumine naturelle : la luciférine, par une zymase oxydante bien caractérisée : la luciférase.

Tout ce qui détruit les albumines naturelles et les zymases supprime la photogénèse.

Ce curieux phénomène, dont l'étude constitue un des plus intéressants chapitres de la physiologie générale, est définitivement classé.

La lumière physiologique est : 1° une luminescence ; 2° une chimioluminescence ; 3° une oxyluminescence, 4° une zymoluminescence ;

Ou, si l'on veut bien admettre que les zymases sont encore quelque chose de vivant, une BIOZYMOMOXYLUMINESCENCE (1).

nescence puisse, en dernière analyse, être ramenée à un cas de biocristaloluminescence. Il me semble plus scientifique de se borner actuellement à ce qui permet de caractériser et de classer exactement dans l'ordre des phénomènes physico-chimiques la lumière physiologique.

(1) *Nota.* — A une certaine période de leur évolution, les granulations des cellules photogènes ont la forme vacuolaire et elles sont le siège de la réaction photogène, comme les granulations macrozymasiques vacuolaires de la glande à pourpre sont le siège de la réaction pigmentogène. Dans une récente publication (v. *La luce negli insetti luminosi e la simbiosi ereditaria*, Naples, 1914), Umberto Pierantoni a considéré, à tort, les vacuolides photogènes des Insectes comme étant des microorganismes symbiotiques. J'ai depuis longtemps reconnu l'inexactitude de cette interprétation, véritablement spécieuse en raison de la grande ressemblance des vacuolides photogènes, à une certaine période de leur évolution, avec des microorganismes ; mais les vacuolides photogènes ne sont pas autre chose que ce qu'on a appelé « mitochondrie » pour faire croire à une découverte nouvelle.

On peut en dire autant des vacuolides pigmentogènes de la glande à pourpre ou granulations macrozymasiques de purpurase.