

INSTITUT DE FRANCE.

ACADÉMIE DES SCIENCES.

(Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*,
t. 246, p. 1346-1351, séance du 3 mars 1958.)

MYCOLOGIE. — *Déterminisme de la formation des carpophores et des sclérotés dans la culture du Psilocybe mexicana Heim, Agaric hallucinogène du Mexique, et mise en évidence de la psilocybine et de la psilocine.* Note de MM. **ROGER HEIM, ARTHUR BRACK, HANS KOBEL, ALBERT HOFMANN** et **ROGER CAILLEUX.**

Dans le but de soumettre à une étude chimique les principes actifs des Champignons hallucinogènes, utilisés depuis la période précortésienne par certaines tribus d'Indiens du Mexique central à des fins divinatoires, et recueillis précédemment par V. P. et R. G. Wasson ⁽¹⁾ et par l'un de nous (R. H.) qui les a d'autre part caractérisés, décrits et nommés ⁽²⁾, nous devons tout d'abord nous procurer en quantité suffisante un matériel de base actif. Or ces Agarics ne croissent dans la nature que durant une période limitée, en quantité réduite et dans des habitats particuliers et peu accessibles. Cependant, la culture pure de six espèces différentes de ces champignons, cueillis par l'un de nous (R. H.) au cours d'une expédition au Mexique, faite en 1956 en compagnie de R. G. Wasson, a pu être réalisée aseptiquement à partir des spores et de la chair, d'abord sur maltéa gélosé, à 2 %, et elle a conduit à la mise au point d'une méthode semi-industrielle de culture sur composts naturels et stériles, mais en conditions septiques ⁽³⁾. Le *Psilocybe mexicana* Heim ayant donné les meilleurs résultats, c'est sur cette espèce qu'on a entrepris d'abord, par ce mode de culture à grande échelle, les essais visant à obtenir en notable quantité la matière de base à action hallucinogène, une expérience tentée par l'un de nous ⁽⁴⁾ ayant alors montré la persistance de cette propriété dans les carpophores cultivés.

Nous avons procédé par la suite de deux façons différentes : 1° par culture de carpophores sur milieux naturels, au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle, à Paris; 2° par culture *in vitro* sur milieux artificiels, en conditions aseptiques, produisant mycélium et sclérotés, au Laboratoire de Recherches de Chimie pharmaceutique Sandoz, à Bâle.

Obtention de carpophores de Psilocybe mexicana. — Le procédé de culture sur composts a été précédemment, mais succinctement décrit (³). Ajoutons que la paille de blé fermentée, utilisée, ayant atteint l'état où les fibres se séparent naturellement, puis lavée abondamment, est répartie dans les terrines au fond desquelles un drainage est ménagé au moyen de sable à bâtir. Après stérilisation, le compost estensemencé à partir de mycélium cultivé en tubes, puis placé à 24-27° durant deux semaines. Ensuite, il est revêtu d'une couche très mince de grains calcaires constituant une couverture poreuse et discontinue. Enfin, les terrines sont soumises à 21-22°, à la lumière solaire diffuse, à un bassinage journalier d'eau et à une faible aération. Les premières fructifications apparaissent au bout de 4 à 5 semaines après l'ensemencement. Le développement complet des carpophores exige 4 à 8 jours. Un mélange de débris de feuilles et tiges de maïs, ou encore de chaumes de graminées sauvages, a été également utilisé avec succès. Cette méthode a conduit à la mise en évidence de souches et de mutants différents, ayant acquis ainsi des caractères distincts stables : morphologiques, ontogéniques, micrographiques (vigueur, taille, profil du chapeau, couleurs, adhérence au support, vitesse et sens de maturation des lames, dimensions sporales) (⁴). Elle a permis d'atteindre un rendement moyen, par terrine, de 12,10 g (souche n° 1), 13,95 g (n° 13), 15,20 g (n° 14), ce qui correspond à 2 g environ de substance sèche. Nous avons pu établir, au cours d'expériences personnelles, que 32 exemplaires frais (18 g) (R. H.) ou 2,4 g de carpophores secs (A. H.), obtenus dans ces conditions, provoquent les mêmes effets hallucinogènes qu'une trentaine de champignons sauvages et vivants. Par cette méthode, 400 terrines ont été ensemencées à partir des souches n°s 1, 13 et 14 et ont produit 800 g de carpophores secs. Le revêtement des composts offrait, surtout avec la souche n° 14, la présence abondante de coussinets ouatés (*fig. 1*), rarement de masses sclérotiques de consistance ferme (*fig. 3*), parfois, avec les trois souches, de sclérotés vrais en profondeur (*fig. 2*). Ces sclérotés comportent un revêtement de filaments colorés, étroits mais irréguliers (de 1,5 à 4 μ de large), fréquemment bouclés et à membrane épaisse, et leur chair est constituée d'un entrelacs de grosses cellules allantoïdes, de 11-30 μ de large, renfermant de grandes vacuoles riches en précipitations de diverses tailles.

Culture in vitro du Psilocybe mexicana; production de sclérotés. — Cette culture sur milieux artificiels a révélé un comportement inattendu du champignon : sur milieu riche, il ne forme en effet sur le couvert mycélien aucun carpophore, mais seulement des sclérotés. Pour définir ce comportement de façon quantitative, on a ensemencé en série des milieux de culture à concentrations décroissantes par dilutions successives, à partir, soit du moût de bière d'une teneur initiale de 17 % en substance sèche, soit d'une solution d'extrait de malt à 17 % (maltéa Moser). On a pris comme facteur de dilution de la série géométrique de concentrations $\sqrt[3]{10}$ = environ 1,6. On a ajouté à chaque degré de concentration 1,5 % de gélose, réparti les milieux en tubes, stérilisé à 108° durant 25 mn et ensemencé avec du mycélium de *Ps. mexicana* (souche n° 13). L'incubation a été effectuée à la lumière du jour, à températures différentes. On a obtenu, à 20, 22 et 24°, les mêmes résultats (tableau I) à partir des deux

TABLEAU I.

Concentration en moût de bière ou extrait de malt (% de substance sèche).	Formes de croissance du <i>Psilocybe mexicana</i> (souche n° 13) après quatre semaines d'incubation.
17,0 } 11,0 }	Mycélium compact, abondant, de couleur grise; pas de sclérotés, pas de carpophores; parfois des arthrospores
7,0 } 4,5 } 2,7 }	Mycélium blanc avec <i>sclérotés</i> , maximum distinct à 4,5 %; pas de carpophores
1,7 } 1,1 }	Mycélium blanc; formation faible, décroissante de sclérotés; primordiums abondants et débuts de la formation de carpophores, incomplète cependant et sans sporulation
0,70 } 0,45 } 0,27 } 0,17 }	Mycélium blanc, toujours plus mince; disparition des sclérotés; <i>carpophores normaux</i> , avec ouverture du chapeau et sporulation, maximum distinct à 0,45 et 0,27 %

séries de cultures (moût de bière et maltéa).

Aux concentrations très élevées, il se constitue seulement une couverture compacte de mycélium, puis vient un domaine de concentrations où se forment les sclérotés; à une dilution plus poussée, ceux-ci disparaissent et l'on parvient ainsi aux concentrations où croissent les carpophores normaux, mûrs et sporulants. Dans le domaine intermédiaire, la formation de carpophores est incomplète : ils n'ouvrent pas leur chapeau ni ne forment de spores; le stipe est le plus souvent recourbé. Après peu de temps, ces carpophores deviennent bleus, s'atrophient et dépérissent. On savait déjà, par la culture sur compost, que la lumière du jour est

absolument indispensable pour l'apparition de carpophores. Les essais en tube sur malt conduisent à la même constatation. En effet, si une série, à concentrations étagées, est placée, non à la lumière du jour, mais à l'obscurité, il ne se forme pas de carpophores, même dans les milieux dilués, mais seulement des sclérotés. La planche II montre deux séries d'essais parallèles à concentrations de 17 à 0,17 %, après incubations respectives à la lumière du jour et à l'obscurité.

Il est remarquable de constater à quelles concentrations basses du milieu la fructification se produit encore. Si l'on maintient les cultures durant un temps très long, 6 à 12 semaines, on peut parfois observer encore la fructification à des teneurs jusqu'à 3 % alors que le milieu nutritif est déjà épuisé.

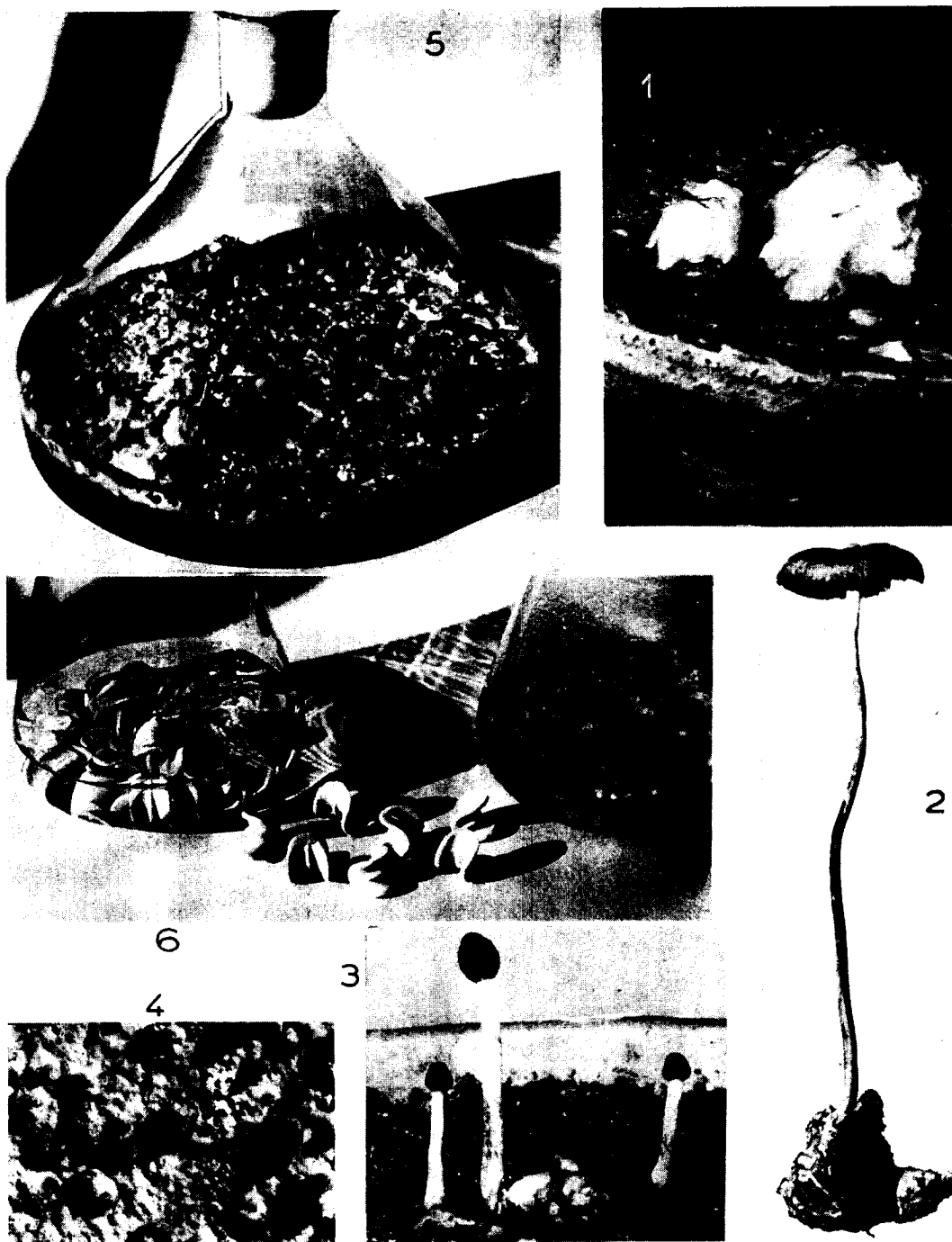
Ainsi, ces observations nouvelles permettent de réunir, par la formation de sclérotés, une quantité de matériel beaucoup plus grande qu'en visant à obtenir des carpophores. Elles montrent de plus que la production de sclérotés par incubation dans l'obscurité est nettement plus abondante qu'à la lumière du jour, aux mêmes conditions. Le tableau II indique les rendements en sclérotés séchés réalisés sur moût de bière gélosé, dans une série de concentrations (dix tubes inclinés à 12 ml), après une incubation de 76 jours dans l'obscurité à 24°.

TABLEAU II.

Concentration en moût de bière (% de substance sèche).	Rendement en sclérotés séchés (g).	Concentration en moût de bière (% de substance sèche).	Rendement en sclérotés séchés (g).
17.....	0	1,1.....	0,30
11.....	0,01	0,70.....	0,08
7,0.....	1,40	0,45.....	0,10
4,5.....	1,90	0,27.....	0,05
2,7.....	1,24	0,17.....	0,03
1,7.....	0,55		

Après ces résultats, la culture du champignon a été réalisée à grande échelle dans des ballons de Fernbach, avec des solutions d'extrait de malt ou de moût de bière, et aux conditions auxquelles il produit les sclérotés. Dans les solutions sans gélose, le champignon se dépose au fond de la culture et ne parvient que de façon irrégulière à former un revêtement. Nous avons appliqué une technique précédemment décrite (³), avec addition de 0,2 % de gélose, qui permet d'obtenir une croissance rapide sur revêtement mycélien continu. Il est nécessaire pour la formation des sclérotés d'ajouter un sel de fer en petite quantité; des essais ultérieurs ont indiqué que l'addition d'autres sels minéraux encore et de « cornsteep-liquor » est favorable au développement.

PLANCHE I.



Culture du *Psilocybe mericana* Heim.

Fig. 1. — Coussinets mycéliens apparus en surface sur compost pailleux ($\times 2/3$).

Fig. 2. — Un carpophore, obtenu sur compost pailleux, lié à un sclérote apparu en profondeur ($\times 2$).

Fig. 3. — Masse sclérotique en surface sur compost pailleux (gr. nat.).

Fig. 4 et 5. — Sclérotés obtenus en fioles de Fernbach sur solution de moût de bière à 4 % de matière sèche (fig. 4 : $\times 2/3$; fig. 5 : $\times 2/5$).

Fig. 6. — Utilisation de pièces de porcelaine selliformes permettant, par agitation rotatoire, la fragmentation du revêtement mycélien ($\times 1/2$).

PLANCHE II.

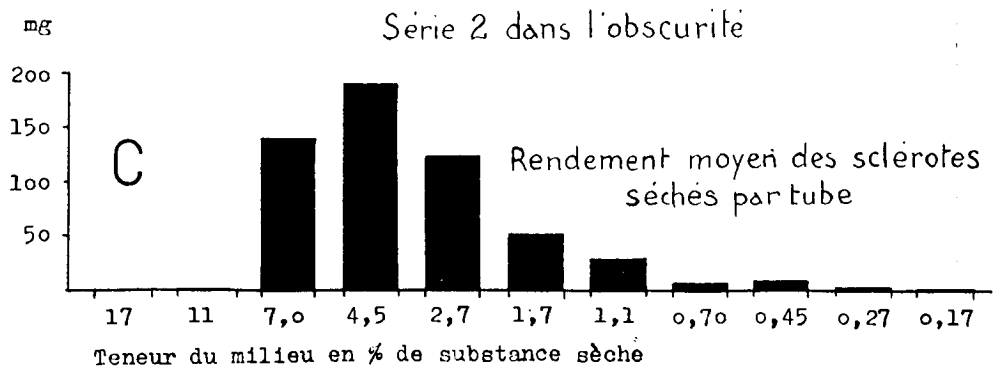
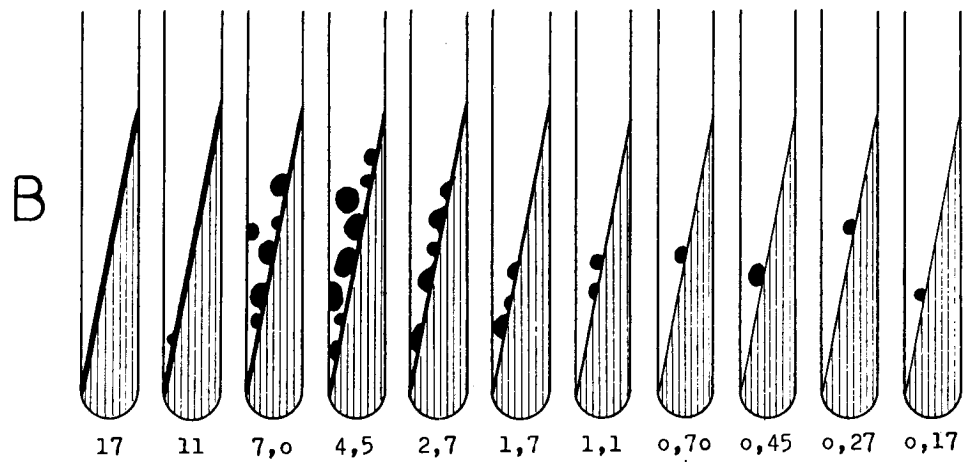
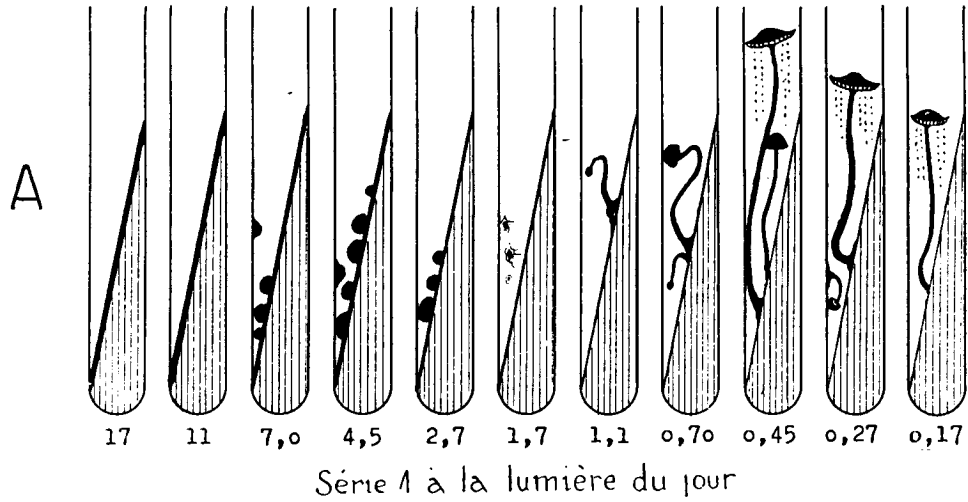


Fig. 7. — Schéma des formes de croissance caractéristiques que produit le *Psilocybe mexicana* (souche n° 13) dans une série de concentrations (11 tubes inclinés à gélose), après incubation de quatre semaines : à la lumière du jour (A) et à l'obscurité (B). L'épaisseur du trait oblique donne une mesure de l'épaisseur du mycélium. La rangée « lumière du jour » montre, à gauche le domaine des sclérotés, à droite celui des carpophores, avec leurs maximums respectifs, et, entre eux, celui propre seulement aux primordiums. La rangée « dans l'obscurité » montre qu'il se forme quelques sclérotés, au lieu de carpophores, avec un maximum faible à 0,45 %. Les rendements en sclérotés de la série « dans l'obscurité » sont portés graphiquement en C.

Pour ensemercer de grandes quantités de milieu de culture, on doit préparer une suspension mycélienne convenable du champignon, qui ne forme pas de conidies. Nous avons observé toutefois, mais irrégulièrement, à fortes concentrations, des arthrospores, donnant un aspect poudreux à la culture. La suspension destinée à l'ensemencement doit donc être préparée par fragmentation du revêtement mycélien que nous avons pu réaliser, par adjonction au milieu, en Erlenmeyer, de pièces de porcelaine selliformes (*fig. 6*), les procédés habituels ne permettant pas la division du couvert compact de mycélium. On stérilise le tout à l'autoclave. Après ensemencement et incubation, le mycélium superficiel, par les arêtes vives de ces pièces, peut être fragmenté par agitation de la culture, sans ouvrir les flacons, durant 30 à 60 mn avec une machine à mouvement rotatoire. Une suspension homogène de très fins flocons de mycélium est ainsi produite sans risque de contamination. Elle permet d'ensemencer de façon très uniforme de grandes quantités de milieu.

Des expériences personnelles (A. B.) ont démontré que les sclérotés du *Ps. mexicana* présentent également des qualités psychotropes. L'ingestion de 0,5g de sclérotés séchés a provoqué une action marquée, subsistant plusieurs heures; outre les effets psychiques déjà décrits, c'est une sensation prononcée de détente physique qui s'est surtout manifestée. Cet état est caractérisé, d'une part, par un picotement agréable sur tout le corps, en particulier les extrémités. Le corps entier se relâche, se détend, les extrémités deviennent lourdes comme du plomb. Au point de vue psychique, d'autre part, on éprouve une scission typique en deux sphères, intérieure et extérieure. L'état intérieur correspond à un mode d'existence dépourvu de problèmes; tout y est en harmonie, dans un état profond d'équilibre. Il est possible également de percevoir la sphère extérieure, de suivre en pensée les thèmes de conversation de personnes étrangères, mais ce résultat exige une tension de la volonté et ce domaine extérieur est considéré comme n'ayant aucune importance.

Exemple d'un essai de culture. — Pour préparer le milieu de culture, on dilue à l'eau ordinaire du moût de bière blonde non houblonné, de façon à obtenir une teneur de 4,5 % en substance sèche. On ajoute à chaque litre de solution :

	(g).		(g).
Gélose	2,0	ClK	0,031
(NO ₃) ₂ Ca	0,25	SO ₄ Fe.7H ₂ O....	0,00209
PO ₄ KH ₂	0,0625	SO ₄ Zn.7H ₂ O....	0,00086
SO ₄ Mg.....	0,0625		

On place le milieu de culture par portions de 500 ml dans des ballons de Fernbach à 1,6 l, on stérilise à l'autoclave à 108° durant 25 mn, et ense-

mence, après refroidissement, avec une suspension de *Ps. mexicana*, préparée comme ci-dessus; 80 ml de milieu permettent ainsi d'ensemencer 50 ballons de Fernbach. Sur les cultures, mises à incuber dans l'obscurité, à 24°, apparaissent à la surface, après 4 jours, de nombreuses colonies blanches; après 7 jours, la couverture de mycélium se ferme. Il se forme sur celle-ci, après 14 jours, des sclérotés jaunâtres ou bruns (*fig. 4* et *5*), dont le diamètre atteint en général 1 cm, voire notablement plus. On sépare le mycélium et les sclérotés après six semaines par filtration sur une gaze, on presse et sèche à l'étuve à 35°. Nous avons obtenu 924 g de sclérotés et de mycélium séchés à partir d'un essai effectué avec 55 l de milieu de culture, ce qui correspond à un rendement de 16,6 g/l.

Résultats. — Nous avons pu préparer par ces deux méthodes une quantité de matière de base suffisante pour permettre l'extraction du principe actif. Rappelons que nous sommes parvenus à l'isoler par la suite, tant des carpophores que des sclérotés et du mycélium, sous forme de deux substances. L'une d'elles, qui renferme la presque totalité du pouvoir d'action psychotrope, est une substance cristallisée que nous avons dénommée *Psilocybine*. L'autre, que nous avons réussi à isoler seulement en très petite quantité, a été nommée *Psilocine*.

La *Psilocybine*, caractérisée par les spectres ultraviolet et infrarouge, par une réaction de Keller de couleur violette et par sa teneur en phosphore, donne, après ingestion, la même action psychotrope que les champignons eux-mêmes. La *Psilocine*, substance apparentée à la *Psilocybine*, s'en distingue par son spectre ultraviolet et par sa réaction de Keller de couleur bleu pur. La description de la méthode d'isolement et des propriétés chimiques de ces substances est publiée d'autre part ⁽⁶⁾.

(¹) V. P. et R. G. WASSON, *Mushrooms, Russia and History*, 2 vol., New-York, 1957.

(²) R. HEIM, *Comptes rendus*, 242, 1956, p. 965; 242, 1956, p. 1389; 244, 1957, p. 695; *Rev. Mycol.*, 22, 1957, p. 58, 183 et 300.

(³) R. HEIM, *Comptes rendus*, 242, 1956, p. 965; 245, 1957, p. 1761; R. HEIM et R. CAILLEUX, *Comptes rendus*, 244, 1957, p. 3109.

(⁴) R. HEIM, *Comptes rendus*, 245, 1957, p. 597.

(⁵) A. STOLL, A. BRACK et J. RENZ, *Schweiz. Z. Path. u. Bakt.*, 14, 1951, p. 230.

(⁶) A. HOFMANN, R. HEIM, A. BRACK et H. KOBEL, *Experientia*, 14, fasc. 3, mars 1958.