

CHAPITRE VII

PSILOCYBINE ET PSILOCINE

I

DÉTERMINISME DE LA FORMATION DES CARPOPHORES, ET ÉVENTUELLEMENT DES SCLÉROTES, DANS LES CULTURES DES AGARICS HALLUCINOGENES DU MEXIQUE ET MISE EN ÉVIDENCE DE LA PSILOCYBINE ET DE LA PSILOCINE

par ROGER HEIM, ARTHUR BRACK, HANS KOBEL, ALBERT HOFMANN
et ROGER CAILLEUX

(Pl. XXVIII, fig. 1-4, 6, 7; XXIX, fig. 7, 8; XXXVI)

Afin de soumettre à une étude chimique les principes actifs des champignons hallucinogènes du Mexique méridional 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, on sait que 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 qu'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) (v. p. 224). Le *Psilocybe mexicana*

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

(2) R. HEIM, *Comptes rendus Acad. Sc.*, **242**, p. 965, 1956; **242**, p. 1389, 1956; **244**, p. 695, 1957; *Rev. d. Mycol.*, **22**, p. 58, 183 et 300, 1957; **23**, p. 119, 1958; R. HEIM et R. CAILLEUX, *Rev. d. Mycol.*, **23**, p. 352, 1958.

(3) R. HEIM, *Comptes rendus Acad. Sc.*, **242**, p. 965, 1956; **245**, p. 176, 1957; R. HEIM et R. CAILLEUX, *Comptes rendus Acad. Sc.*, **244**, p. 3109, 1957.

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 (1) 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 décrit précédemment et succinctement [v. (3), p. 247], puis avec quelques précisions (2), enfin, dans le présent ouvrage, avec des compléments nés de nouveaux essais poursuivis durant l'année 1958 (v. p. 224).

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 $\sqrt[5]{10} =$ 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 minutes 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 séries de cultures (moût de bière et maltéa).

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 4 semaines d'incubation à la lumière du jour
17,0	Mycélium compact, abondant, de couleur grise; pas de sclérotés, pas de carpophores; parfois des arthrospores.
11,0	
7,0	Mycélium blanc avec <i>sclérotés</i> , maximum distinct à 4,5 %; pas de carpophores.
4,5	
2,7	
1,7	Mycélium blanc; formation faible, décroissante de sclérotés; primordiums abondants et début de la formation de carpophores, incomplète cependant et sans sporulation.
1,1	
0,70	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 %.
0,45	
0,27	
0,17	

(1) R. HEIM, *Comptes rendus Acad. Sc.*, 245, p. 597, 1957.

(2) R. HEIM, A. BRACK, H. KOBEL, A. HOFMANN et R. CAILLEUX, *Comptes rendus Ac. Sc.*, 246, p. 1346, 1958.

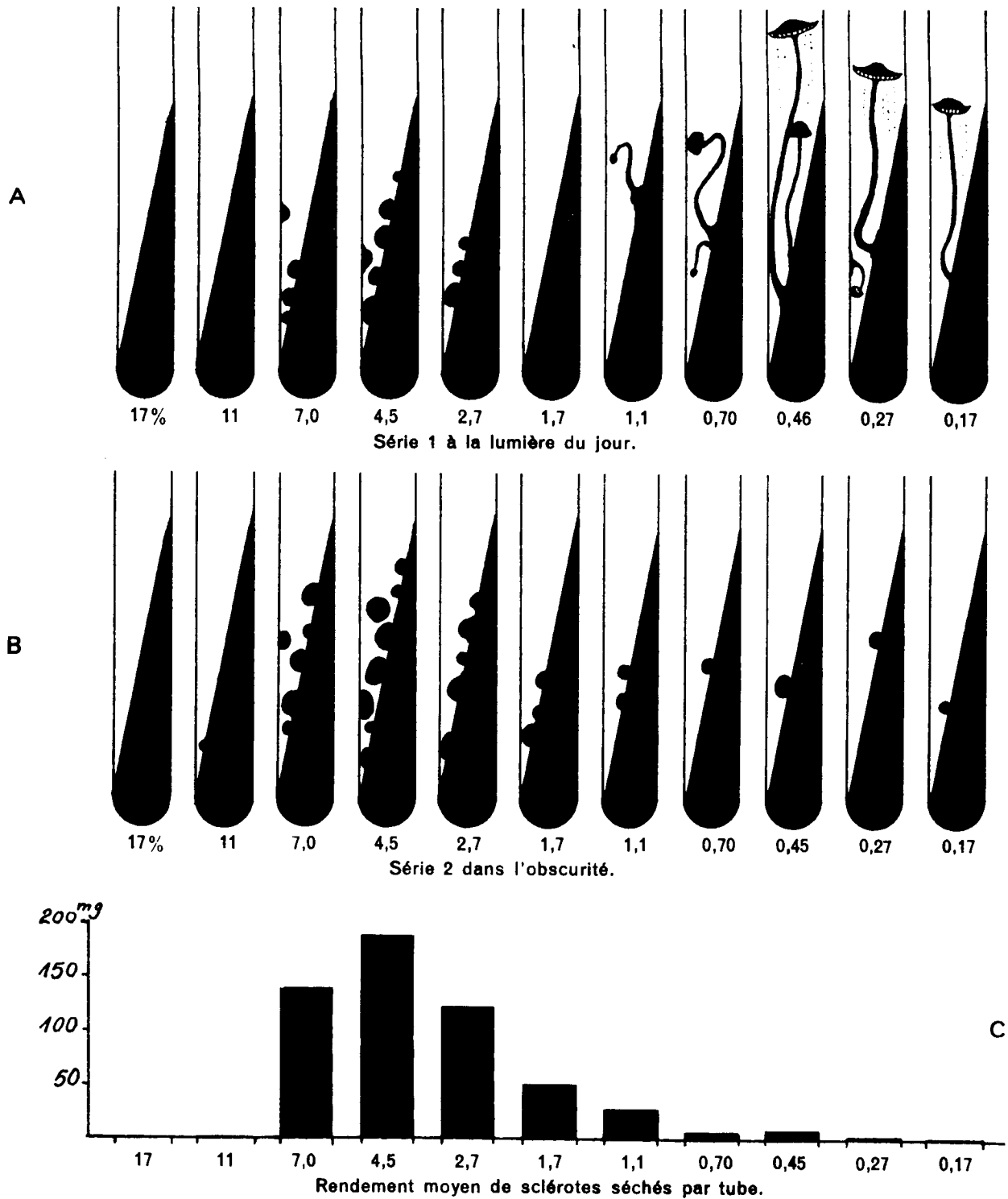


Fig. 66. — Schéma des formes de croissance caractéristiques que produit le *Psilocybe mexicana* (souche n° 13) dans une série de concentrations (11 tubes inclinés à géluse), après incubation de quatre semaines : à la lumière du jour (A) et à l'obscurité (B). L'épaisseur du trait oblique donne une mesure 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 pondéraux en sclérotés de la série « dans l'obscurité » sont portés graphiquement sur la figure du bas C. Teneur du milieu en % de substance sèche de 17 à 0,17 %.

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 fructifications deviennent bleues, 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 figure 66, A, B, C, p. 249, 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.

Nous avons obtenu des résultats semblables avec deux autres souches de *Psilocybe mexicana*, nos 1 et 14. Comme pour la souche n° 13, le maximum de fructifications apparaît pour un pourcentage des milieux nutritifs allant de 0,45 à 0,27 du poids de la substance sèche. A des concentrations plus fortes, ces deux souches forment également des sclérotés et non des fructifications. Mais, par opposition à la souche n° 13, le nombre et le poids maximum de sclérotés se montrent à des concentrations plus élevées (exemple souche n° 14 : tableau II et photos Pl. XXXVI, séries fig. 1 et 2).

TABLEAU II.

Concentration en moût de bière (% de substance sèche)	Formes de croissance du <i>Psilocybe mexicana</i> (souche n° 14) après 5 semaines d'incubation à la lumière du jour
17,0 } 11,0 } 7,0 }	Mycélium blanc avec <i>sclérotés</i> jaunes-bruns; maximum distinct à 11 %; pas de carpophores.
4,5 } 2,7 }	Mycélium brun, presque pas de <i>sclérotés</i> ; pas de carpophores.
1,7 } 1,1 }	Mycélium blanc, partiellement brun; disparition des <i>sclérotés</i> ; début de la formation de carpophores, encore incomplète et sans sporulation.
0,70 } 0,45 } 0,27 } 0,17 } 0,11 }	Mycélium blanc, toujours plus mince; pas de <i>sclérotés</i> ; <i>carpophores normaux</i> , avec ouverture du chapeau et sporulation, maximum distinct à 0,45 % et 0,27 %.

Après incubation dans l'obscurité, les fructifications des souches nos 1 et 14 manquent complètement (photos Pl. XXXVI, série 2).

Un comportement bien différent est apparu chez le *Stropharia cubensis* EARLE (souche n° 27) qui ne produit pas de sclérotés. Pour la fructification, ce champignon a besoin d'un milieu nutritif quatre fois plus riche que le *Psilocybe mexicana* (tableau III).

TABLEAU III.

Concentration en moût de bière (% de substance sèche)	Formes de croissance du <i>Stropharia cubensis</i> (souche n° 27) après 7 semaines d'incubation à la lumière du jour
17,0 } 11,0 }	Mycélium blanc ondulé; pas de carpophores; pas de sclérotés.
7,0 } 4,5 }	Mycélium blanc ondulé; primordiums et début de la formation de carpophores, incomplète et sans sporulation; pas de sclérotés.
2,7 } 1,7 } 1,1 } 0,70 }	Mycélium blanc; <i>carpophores normaux</i> , avec ouverture du chapeau et sporulation, maximum distinct à 1,7 et 1,1 %.
0,45 } 0,27 } 0,17 } 0,11 }	Mycélium blanc, toujours plus mince; formation de carpophores, mais de plus en plus faible et incomplète.

Après l'incubation dans l'obscurité, la souche n° 27 montre sporadiquement de très petits carpophores qui n'ouvrent pas leur chapeau.

Contrairement au *Psilocybe mexicana*, le Strophaire ne forme donc pas de sclérotés, même aux concentrations les plus élevées, mais seulement un mycélium blanc très ondulé, soit à la lumière du jour, soit dans l'obscurité. Si on prolonge l'incubation durant plus de 10 semaines, on peut constater quelques épaisissements mycéliens, à des concentrations de 17 à 1,1 %, mais ces formations ne sauraient être assimilées à des masses sclérotiques.

Ainsi, les cultures de *Ps. mexicana* 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 IV indique les rendements en sclérotés séchés réalisés sur moût de bière gélosé, dans une série de concentrations (onze tubes inclinés à 12 ml), après une incubation de 76 jours dans l'obscurité à 24° (souche n° 13), (fig. 66 C).

TABLEAU IV.

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 (1), 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.

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 (Pl. XXVIII, fig. 3), 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, grâce aux arêtes vives de ces pièces, peut être fragmenté par agitation de la culture, sans ouvrir les flacons, durant 30 à 60 minutes 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.) (R. H.) ont démontré que les sclérotés du *Ps. mexicana* présentent également des qualités psychotropes. L'ingestion de 0,5 g de sclérotés séchés a provoqué une action marquée, subsistant plusieurs heures. (Voir rapport détaillé de A. BRACK, p. 280, et observation de R. HEIM, p. 316.)

QUELQUES EXEMPLES D'ESSAIS DE CULTURE

Essais de culture avec Psilocybe mexicana

PREMIER EXEMPLE.

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·7 H ₂ O	0,00209
PO ₄ KH ₂	0,0625	SO ₄ Zn·7 H 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 minutes, et ensemence, après refroidissement, avec une suspension de *Ps. mexicana*, préparée comme ci-dessus; 80 ml de milieu

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

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, dont le diamètre atteint en général 1 cm, voire notablement plus. On sépare le mycélium et les sclérotés (Pl. XXXVI, fig. 3 et 5) après 6 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 (souches n^{os} 1 et 14).

DEUXIÈME EXEMPLE.

Moût de bière non houblonné, dilué à une teneur de 4,5% en substance sèche. On ajoute à chaque litre de cette solution :

	(g)
Gélose	2,0
« Cornsteep-liquor »	10,0
(substance solide)	
(OH) ₂ Ca	0,2
PO ₄ K ₂ H	0,2
OHNH ₄ (25 %)	1,0
SO ₄ Fe·7 H ₂ O	0,00417
SO ₄ Zn·7 H ₂ O	0,00172

On place ce milieu de culture par portions d'un litre dans des boîtes à pénicilline (boîtes de Roux), on stérilise à l'autoclave durant 45 minutes à une température de 110°, et ensemence, après refroidissement, avec une suspension de *Ps. mexicana*, souche n^o 13 (2 cm³ pour chaque boîte).

Après une incubation de 50 jours dans l'obscurité à 24°, nous avons obtenu, par centrifugation, à partir de 98 cultures 8,8 kg de mycélium avec sclérotés (Pl. XXXVI, fig. 4). Après dessiccation nous avons retiré 2,35 kg de sclérotés et mycélium séchés, ce qui correspond à un rendement de 24 g/l de milieu nutritif. Le contenu en principes actifs correspond à

0,3 % de Psilocybine
0,01 % de Psilocine.

TROISIÈME EXEMPLE.

Nous avons préparé un milieu nutritif à base d'extrait de malt, comme suit :

	(g)
Gélose	2,0
Maltéa Moser	10,0
Glucose	40,0
« Cornsteep-liquor »	10,0
(substance solide)	
(NO ₃) ₂ Ca	0,5
OHNH ₄ (25 %)	1,5
SO ₄ Fe·7 H ₂ O	0,00416
SO ₄ Zn·7 H ₂ O	0,00172
ajouté 1 litre d'eau ordinaire	

Ce milieu a donné, après stérilisation et ensemencement avec la souche n^o 13 de *Ps. mexicana*, les résultats suivants : 3,8 kg de mycélium et sclérotés frais, qui ont laissé, après séchage, 930 g de matériel sec à partir de 48,5 l de milieu de culture, c'est-à-dire un rendement de 19,2 g/l. Teneur : 0,3 % de Psilocybine. Pas de Psilocine.

QUATRIÈME EXEMPLE.

Essai de culture avec Psilocybe semperviva.

Moût de bière blonde non houblonné, dilué à une teneur de 4,5 % en substance sèche. On ajoute à chaque litre de cette solution :

	(g)
Gélose	2,0
« Cornsteep-liquor »	10,0
(substance solide)	
(NO ₃) ₂ Ca	0,2
PO ₄ K ₂ H	0,2
OHNH ₄ (25 %) .	1,0
SO ₄ Fe · 7 H ₂ O	0,00208
SO ₄ Zn · 7 H ₂ O	0,00086

Après stérilisation à 110° durant 45 minutes, ce milieu, distribué par portions de 1 litre dans des boîtes à pénicilline, futensemencé avec une suspension de *Ps. semperviva*. Ce Psilocybe donne, à l'incubation à 24° dans l'obscurité, une forme de croissance tout à fait différente de celle des diverses souches de *Ps. mexicana*. Elle ne constitue aucun sclérote, mais une couverture de mycélium blanc, très compacte et dure, d'une épaisseur de 2 à 4 mm (Pl. XXXVI, fig. 6). La récolte, après 7 semaines, a donné, à partir de 98 litres de culture, 6,86 kg de mycélium frais, soit 2,17 kg de matériel sec, ce qui correspond à un rendement de 22,2 g/l.

La teneur de ce mycélium en substances actives est :

0,4 % de Psilocybine
0,03 % de Psilocine.

Lorsque l'obscurité de la chambre-étuve n'était pas strictement observée, le champignon formait sur la couche mycélienne quelques fructifications, ce qui a permis de récolter, à côté du mycélium, 9 g de carpophores séchés. Ces carpophores ont livré en Psilocybine un taux de 0,75 %, qui est de beaucoup le plus élevé qui ait été jamais observé. Ils ne contenaient pas, par contre, de Psilocine.

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 a été publiée d'autre part (1) (2). (V. également ici p. 355, 358.)

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

(2) R. HEIM et A. HOFMANN, *Comptes rendus Acad. Sc.*, 247, p. 557, 1958.