



TRAVAUX MYCOLOGIQUES

dédiés à

R. KÜHNER

Numéro spécial du Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon
43^e année ————— Février 1974

RECHERCHE D'UNE ACTIVITÉ MUSCARINIQUE DANS LES CARPOPHORES ET LE MYCÉLIUM DE QUELQUES CLITOCYBES

par Monique PORTE et L. ODDOUX

Résumé. — 8 espèces de *Clitocybe* non considérées jusqu'à ce jour comme vénéneuses, sont douées d'une activité muscarinique.

Cette activité est antagonisée par le sulfate d'atropine : l'action est donc bien semblable à celle d'un parasympathomimétique.

La toxicité de ces 8 espèces n'est due ni à l'acétylcholine, ni à l'histamine.

La présence d'une substance à activité muscarinique dans les carpophores, les mycéliums en culture pure et les liquides de culture de ces 8 espèces, est démontrée pour la première fois.

La muscarine, sel triméthyl-ammonium quaternaire du L (+) 2 méthyl - 3 hydroxy - 5 (aminométhyl) - tétrahydrofurane doit son nom à *Amanita muscaria* (L. ex Fr.) Hooker d'où elle a été isolée pour la première fois par SCHMIEDEBERG et KOPPE en 1869 ; le nom spécifique « muscaria » est dû au premier usage de ce champignon : cuit avec de l'eau, il avait la propriété de tuer les mouches.

La muscarine a été mise en évidence dans un petit nombre d'espèces, tels que des *Inocybes* et également dans des *Clitocybes* parmi lesquels nous citerons *C. dealbata* (Sow. ex. Fr.) Gillet, *C. rivulosa* (Pers. ex Fr.) Kummer, *C. illudens* (Schwein.) Sacc., *C. cerussata* (Fr.) Kummer (BURTON, KELLER et SCHWARTING, 1965 ; GENEST, HUGHES et RICE, 1968 ; SWENBERG, 1969).

MATÉRIEL.

Nos recherches ont porté sur 67 souches de *Clitocybe* ; 47 (représentant 21 espèces) sont inactives (PORTE, 1972) ; 20 (appartenant à 8 espèces) sont douées d'une activité muscarinique. Ce sont elles seules qui feront l'objet de cette note.

Nous présentons ci-dessous les noms des espèces actives :

<i>Clitocybe angustissima</i> (Lasch) Kummer	(1 souche)
<i>Clitocybe suaveolens</i> (Schum. ex Fr.) Kummer	(4 souches)
<i>Clitocybe diatreta</i> (Fr.) Kummer	(6 souches)
<i>Clitocybe festiva</i> Favre	(3 souches)
<i>Clitocybe ericetorum</i> (Bull.) Qué. ss. Lange	(1 souche)
<i>Clitocybe candicans</i> (Pers. ex Fr.) Kummer	(3 souches)
<i>Clitocybe candicans</i> var. <i>dryadicola</i> (Favre) Lamoure	(6 souches)
<i>Clitocybe pithyophila</i> (Secr.) Gill.	(5 souches)

Le lecteur trouvera l'origine de ces souches dans notre récente publication (PORTE, 1972).

II. RECHERCHE D'UNE ACTIVITÉ MUSCARINIQUE CHEZ LES CARPOPHORES.

1. *Technique d'extraction.*

Ne disposant pour chaque échantillon que d'une faible quantité d'exsiccata de carpophores, nous les avons simplement broyés en présence d'eau acétique à 0,5 %. L'extrait obtenu (non filtré) est testé sur le duodénum isolé de rat.

2. *Technique d'étude biologique.*

Pendant longtemps, l'activité muscarinique fut mise en évidence uniquement par des méthodes biologiques, sans doute en raison de la difficulté à obtenir des préparations suffisamment purifiées pour entreprendre une étude chimique.

Les auteurs ont travaillé soit sur des organes isolés tels que l'iléon de cobaye, le duodénum de rat, de lapin ou de cobaye (recherche d'une contraction), soit sur des animaux entiers (lacrymation, salivation, diarrhée, diminution du rythme cardiaque, bronchospasme).

Dans notre travail, nous avons choisi l'étude de la contraction du duodénum isolé de rat.

2-1. *Animaux.*

Pour nos essais biologiques, nous avons utilisé le rat mâle (souche Wistar¹) de 200 à 280 grammes; ces animaux ont été laissés au repos au moins 72 heures avant toute manipulation.

1. Ces animaux sont fournis par le centre d'élevage IFFA-CREDO, Domaine des Oncins à Saint-Germain-sur-l'Arbresle (Rhône).

2-2. Techniques.

— Prélèvement du duodénum isolé de rat.

L'animal non à jeun est tué d'un coup sur la nuque, puis placé en decubitus dorsal. Une incision médiane est pratiquée dans les parois abdominale puis thoracique et le duodénum est rapidement prélevé et immergé dans du liquide de TYRODE à $38^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$.

— Etude des effets cholinergiques ou anticholinergiques sur organe isolé.

La partie post-pylorique du duodénum de rat est dégagée sur une longueur de trois centimètres environ de la membrane mésentérique et montée rapidement dans la cellule d'un bac à organe isolé selon la technique décrite par MAGNUS (1904).

Les paramètres choisis sont les suivants :

- . milieu de survie constitué par le liquide de TYRODE ² ;
- . température de $38^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$;
- . aération et agitation du milieu par l'air admis bulle à bulle ;
- . solutions et dilutions toujours effectuées dans le liquide de TYRODE ;
- . mouvements normaux de survie : contractions rythmiques et périodiques en train d'onde, en « bouffée », caractéristiques du duodénum de rat.

Nous vérifions la sensibilité de l'organe isolé en utilisant des doses d'acétylcholine comprises entre $0,01 \mu\text{g}$ et $1 \mu\text{g}$.

Nous affirmons qu'un champignon est actif lorsqu'il induit une contraction de la fibre duodénale ; nous effectuons toujours 2 à 3 mesures pour chaque dose de liquide testée.

Nous avons évalué d'une façon très simple, donc obligatoirement imparfaite, la quantité de substances à activité muscarinique présentes dans les Clitocybes étudiés, sinon il nous aurait fallu comme témoin une quantité relativement importante de muscarine ; or il est impossible de se procurer cet alcaloïde dans le commerce.

A défaut de témoin de muscarine, nous avons donc évalué l'activité des carpophores par comparaison avec l'action d'un parasymphatomimétique de référence : le chlorure d'acétylcholine, en nous basant sur les travaux de WASER (1961, 1965) ; cet auteur affirme que la muscarine est deux fois plus active sur le duodénum isolé de rat que l'acétylcholine.

2. D'après DOMER F. R., 1971. — Animal experiments in Pharmacological Analysis, Charles C. Thomas Publishers, p. 573.

Nous prouvons que les principes actifs de ces champignons sont bien doués d'un pouvoir sympathomimétique puisque antagonisés par du sulfate d'atropine.

Nous mettons également en évidence que l'activité de ces *Clitocybes* n'est due :

— ni à l'acétylcholine : pour cela nous stérilisons nos extraits de champignons en les portant à l'autoclave à 120° pendant vingt minutes : les liquides refroidis sont à nouveau testés et aucun changement dans l'intensité d'action n'est observé. L'activité des *Clitocybes* étudiés n'est donc pas due à l'acétylcholine, substance réputée pour être thermolabile.

— ni à l'histamine : nous administrons une dose assez forte (soit 50 µg) de méthane sulfonate d'antazoline¹, puis trente secondes après, nous injectons une dose connue d'extrait à tester ; la réponse est identique à celle obtenue avec le produit seul.

III. RECHERCHE D'UNE ACTIVITÉ MUSCARINIQUE CHEZ LES CULTURES MYCÉLIENNES EN MILIEU LIQUIDE.

1-1. *Techniques de culture.*

Les souches conservées à + 4° C en chambre froide sur milieu nutritif gélosé sont en état de vie ralentie, et il est donc indispensable de les réactiver avant leur culture en ballons, par repiquage en milieu « L » liquide (ODDOUX, 1955 ; PORTE, 1972) et culture en salle conditionnée à l'obscurité, à température constante : 24° C et à degré hygrométrique permanent : 70 %.

Le mycélium se développe assez rapidement : au bout de quinze à vingt jours, il est en pleine croissance et peut ainsi servir à « semer » un ballon contenant 3 litres de milieu « L » liquide.

La culture en milieu « aéré » (ODDOUX, 1960).

La culture de nos *Clitocybes* en milieu liquide, a été conduite selon la technique mise au point par ODDOUX.

Trois litres de milieu « L » sont répartis dans des ballons de six litres à fond plat, soigneusement lavés et rincés.

Les ballons sont obturés par des bouchons en versilic, percés de deux trous laissant le passage à deux tubulures en verre : l'une courte s'arrêtant à quelques centimètres en-dessous du niveau inférieur du bouchon, l'autre suffisamment longue pour atteindre un niveau situé à deux centimètres

1. ANTISTINE (Ciba), nom déposé.

environ du fond du ballon. L'ensemble est alors stérilisé à l'autoclave à 115° pendant vingt minutes. Après complet refroidissement, dans une salle stérile soumise au rayonnement de lampes bactéricides, le milieu « L » de ces ballons est « ensemencé » aseptiquement avec un mycélium en croissance active, après broyage dans un homogénéiseur M. S. E. préalablement stérilisé.

Les bouchons sont alors fixés au col des ballons, à l'aide d'un fil métallique.

Les ballons sont placés ensuite en chambre obscure à 24° C et 70 % d'humidité. L'agitation et l'aération du milieu sont assurées par passage d'un courant d'air stérile fourni par un compresseur.

L'air pulsé est stérilisé par passage dans des allonges en verre bourrées de coton cardé, l'ensemble étant stérilisé au four PASTEUR à 180° C pendant une heure.

Afin de compenser l'évaporation qui se produirait dans le milieu de culture, nous plaçons entre l'allonge et ce ballon, un flacon laveur rempli aux trois quarts d'eau distillée stérile, dans laquelle passe le courant d'air.

Le mycélium est cultivé pendant une durée de quatre à cinq semaines.

1-2. *Technique d'extraction des substances à activité muscarinique.*

De très nombreuses techniques d'extraction ont été essayées par divers auteurs ; nous avons choisi celle de SWENBERG (1969) adaptée à la recherche de cet alcaloïde dans les cultures de mycéliums.

Les cultures sont effectuées pendant un temps variant de 28 à 33 jours, durée qui semble correspondre au rendement maximum en mycélium. Elles sont filtrées ; les poids de mycélium frais et les volumes de liquide de culture varient selon l'espèce étudiée.

1-2-1. *Technique de SWENBERG.*

Le principe de l'extraction des substances à activité muscarinique est le suivant : les principes actifs sont déplacés à l'aide d'eau acétique : l'extrait obtenu est ensuite dessalé par l'alcool absolu puis débarrassé de la majeure partie de ses substances liposolubles et colorantes par le n-butanol.

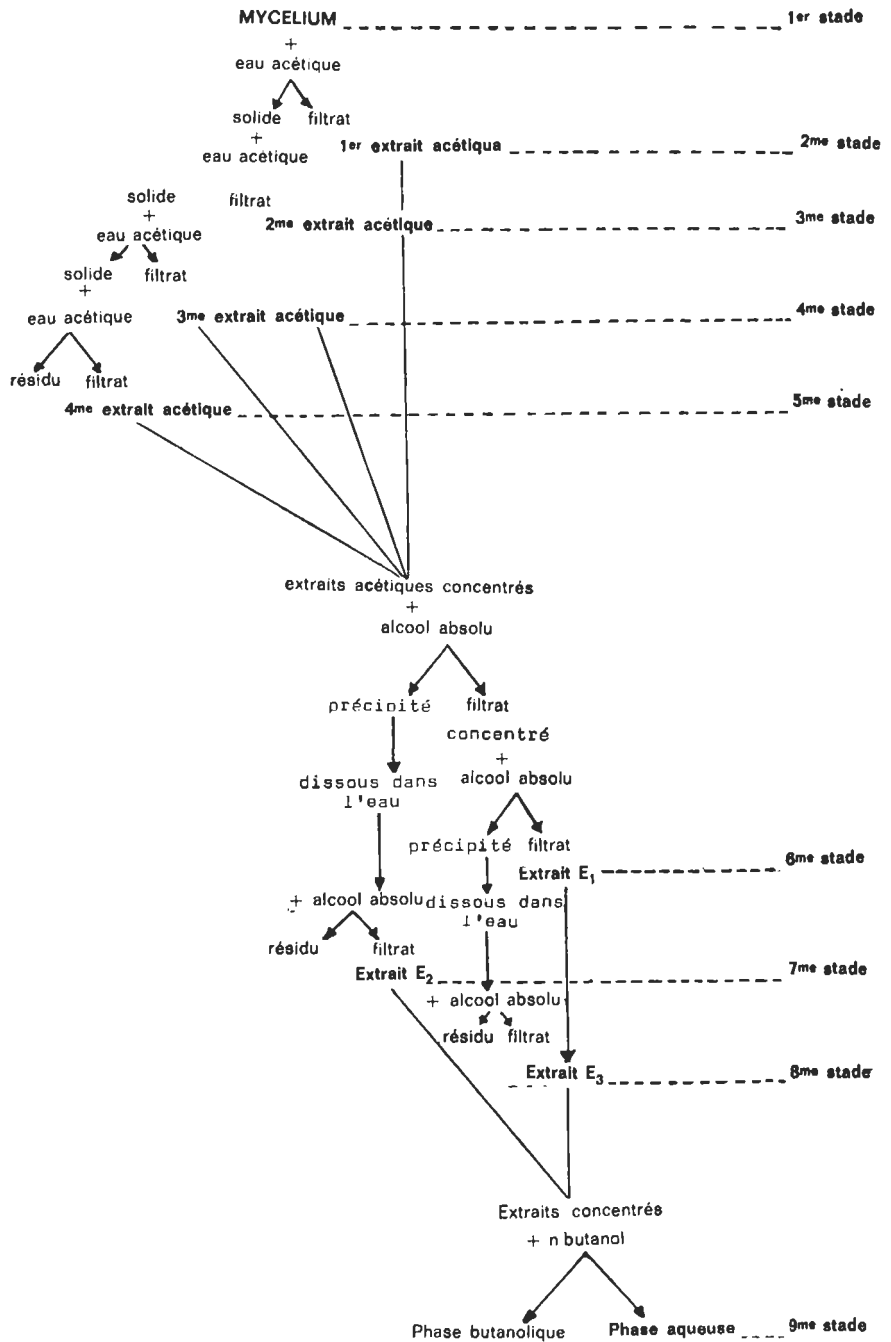
Le mycélium et le liquide de culture sont traités séparément.

— Le mycélium.

Il est séparé par filtration, essoré et abondamment lavé à l'eau distillée. Il est broyé ensuite dans un homogénéiseur avec quatre fois son poids d'eau acétique à 0,5 % ; après centrifugation, le culot est repris avec la même quantité d'eau acétique ; l'opération est répétée deux fois, mais avec deux parties d'eau acétique seulement.

Les extraits acétiques obtenus sont réunis et réduits à la moitié du poids du mycélium initial dans un appareil « Cyclone » qui permet de les concentrer, sous vide, à une température ne dépassant pas 30° C.

EXTRACTION ET PREMIERS STADES DE LA PURIFICATION



Le concentré acétique ainsi obtenu est traité une première fois par six volumes d'alcool absolu puis filtré et concentré, sous vide, à une température inférieure à 30° C. Après addition de dix volumes d'alcool absolu, nouvelle filtration et distillation sous vide; on obtient ainsi un extrait aqueux: E_1 .

Il se forme au cours du premier traitement par l'alcool des «peaux» qui sont dissoutes dans un peu d'eau distillée tiédie; après addition d'alcool absolu et concentration, l'extrait ainsi obtenu (E_2) est réuni à E_1 .

Les extraits ($E_1 + E_2$) sont traités par un égal volume de n-butanol; l'opération est répétée deux fois.

La phase aqueuse de pH acide est alcalinisée immédiatement à pH = 8, car la muscarine en solution concentrée est instable en milieu acide; cette phase aqueuse sera utilisée pour la recherche d'une activité muscarinique sur le duodéum isolé de rat.

— Le liquide de culture.

Il est tout d'abord concentré puis acidifié avec 0,5 % d'acide acétique. L'extrait acétique est traité une première fois par six volumes d'alcool absolu puis, après filtration, concentré. Après addition de dix volumes d'alcool absolu, il est de nouveau filtré, puis concentré sous vide.

L'extrait aqueux ainsi obtenu est traité, comme dans le cas du mycélium, par un égal volume de n-butanol; l'opération est répétée deux fois.

La phase aqueuse est concentrée et alcalinisée à pH = 8, puis soumise à une étude biologique.

Cette technique s'étant avérée trop longue pour un simple screening, nous ne l'avons pas appliquée à toutes les souches.

Pour les autres espèces nous nous sommes contentés de concentrer la totalité des cultures selon la technique suivante.

1-2-2. Concentration du mycélium et du liquide de culture.

Le mycélium est broyé dans le liquide de culture, acidifié avec 0,5 % d'acide acétique; le mélange est homogénéisé par agitation puis filtré. Le liquide ainsi obtenu est concentré et alcalinisé; il sera ensuite étudié sur le duodéum isolé de rat.

1-3. Technique d'étude biologique.

Les phases aqueuses des extraits mycéliens et du liquide de culture sont testées sur le duodéum isolé de rat.

Nous affirmons qu'elles sont actives lorsqu'elles induisent une contraction de la fibre duodénale; nous effectuons toujours deux à trois mesures pour chaque dose de liquide testée.

Dans le cas des cultures, nous avons voulu simplement savoir si les Clitocybes étudiés possédaient une activité muscarinique; nous n'avons pas cherché à évaluer la quantité de substances actives présentes.

IV. RÉSULTATS.

Ils sont résumés dans le tableau ci-après.

ACTIVITÉ MUSCARINIQUE DES CULTURES

Nom de l'espèce	N° des souches	Mycélium		Liquide de culture	
		Poids frais en grammes	Amplitudes en cm rapportées à 1 g	Volume en litres	Amplitudes en cm rapportées à 1 ml
<i>Clitocybe angustissima</i>	L 64 — 140	225	0,19	2,220	0,25
<i>Clitocybe suaveolens</i>	23-10-1958	241,3	0,18	2,330	0,11
<i>Clitocybe diatreta</i>	L 65 — 96				
» »	L 63 — 157				
» »	L 63 — 171	14,1	2,83	2,900	0,064
» »	L 62 — 83				
» »	Ly 64				
» »	24-10-1953	166,5	0,24	2,800	0
<i>Clitocybe festiva</i>	L 66 — 89				
» »	L 66 — 66				
» »	L 66 — 33				
<i>Clitocybe ericetorum</i>	L 62 — 74				
<i>Clitocybe candicans</i>	L 64 — 138	19,4	2,68	2,840	0,057
» »	L 62 — 59	73,5	0,63	2,668	0,052
» »	L 63 — 128	87,1	0,73	2,760	0,350
<i>Clitocybe candicans</i> var. <i>dryadicola</i>	L 61 — 35	53,7	0,40	2,580	0,084
» »	L 61 — 75	48,1		2,560	0,075
» »	L 61 — 74	125	0,28	2,780	0,110
» »	L 62 — 45	60,1	0,58	2,480	0,300
» »	L 66 — 47	94,7	0,21	2,840	0,410
» »	L 66 — 57	112,1	0	2,760	0
<i>Clitocybe pithyophila</i>	L 60 — 37	82,1	0,29	2,670	0
» »	18-10-1967	149,5	0	2,300	0,041
» »	L 60 — 23	212,9	0,46	2,300	0,045

ET DES CARPOPHORES DE CLITOCYBES

Mycélium + Liquide de culture			Carpophores	
Poids frais en grammes	Volume en litres	Amplitudes en cm mesurées pour 1 ml de mélange	Poids sec en grammes	Quantité de substances évaluées par rapport à l'acétylcholine en µg/g
158	2,840	8		
77	2,670	0	0,19	0,79
			0,14	0,62
177	2,710	0	0,19	0,23
112	2,690	0	0,03	1,17
282	2,650	6,6	0,05	0,31
180	2,700	13	0,07	1,54
187	2,660	13	0,09	0,71
300	2,600	6,8		0,75
			0,08	0,72
			0,05	0,70
			0,10	0,30
			0,17	0,82
			0,07	0,16
			0,07	0,17
			0,10	0,25
			0,02	0,21
			0,05	1,96

V. EXAMEN DES RÉSULTATS.

Nous avons révélé que 8 espèces sont douées d'une activité muscarinique.

L'espèce la plus active est *Clitocybe festiva*.

Trois d'entre elles, certes : *Clitocybe candicans*, *C. candicans* var. *dryadicola* et *C. pithyophila*, font partie du groupe des *Candicantes*, déjà réputé par la toxicité de *Clitocybe rivulosa* et de *C. dealbata*.

Clitocybe ericetorum, espèce faisant la transition entre le groupe des *Clitocybes* hygrophanes à lames blanchâtres et celui des *Candicantes*, se révèle également toxique.

Plus surprenante est la toxicité de *Clitocybe angustissima*, *C. suaveolens*, *C. diatreta* et *C. festiva* (qui est selon D. LAMOURE *viva voce* assez proche de *C. diatreta*) : *Clitocybes* hygrophanes à lames blanchâtres, groupe où aucune espèce douée d'activité muscarinique n'avait été signalée jusqu'à ce jour.

Sauf pour *C. angustissima*, *C. suaveolens* et *C. pithyophila*, nous avons mis en évidence cette activité muscarinique à la fois dans les carpophores et les mycéliums en culture pure.

La comparaison de l'activité muscarinique des carpophores et des cultures nous a permis de constater que, dans nos conditions expérimentales :

— à des carpophores toxiques, correspondent presque toujours des cultures actives biologiquement (13 sur 17).

— les carpophores les plus riches en substances à activité muscarinique ne donnent pas toujours les cultures les plus toxiques.

Donc — nous tenons à le souligner — dans les conditions de culture que nous leur imposons, la plupart des champignons étudiés (13 sur 17) produisent des substances actives ; mais cependant il n'y a pas toujours concordance entre le taux de toxicité des carpophores et celui des cultures.

En outre, nous avons noté très souvent une différence de toxicité chez une même espèce, selon la souche considérée, qu'il s'agisse des mycéliums en culture pure ou des carpophores.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BURTON S.D., KELLEHER W.J., SCHWARTING A.E., 1965. — Isolation of a compound with muscarinic activity from mycelium of *Clitocybe rivulosa* grown in surface culture. *Lloydia*, 28, 260.
- GENEST K., HUGHES D.W., RICE W.B., 1968. — Muscarine in *Clitocybe* species. *J. Pharm. Sci.*, 57 (2), 331-33.

- ODDOUX L., 1955. — Recherches sur les mycéliums secondaires des Homobasidiés en culture pure. Morphologie — Cytologie — Exigences alimentaires. Thèse Doctorat ès Sciences Naturelles, Lyon (Patissier éd., Trévoux).
- ODDOUX L., 1960. — Activité antibiotique des mycéliums d'Homobasidiés en culture pure. Thèse Doctorat Etat Pharmacie, Lyon (Patissier éd., Trévoux).
- FORTE Monique, 1972. — Activité muscarinique chez les Clitocybes. Etude particulière de *Clitocybe festiva* Favre: Isolement de la muscarine. Thèse Doctorat Etat Pharmacie, Lyon.
- WASER P. G., 1961. — Chemistry and pharmacology of muscarine, muscarone and some related compounds. *Pharmac. Reviews*, 13, 465-515.
- WASER P. G., 1965. — Die pharmakologische Untersuchung von Drogen mit cholinergischen oder cholinolytischen Alkaloiden (Muscarin und Calebassen Curare). *Planta Med. Allem.*, 13, 296-314.

Lab. de Cryptogamie et Phytopharmacie,
8, avenue Rockefeller,
69008 Lyon.

SOCIETE LINNEENNE DE LYON
33, RUE BOSSUET — 69006 LYON

Commission paritaire n° 52 199
Le gérant : Marc Terreaux