

NN 8201

no 492

C

ÉTUDE DU CARACTÈRE
CYANOGENÉTIQUE DU MANIOC
(*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)

A STUDY ON THE CYANOGENETIC CHARACTER
OF CASSAVA

H. DE BRUIJN

NN08201.492

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOOGESCHOOL
GEN. FOULKENSTEG 1a
WAGENINGEN

ÉTUDE DU CARACTÈRE CYANOGENÉTIQUE DU MANIOC
(*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)

A study on the cyanogenetic character of cassava

Dit proefschrift met stellingen van

GERARDUS HUBERTUS DE BRUIJN,

landbouwkundig ingenieur, geboren te Acquoy, 29 maart 1939,
is goedgekeurd door de promotor, DR. IR. J. D. FERWERDA,
hoogleraar in de Tropische Plantenteelt.

De Rector Magnificus van de Landbouwhogeschool,
J. M. POLAK

Wageningen, 20 april 1971.

ÉTUDE DU CARACTÈRE
CYANOGENÉTIQUE DU MANIOC
(*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)

A STUDY ON THE CYANOGENETIC CHARACTER
OF CASSAVA

(met een samenvatting in het Nederlands)

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD
VAN DOCTOR IN DE LANDBOUWWETENSCHAPPEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS, MR. J. M. POLAK,
HOGLERAAR IN DE RECHTS- EN STAATSWETENSCHAPPEN
VAN DE WESTERSE GEBIEDEN
TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN
EEN COMMISSIE UIT DE SENAAAT
VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN
OP VRIJDAG 4 JUNI 1971 TE 16 UUR

DOOR

GERARDUS HUBERTUS DE BRUIJN

**Cette thèse est aussi publiée comme
Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen 71-13 (1971)
(Communications de l'Université Agronomique, Wageningen, Pays-Bas)**

STELLINGEN

I

Kennis van de activiteit van het enzym linamarase in de verschillende delen van de cassaveplant draagt bij tot beter begrip van de efficiëntie van de methoden ter vermindering van de giftigheid van cassaveprodukten en biedt mogelijkheden tot ontwikkeling van meer effectieve methoden ter verwijdering van het gif.

Dit proefschrift

II

Het gehalte aan cyanogeen glucoside in de cassaveplant is afhankelijk van de beschikbare hoeveelheid kalium en stikstof in de bodem.

Dit proefschrift

III

Hoewel de Landbouwhogeschool reeds een belangrijke bijdrage levert aan de ontwikkelingssamenwerking, zouden de mogelijkheden van de hogeschool op dit terrein in grotere mate dienen te worden benut.

IV

Plaatsing van buitenlandse deskundigen in dienst van overheden van ontwikkelingslanden dient te worden bevorderd. De Nederlandse regering zou hiertoe op grotere schaal suppletie moeten verlenen op door ontwikkelingslanden toegekende salarissen. Een dergelijk beleid zou bovendien een groter aantal uitzendingen mogelijk maken.

V

Tropische knol- en wortelgewassen, speciaal cassave, kunnen in belangrijke mate bijdragen tot verhoging van de voedselproductie in de tropen. Deze gewassen worden te weinig gewaardeerd als voedingsgewas.

DE VRIES, C. A., J. D. FERWERDA and M. FLACH, 1967. *Neth. J. Agric. Sci.* **15**: 241-248.

COURSEY, D.G. and P.H. HAYNES, 1970. *World Crops* **22**: 261-265.

VI

De indeling van cassave in meer en minder giftige klonen op basis van het blauwzuurgehalte van de geschilde wortels is niet noodzakelijkerwijze geldig voor de andere delen van de plant.

Dit proefschrift

VII

Bij het ouder worden van koffiezaad nemen het kiemvermogen en de kiemsnelheid af, terwijl de groeisnelheid van de resulterende planten belangrijk lager is dan die van planten afkomstig uit vers zaad.

DE BRUIJN, G. H. en J. D. FERWERDA (publikatie in voorbereiding)

VIII

Het is van groot belang dat grondig onderzoek wordt verricht naar de mogelijkheid van economisch verantwoord permanent grondgebruik met éénjarige gewassen in de humide tropen.

IX

Tropische grassen verkrijgen een deel van de benodigde stikstof via microbiële stikstofbinding in de fyllosfeer, speciaal binnen de bladschede.

RUJNEN, J., 1970. *Plant and Soil* 33: 661-671.

X

De veronderstelling van LUYKEN et al., dat de bladeren van de in Dahomey voorkomende cassavekloon UT 58377 geen blauwzuur bevatten, is onjuist.

LUYKEN, R., A. P. DE GROOT, P. SLUMP en J. J. L. WILLEMS, 1968. Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek, Zeist. Rapport No R 2617.

XI

Vermelding van het vakgebied van de Rector Magnificus in het zogenaamde 'voorwerk' van een proefschrift is niet ter zake dienend.

XII

De minimumleeftijd voor toelating tot de kleuterschool moet worden verlaagd tot drie jaar.

Aan allen die mij kennis hebben bijgebracht

VOORWOORD

Gaarne wil ik mijn dank betuigen aan allen die direct of indirect aan de totstandkoming van dit proefschrift hebben meegewerkt.

In de eerste plaats dank ik mijn ouders en familieleden die het mij mogelijk gemaakt hebben te studeren. Speciaal gedenk ik hierbij mijn moeder die met grote belangstelling mijn studie volgde maar helaas de voltooiing ervan niet heeft kunnen meemaken.

Daarnaast richt mijn dank zich tot allen die aan mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen.

Hooggeleerde FERWERDA, hooggeachte promotor, ik ben U zeer erkentelijk voor het vertrouwen dat U in mij gesteld heeft door mij de gelegenheid te bieden dit proefschrift voor te bereiden. Bij de uitvoering van mijn onderzoek heb ik Uw voortdurende steun ondervonden en uit de gesprekken, waartoe U te allen tijde bereid was, zijn veel nuttige adviezen voortgekomen. Hiervoor ben ik U veel dank verschuldigd.

Hooggeachte BOLHUIS, Uw jarenlange ervaring in Indonesië, speciaal met voedingsgewassen, is er de oorzaak van dat het onderwerp van mijn onderzoek van Uw zijde komt. U heeft met grote belangstelling mijn werk op de voet gevolgd. Ik dank U hartelijk voor Uw daadwerkelijke steun en Uw raadgevingen. Het doet me bijzonder genoegen dat U, ondanks het neerleggen van Uw functie, toch actief bij de voltooiing van dit proefschrift bent betrokken.

Hooggeleerde VAN DIE, Uw belangstelling voor mijn onderzoek en Uw raadgevingen zijn voor mij een belangrijke ruggesteun geweest bij de uitvoering van mijn werk. Ik ben U daarvoor zeer dankbaar.

Het BESTUUR VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL ben ik zeer erkentelijk dat het mijn uitzending naar het Centre Néerlandais in Ivoorkust heeft mogelijk gemaakt.

Voor de uitvoering van mijn onderzoek is mij welwillend gastvrijheid en medewerking verleend door het OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER (O.R.S.T.O.M.). Naar ik hoop is mijn grote erkentelijkheid ten opzichte van het O.R.S.T.O.M. en allen die mij in Ivoorkust behulpzaam zijn geweest elders in dit werk, in het frans gesteld, voldoende tot uitdrukking gebracht.

Een bijzonder woord van dank ben ik verschuldigd aan Mejuffrouw DR. J. RUINEN voor haar medewerking en nuttige suggesties bij de voorbereiding en in de beginperiode van mijn onderzoek. Ik ben de heer IR. V. J. M. KOCH erkentelijk voor het waarnemen van de proeven tijdens mijn verlof alsmede voor het toesturen van aanvullende informatie.

Zeer van harte dank ik Mevrouw DR. J. A. FRAHM-LELIVELD voor de vele uren die zij heeft willen besteden aan een kritische beschouwing van het manuscript, waardoor de tekst aan duidelijkheid en stijl heeft gewonnen.

Voor de van studentenzijde ondervonden zeer nuttige hulp gaat mijn dank uit naar Mevrouw Ir. E. GIETEMA-GROENENDIJK en naar de heren J. J. ASJÉE, W. C. H. VAN HOOF en Ir. S. J. M. VAN HOOGSTATEN.

De afdeling Wiskunde van de Landbouwhogeschool, speciaal de heer M. KEULS, ben ik zeer erkentelijk voor de medewerking bij de wiskundige verwerking van de resultaten.

De heer G. GORZÈGNO ben ik zeer erkentelijk dat hij de franse tekst heeft willen corrigeren, terwijl ik Mevrouw E. M. BROUNS-MURRAY dank zeg voor de correctie van het engelse gedeelte.

Met dank en waardering vermeld ik de heer R. BOEKELMAN vanwege het vervaardigen van de tekeningen, hetgeen hem zeer wel toevertrouwd was, alsmede Mejuffrouw E. J. VAN DIJK, Mevrouw C. E. JONGMANS-BOEKELMAN en Mejuffrouw M. HARDEMAN voor hun bijdrage aan het typen van het manuscript. Tevens wil ik gaarne de hulp ondervonden van Mevrouw J. SNIJDERS-TIMMER en de heer J. H. VAN ZEE memoreren.

Aan alle personeelsleden van de afdeling Tropische Plantenteelt betuig ik mijn dank voor de prettige sfeer waarin ik heb kunnen werken, terwijl ik mijn collega's dank zeg voor de medewerking die zij mij hebben verleend.

Gaarne dank ik ook allen van wie wij tijdens ons verblijf in Ivoorkust vriendschap mochten ondervinden.

Tot slot wil ik jou, Anneke, oprecht danken, niet alleen voor je veelvuldige hulp op het laboratorium in Ivoorkust en voor het feit dat je zo dikwijls als klankbord hebt willen fungeren voor mijn gedachtenbepaling, maar vooral ook voor de belangrijke persoonlijke steun die ik niet zou hebben kunnen missen.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
2. CYANOGENÈSE	3
2.1. Cyanogénèse dans les plantes en général	3
2.2. Cyanogénèse dans le manioc	7
3. MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE	9
3.1. Conditions écologiques des champs d'expérimentation	9
3.1.1. Introduction	9
3.1.2. Climat	11
3.1.3. Sol	11
3.2. Considérations botaniques	12
3.3. Choix des clones	13
3.4. Techniques culturales	14
3.5. Nomenclature des organes de la plante	14
3.6. Détermination de la teneur en glucoside cyanogénétique	15
3.6.1. Introduction	15
3.6.2. Dosage du cyanure libéré par les tubercules écorcés	15
3.6.3. Détermination de la teneur en glucoside des feuilles, de l'écorce des tiges et des tubercules, et des racines	16
3.7. Explication de la méthode employée pour la détermination de la teneur en glucoside cyanogénétique, et des expériences de mise au point	17
3.7.1. Prélèvement des échantillons	17
3.7.2. Conservation des échantillons	18
3.7.3. Homogénéisation des tubercules écorcés	19
3.7.4. Poids des échantillons	19
3.7.5. Température et temps de macération	21
3.7.6. Action d'un tampon, d'acides dilués et de l'addition d'enzyme, sur l'hydrolyse	24
3.7.7. Entraînement de l'acide cyanhydrique libéré	25
3.7.8. Dosage du cyanure	27
3.7.9. Pertes en cyanure	28
4. RÉPARTITION DU GLUCOSIDE DANS LA PLANTE	31
4.1. Introduction	31
4.2. Répartition du glucoside dans les feuilles et dans les fruits	31
4.3. Répartition du glucoside dans l'écorce des tiges	33
4.4. Répartition du glucoside dans les tubercules	34
4.4.1. Teneur en glucoside dans différents tubercules de la même plante	34
4.4.2. Répartition à l'intérieur des tubercules	36
4.4.2.1. Comparaison de la teneur de l'écorce et de la partie centrale	36
4.4.2.2. Répartition dans les tubercules écorcés	37
4.5. Répartition du glucoside dans différents organes des mêmes plantes	40
4.6. Rapport entre la teneur en glucoside des feuilles et celle des tubercules écorcés d'un grand nombre de clones	41
4.6.1. Protocole expérimental	41
4.6.2. Résultats	41
4.7. Discussion	42

5. ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE DIFFÉRENTS ENGRAIS SUR LA TENEUR EN GLUCOSIDE DES PLANTES	44
5.1. Introduction	44
5.2. Expérimentation au champ	44
5.2.1. Essai sur l'influence des engrais azoté et potassique	44
5.2.1.1. Protocole expérimental	44
5.2.1.2. Résultats	46
5.2.2. Essai sur l'influence des engrais azoté, phosphaté, potassique, magnésique et calcique	46
5.2.2.1. Protocole expérimental	46
5.2.2.2. Résultats	47
5.2.3. Essai sur l'influence du fumier de ferme	48
5.2.3.1. Protocole expérimental	48
5.2.3.2. Résultats	48
5.3. Expérimentation sur des plantes cultivées en pots ou en sachets en plastique	49
5.3.1. Essais sur l'influence d'un mélange d'engrais, du fumier, de l'ombrage, et de la sécheresse	49
5.3.1.1. Introduction	49
5.3.1.2. Protocole expérimental	49
5.3.1.3. Résultats	51
5.3.2. Essai sur l'influence des engrais azoté, phosphaté, potassique et magnésique	51
5.3.2.1. Protocole expérimental	51
5.3.2.2. Résultats	51
5.3.3. Essai sur l'influence des engrais azoté, phosphaté, potassique, magnésique et calcique	52
5.3.3.1. Protocole expérimental	52
5.3.3.2. Résultats	52
5.3.4. Essai sur l'influence et des engrais azoté, phosphaté, potassique, magnésique et calcique, et du fumier	53
5.3.4.1. Protocole expérimental	53
5.3.4.2. Résultats	55
5.4. <i>Discussion et conclusions</i>	55
6. EXPÉRIMENTATION SUR L'INFLUENCE DE LA SÉCHERESSE	58
6.1. Introduction	58
6.2. Essais au champ	58
6.2.1. Protocole expérimental	58
6.2.2. Résultats	59
6.3. Essais effectués en pots et en sachets en plastique	60
6.3.1. Essais en pots	60
6.3.2. Essai en sachets	60
6.4. <i>Discussion et conclusions</i>	61
7. ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN GLUCOSIDE DES TUBERCULES AU COURS DE LA PÉRIODE DE VÉGÉTATION, ET DE L'INFLUENCE DE LA LOCALITÉ DE CULTURE	63
7.1. Introduction	63
7.2. Essais effectués à Adiopodoumé	64
7.2.1. Introduction	64
7.2.2. Premier essai	64
7.2.2.1. Protocole expérimental	64
7.2.2.2. Résultats	64
7.2.3. Deuxième essai	66
7.2.3.1. Protocole expérimental	66
7.2.3.2. Résultats	67

7.2.4.	Troisième essai	67
7.2.4.1.	Protocole expérimental	67
7.2.4.2.	Résultats	67
7.2.5.	Évolution de la fertilité du sol	67
7.2.6.	Discussion et conclusions	69
7.3.	Essai comparatif effectué à Adiopodoumé, Bouaké, Ferkéssédougou et Man	71
7.3.1.	Protocole expérimental	71
7.3.2.	Résultats	74
7.3.3.	Discussion et conclusions	75
8.	INFLUENCE DE LA LUMINOSITÉ – FLUCTUATION QUOTIDIENNE DE LA TENEUR EN GLUCOSIDE DES FEUILLES	77
8.1.	Introduction	77
8.2.	Influence de l'ombrage	78
8.2.1.	Premier et deuxième essai	78
8.2.2.	Troisième essai	78
8.2.3.	Conclusions	79
8.3.	Fluctuation quotidienne dans les feuilles	80
8.3.1.	Premier essai	80
8.3.2.	Deuxième essai	82
8.3.3.	Troisième essai	83
8.3.4.	Conclusions	84
9.	AUTRES FACTEURS LIÉS À LA TENEUR EN GLUCOSIDE	85
9.1.	Orientation des boutures	85
9.1.1.	Introduction	85
9.1.2.	Essai en sachets	85
9.1.3.	Essai au champ	86
9.1.4.	Discussion et conclusion	87
9.2.	Corrélations entre la teneur en glucoside et d'autres caractéristiques de la plante	87
9.2.1.	Introduction	87
9.2.2.	Comparaison de plantes des mêmes clones	88
9.2.3.	Comparaison de clones différents	89
9.3.	Influence de la colchicine	91
10.	ÉTUDE DE LA MIGRATION DU GLUCOSIDE	92
10.1.	Introduction	92
10.2.	Influence de la décortication annulaire des tiges, en combinaison ou non avec l'ablation des feuilles, sur la teneur en glucoside de l'écorce	93
10.3.	Influence de la décortication annulaire des tiges, de la section des tiges et de l'ablation des feuilles, sur la teneur en glucoside des tubercules	96
10.3.1.	Introduction	96
10.3.2.	Les essais: explication et résultats	96
10.4.	Discussion et conclusions	97
11.	ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE LA LINAMARASE	99
11.1.	Introduction	99
11.2.	Mode opératoire	99
11.2.1.	Préparation du substrat	99
11.2.2.	Préparation et conservation des extraits d'enzyme	100
11.2.3.	Dilution des extraits	100
11.2.4.	Détermination de l'activité enzymatique	101
11.3.	Répartition de l'activité enzymatique dans la plante	103

11.3.1.	Explication de l'essai	103
11.3.2.	Résultats	103
11.4.	Comparaison de l'activité enzymatique des tubercules de clones très toxiques et peu toxiques	105
11.5.	Discussion et conclusions	106
12.	ÉLIMINATION DE LA SUBSTANCE TOXIQUE DES PARTIES COMESTIBLES DE LA PLANTE	108
12.1.	Introduction	108
12.2.	Danger d'intoxication	108
12.3.	Méthodes d'élimination du glucoside et de l'HCN	110
12.3.1.	Cuisson et friture	110
12.3.1.1.	Pour les tubercules	110
12.3.1.2.	Pour les feuilles	111
12.3.2.	Séchage	111
12.3.3.	Trempage	113
12.3.4.	Râpage, broyage, pilage	113
12.3.5.	Addition de glucose	114
12.4.	Influence de l'addition d'enzyme sur l'élimination du glucoside des tubercules écorcés et râpés	115
12.5.	Discussion et conclusions	118
	RÉSUMÉ	119
	SUMMARY	124
	SAMENVATTING	129
	REMERCIEMENTS	134
	BIBLIOGRAPHIE	136

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au moment où Colomb découvrit l'Amérique, la culture du manioc y était déjà très répandue. Introduite ensuite dans diverses régions tropicales, surtout par les Portugais, elle a pris actuellement une grande extension dans de nombreux pays tropicaux. Devenu souvent nourriture de base, le manioc n'est pourtant pas sans inconvénients. La violente toxicité des tubercules de certains clones peut en rendre très dangereuse la consommation. Et, bien qu'on sache en général se débarrasser de la substance toxique, l'acide cyanhydrique, des accidents se produisent toujours, parfois mortels, dus à la consommation de tubercules. De plus, les méthodes d'élimination de l'acide cyanhydrique aboutissent à une diminution ou à une dégradation des vitamines et des protéines, dont la teneur est déjà très faible dans les tubercules frais (ADRIAENS, 1955).

Pour la préparation des denrées alimentaires à base de manioc, destinées non seulement à l'homme mais encore aux animaux, il est très important d'avoir une connaissance détaillée du caractère cyanogénétique de la plante. Il est connu que la toxicité du manioc peut varier de façon importante suivant les clones et les conditions écologiques de culture. Mais, en étudiant les travaux effectués sur la cyanogénèse du manioc, on aperçoit bien des lacunes, et surtout une multitude de contradictions. Ceci a été démontré clairement par BOLHUIS (1954) dans son article sur la toxicité du manioc; aussi, cet auteur a-t-il soutenu qu'il fallait y consacrer une étude plus approfondie que celles entreprises jusque là. En effet, le but principal de nos recherches était d'étudier l'influence de quelques facteurs écologiques sur la toxicité des tubercules du manioc. Cependant, bien que les tubercules soient les parties de la plante les plus intéressantes au point de vue nutritif, il est évident qu'au point de vue physiologique, la seule étude de la cyanogénèse dans les organes capables d'emmagasiner l'amidon était insuffisante. Ainsi, au cours de nos travaux, il nous a paru indispensable d'étudier le caractère cyanogénétique des différents organes de la plante et d'aborder quelque peu aux répercussions physiologiques.

Dans ce mémoire nous présenterons d'abord un aperçu sur la cyanogénèse des plantes en général, et plus spécialement du manioc. Ensuite nous envisagerons les conditions écologiques des champs d'expérimentation et les questions relatives au matériel et à la méthodologie générale. Puis, après avoir prêté attention à la répartition de la substance toxique dans la plante, nous aborderons l'étude de divers facteurs, et plus spécialement ceux d'ordre écologique, pouvant influencer la teneur en substance toxique des tubercules écorcés, et, dans quelques cas, des autres parties de la plante. Lors de ces recherches nous avons essayé d'établir s'il y a une différence importante ou non, suivant qu'on étudie les tubercules écorcés, ou les autres organes de la plante.

Dans la partie qui suit nous envisagerons d'abord la migration du principe toxique dans la plante. Nous présenterons ensuite les résultats d'une étude sur l'activité de la linamarase et sur la répartition de cette enzyme dans la plante.

Enfin, nous présenterons un aperçu des méthodes d'élimination de la substance toxique et ajouterons les résultats de nos propres recherches. La connaissance de la répartition de la linamarase dans la plante nous a permis de considérer les possibilités d'éliminer efficacement la toxicité des parties comestibles de la plante.

2. CYANOGENÈSE

2.1. CYANOGENÈSE DANS LES PLANTES EN GÉNÉRAL

La propriété d'un assez grand nombre de plantes de pouvoir émettre, dans certaines conditions, de l'acide cyanhydrique (HCN) est connue sous le nom de cyanogénèse. Certaines plantes ont des organes qui peuvent émettre l'HCN en quantité mortelle pour la consommation.

La nature toxique de certaines plantes cyanogénétiques était bien connue déjà dans l'antiquité. Les prêtres égyptiens des temples de Memphis et de Thèbes, convaincus d'avoir trahi un secret de leur art sacré, furent empoisonnés avec 'le fruit du pêcher' (DE RASSENFOSSE et GUÉBEN, 1936).

Il n'a jamais été prouvé définitivement, que l'HCN puisse se trouver à l'état libre dans les plantes cyanogénétiques (DILLEMANN, 1958). En revanche, il a été montré que certaines plantes cyanogénétiques contiennent des substances capables de libérer de l'HCN, et qui, selon DILLEMANN, ont été reconnues comme étant des hétérosides. Puisque ces hétérosides cyanogénétiques donnent par hydrolyse du glucose, ils peuvent être désignés sous le nom de glucosides cyanogénétiques (POLONOVSKI et LESPAGNOL, 1941), terme que nous emploierons dans le travail présent.

Il est probable que, dans la plante, l'HCN n'est émis qu'après décomposition du glucoside cyanogénétique; cette décomposition peut être provoquée par simple froissement des tissus.

L'amande a joué un rôle important dans la découverte de la cyanogénèse des plantes. Après la découverte de l'HCN par SCHEELE en 1780 (DUNSTAN et al., 1906) cet acide fut trouvé pour la première fois dans le règne végétal en 1801, dans un distillat d'amandes amères, par BOHM (DILLEMANN, 1958). En 1830, ROBIQUET et BOUTRON-CHARLARD observaient que les amandes amères contiennent 'un principe particulier qui est azoté, et qui paraît être l'unique cause de l'amertume de l'huile essentielle'; ils appelèrent ce principe: amygdaline (nom actuel: amygdalosite). En 1837, WÖHLER et LIEBIG montraient que l'amygdalosite pouvait se scinder en glucose, benzaldehyde et HCN, sous l'influence d'une matière 'albuminoïde', présente dans les amandes, qu'ils appelèrent: émulsine. L'amygdalosite fut le premier glucoside cyanogénétique à être isolé. Ce n'est que cinquante ans plus tard que JORISSEN et HAIRS (1887, 1891) isolaient à partir de plantules du lin, un glucoside cyanogénétique, différent de l'amygdalosite, auquel ils donnaient le nom de linamarine (linamarosite). Par la suite, plusieurs autres glucosides cyanogénétiques ont été isolés.

En 1969, CONN et BUTLER distinguaient onze glucosides cyanogénétiques dont la constitution est déterminée; récemment EYJÓLFSSON (1970) a mis en évidence l'existence d'un nouveau glucoside cyanogénétique: le triglochinoside.

Une revue bibliographique des travaux d'avant 1958 sur la cyanogénèse a été faite par DILLEMANN (1958). La propriété cyanogénétique a été signalée parmi

des plantes appartenant à des familles les plus divergentes des Phanérogames, mais on la trouve également parmi les Ptéridophytes et les Thallophytes. DILLEMANN fait mention de 900 espèces cyanogénétiques, réparties entre 95 familles, parmi les Phanérogames. Actuellement, ce nombre est plus important, puisqu'on trouve toujours de nouvelles espèces cyanogénétiques. L'information la plus complète sur la répartition des plantes cyanogénétiques est donnée par HEGNAUER dans son vaste travail (encore inachevé): 'Chemotaxonomie der Pflanzen' (1962, 1963, 1964, 1966, 1969). Bien qu'on connaisse un grand nombre d'espèces cyanogénétiques, la nature de la substance cyanogénétique n'a été déterminée que pour un nombre relativement restreint de ces espèces.

Certaines familles parmi les Phanérogames sont particulièrement riches en espèces cyanogénétiques, alors que d'autres ne comportent que très peu d'espèces. La teneur en glucoside cyanogénétique est très variable suivant les espèces. Mais il existe aussi, pour la même espèce, de grande variation, suivant les variétés. De plus, dans la même variété la teneur dépend beaucoup des conditions écologiques et du stade de développement de la plante. Dans la même plante, enfin, la teneur n'est pas la même pour les différents organes.

La teneur la plus élevée, constatée jusqu'à présent, atteint 17 mg d'HCN libérés par g de feuilles sèches, pour le *Dimorphoteca spectabilis* (DILLEMANN, 1958).

Quant à l'hérédité, il est probable que, dans la plupart des cas, la cyanogénèse se présente comme un caractère polyfactoriel. Toutefois, pour le trèfle blanc, le *Lotus corniculatus*, et certaines espèces de *Linaria*, il a été mis en évidence que la cyanogénèse n'est contrôlée que par très peu de paires de gènes (DILLEMANN, 1958).

Il a été démontré que la même plante peut former plus d'un seul glucoside cyanogénétique. Notamment, on trouve souvent réunis dans la même plante le linamaroside et le lotaustraloside (BUTLER, 1965).

La décomposition des glucosides cyanogénétiques s'effectue en deux phases. D'abord le glucose est détaché de la molécule sous l'action d'un β -glucosidase. Quant à l'aglycone, on admet qu'à l'eau elle se dissocie spontanément en HCN, et un aldéhyde ou une cétone; mais CONN et BUTLER (1969) mentionnent que dans certains cas l'action catalytique d'une enzyme a été démontrée.

La spécificité des enzymes qui effectuent l'hydrolyse de ces glucosides n'a pas été bien établie. Déjà en 1891, JORISSEN et HAIRS ont signalé que 'l'émulsion d'amandes douces n'agit pas sur la linamarine', et que 'l'amygdaline se dédouble aussi bien en présence d'une émulsion d'amandes douces que d'une émulsion de farine de lin'. L'activité hydrolysante des enzymes n'a été étudiée que 'in vitro'. Toutefois, à la suite de récentes recherches, de nombreux auteurs admettent que ces enzymes peuvent agir sur leurs substrats 'in vivo' également (TSCHIERSCHE, 1967).

Plusieurs auteurs se sont interrogés sur le rôle physiologique des glucosides cyanogénétiques. Ne sont-ils que des substances de déchet ou bien ont-ils un rôle important pour le métabolisme? Entre ces deux extrêmes, plusieurs hypothèses ont été avancées, que DILLEMANN (1958) passe en revue. Bien que leur

rôle ne soit pas encore tout à fait connu actuellement, l'emploi récent des radio-isotopes dans la recherche sur la biosynthèse des glucosides cyanogénétiques a permis d'apporter des éclaircissements importants dans ce domaine. TSCHERSCH (1967) et CONN et BUTLER (1969) ont établi un bilan bibliographique de ces travaux. En effet, en 1958, GANDER, et CONN et AKAZAWA ont mis en évidence par des recherches indépendantes, que le dhurroside, glucoside cyanogénétique

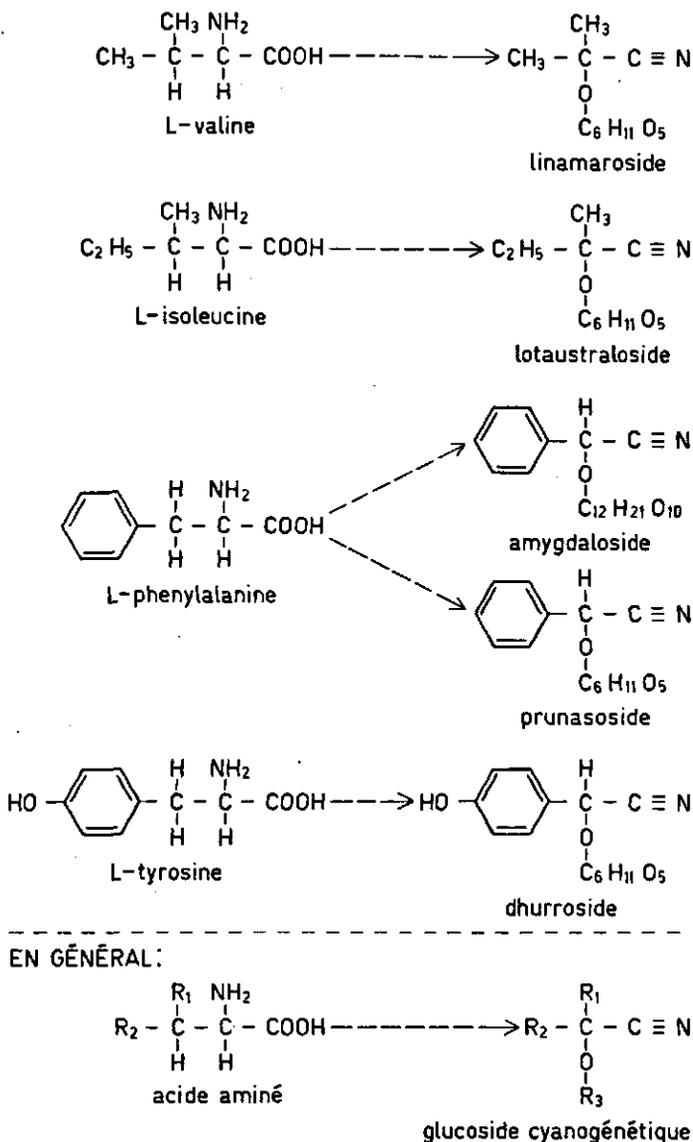


FIG. 1. Quelques glucosides cyanogénétiques et les acides aminés dont ils dérivent.
 Fig. 1. Some cyanogenetic glucosides and their amino acid precursors.

du *Sorghum vulgare*, est formé par la voie de la tyrosine, donc que la biosynthèse du glucoside passe par un acide aminé, ayant une constitution moléculaire ressemblant à celle de l'aglycone du glucoside en question. De manière analogue, il a été démontré que le linamaroside et le lotaustraloside peuvent être respectivement formés par la voie de la valine et de l'isoleucine, dans quatre espèces différentes: le trèfle blanc (BUTLER et BUTLER, 1960), le lin (BUTLER et CONN, 1962, 1964), le *Lotus arabicus* (ABROL et CONN, 1964, 1966) et le manioc (NARTEY, 1968). La phénylalanine peut mener à la formation du prunasoside dans le laurier-cerise (MENTZER et al., 1963) et le pêcheur (BEN-YEHUSHUA et CONN, 1964), et de l'amygdalosite dans l'amande amère (ABROL, 1967). Bien qu'aucune recherche analogue n'ait été effectuée jusqu'à ce jour sur la biosynthèse des autres glucosides cyanogénétiques connus, on peut supposer que pour ceux-ci, la voie de la biosynthèse est probablement très voisine. La figure 1 présente quelques acides aminés et les glucosides cyanogénétiques qui peuvent en résulter.

Il est à remarquer que déjà en 1922, ROSENTHALER est arrivé à la conclusion que dans les plantes cyanogénétiques l'HCN peut être formé aux dépens des acides aminés si ceux-ci sont présents en abondance. STEKELNBURG (1931) affirmait que les glucosides cyanogénétiques sont des sous-produits du métabolisme des protéines.

Si l'on connaît le début et la fin de la chaîne des réactions transformant un acide aminé en un glucoside cyanogénétique, on ne connaît pas exactement les étapes intermédiaires; TSCHIRSCH (1967) et CONN et BUTLER (1969) ne présentent que des hypothèses.

Parallèlement aux recherches sur la biosynthèse des glucosides cyanogénétiques, il a été mis en évidence que certaines espèces des Phanérogames, cyanogénétiques ou non, ainsi que quelques espèces des Thallophytes, sont capables d'assimiler l'HCN. Il a été constaté que l'administration d'HCN, marqué au carbone-14, aux plantes cyanogénétiques ne mène pas au marquage des glucosides cyanogénétiques. En revanche, en 1963, par des recherches indépendantes, BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT et al., et TSCHIRSCH ont démontré que chez certaines plantes l'administration d'HCN, marqué au carbone-14, fait marquer l'asparagine. Dans certains cas la β -cyanoalanine peut être marquée (TSCHIRSCH, 1964a, 1964b, 1964c).

ABROL et CONN (1966) ont mis en évidence l'existence d'une relation entre l'assimilation de l'HCN et la cyanogénèse. En effet, après administration de valine et d'isoleucine, marquées au carbone-14, à de jeunes plantes du genre *Lotus*, le carbone-14 marque non seulement le linamaroside et le lotaustraloside, mais encore l'asparagine. Dans ces plantes, on retrouve également de l'asparagine radioactive après administration d'HCN, marqué au carbone-14. Aussi ces auteurs ont-ils conclu que les glucosides cyanogénétiques peuvent être décomposés 'in vivo' alors que l'HCN libéré peut être incorporé dans l'asparagine. Selon la conception actuelle de la cyanogénèse, la formation et la décomposition des glucosides cyanogénétiques s'effectuent dans la plante parallèlement, donc la teneur en glucoside que l'on détermine n'est que la résultante de ces deux réactions. On admet que le métabolisme des glucosides cyanogénétiques est en

relation avec celui des acides aminés. Certains acides aminés peuvent être transformés en glucosides cyanogénétiques, et ces glucosides peuvent rentrer dans le métabolisme des acides aminés par la voie de la β -cyanoalanine ou de l'asparagine; TSCHIRSCH (1967) en présente un schéma. On peut admettre que la formation des glucosides cyanogénétiques sera plus importante quand la disponibilité des acides aminés sera plus grande. Ainsi, la grande variation de la teneur en glucoside cyanogénétique que l'on constate dans les plantes en fonction de la nature des organes et des conditions extérieures, est plus compréhensible.

2.2. CYANOGENÈSE DANS LE MANIOC

La population autochtone de l'Amérique tropicale savait bien que les tubercules du manioc peuvent contenir des quantités mortelles d'une substance toxique. On a trouvé des méthodes de préparation rendant la consommation des tubercules sans danger. C'est probablement CLUSIUS (1605) qui, dans les ouvrages européens, fit le premier mention de la toxicité du manioc. Il affirme alors que la formation du principe toxique est en relation avec les conditions de culture (DUNSTAN et al., 1906).

Le vrai caractère du principe toxique a été obscur pendant longtemps. En 1836, HENRY et BOUTRON-CHARLARD ont démontré que la substance toxique des tubercules du manioc est l'acide cyanhydrique. En 1886, PECKOLT a mis en évidence l'existence dans le manioc de l'HCN, combiné à une substance qu'il appelait: manihotoxine. En 1906, DUNSTAN et al. ont réussi à isoler un glucoside des tubercules du manioc, ainsi qu'une enzyme capable de le scinder en glucose, acétone et HCN. Il s'est trouvé que ce glucoside était le même que celui que DUNSTAN et HENRY avaient isolé du *Phaseolus lunatus* en 1903 et auquel ils avaient donné le nom de phaseolunatine. Cependant, la phaseolunatine s'est révélée être le même glucoside que la linamarine (linamaroside), isolée antérieurement du lin par JORISSEN et HAIRS (1887, 1891).

Le linamaroside est un β -glucoside (CLAPP et al., 1966) qui répond à la formule $C_{10}H_{17}NO_6$. Il fond à $141^\circ C$ et possède un pouvoir rotatoire de $-26^\circ 2'$. La constitution de la molécule est présentée dans la figure 1. Il est très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'acétone et insoluble dans l'alcool et l'éther. La libération de l'HCN s'effectue le plus facilement par hydrolyse enzymatique, donc sous l'action de la linamarase, présente dans la plante. Le linamaroside peut également être hydrolysé par des acides dilués, mais le résultat est moins bon que par hydrolyse enzymatique (WOOD, 1966).

Bien que certains auteurs - DUNSTAN et al. (1906), DIDIER DE ST AMAND (1960) - fassent mention de l'action de l'émulsine d'amandes sur le linamaroside, il a été démontré à plusieurs reprises (JORISSEN et HAIRS, 1891; TREUB, 1907; COOP, 1940; TANTISEWIE et al., 1969) que cette émulsine ne réagit pas ou de façon négligeable sur le linamaroside. En revanche, la linamarase est capable de scinder l'amygdalosite de l'amande, bien qu'assez lentement. De plus, la linamarase est capable de scinder quelques autres glucosides cyanogénétiques. Elle

réagit aussi bien sur le lotaustraloside que sur le linamaroside (COOP, 1940; NARTEY, 1968). La linamarase est décomposée à 72°C (JOACHIM et PANDIT-TESEKERE, 1944).

Jusqu'à présent le linamaroside a été retrouvé dans au moins huit genres parmi les Phanérogames (BUTLER, 1965) et dans une espèce des Thallophytes (STEVENS et STROBEL, 1968). Dans le manioc le linamaroside est accompagné d'une petite quantité de lotaustraloside; BUTLER (1965) a trouvé que le rapport des deux glucosides était de 96/4, NARTEY (1968) – de 93/7, et BISSETT et al. (1969) – de 97/3.

NARTEY (1968) a démontré que dans le manioc, le linamaroside et le lotaustraloside sont respectivement formés par la voie de la valine et de l'isoleucine. NARTEY (1969) a démontré également que le manioc est capable d'assimiler l'HCN; l'administration d'HCN marqué au carbone-14 marque l'arginine. Cet auteur affirme que la cyanogénèse dans le manioc est en relation étroite avec la disponibilité de la valine et de l'isoleucine dans la plante.

Certains auteurs (KOENS, 1948; NORMANHA, 1969) suggèrent que le glucoside du manioc ne se trouve que dans les vaisseaux laticifères, affirmation qui, à notre connaissance, n'a jamais été prouvée et qui nous paraît incorrecte, surtout si nous considérons que plusieurs espèces de plantes, ne possédant pas de vaisseaux laticifères, sont aussi cyanogénétiques.

En général, le goût des tubercules ayant une teneur en glucoside¹ très élevée (> 200 µg d'HCN par g de matière fraîche) est amer, alors que les tubercules ayant une teneur en glucoside peu élevée (< 50 µg d'HCN par g de matière fraîche) ont un goût doux. Ainsi on distingue des clones 'amers' et des clones 'doux'. Cependant, d'après KOCH (1933), PEREIRA et GOMES PINTO (1962), et SINHA et NAIR (1968), le goût n'est pas toujours en relation avec la teneur en glucoside. En effet, s'il apparaît que les tubercules de tous les clones amers contiennent toujours une quantité élevée de glucoside, la réciproque n'est pas vraie, et l'on rencontre quelques cas de tubercules à forte teneur en glucoside qui sont doux.

Autrefois, supposant que seul le manioc amer contenait la substance toxique, on distinguait une espèce amère et toxique et des espèces douces et non toxiques (voir 3.2.). D'après CARMODY (1900) c'est FRANCIS (1877) qui, le premier, a mis en évidence la présence d'HCN dans le manioc doux. Jusqu'à ce jour on n'a trouvé aucun clone de manioc dépourvu de glucoside cyanogénétique.

¹ Nous résumerons les deux glucosides cyanogénétiques du manioc sous le terme 'glucoside'.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

3.1. CONDITIONS ÉCOLOGIQUES DES CHAMPS D'EXPÉRIMENTATION

3.1.1. Introduction

La plupart des essais ont été effectués au champ d'expérimentation du Centre d'Adiopodoumé de l'OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER (O.R.S.T.O.M.). Adiopodoumé est situé à 20 km à l'ouest d'Abidjan, capitale de la République de Côte d'Ivoire. Mais, en raison de la variabilité des sols et des climats en Côte d'Ivoire, nous avons effectué un de nos essais en quatre endroits différents: à Adiopodoumé, à Bouaké, à Ferkéssédougou et à Man.

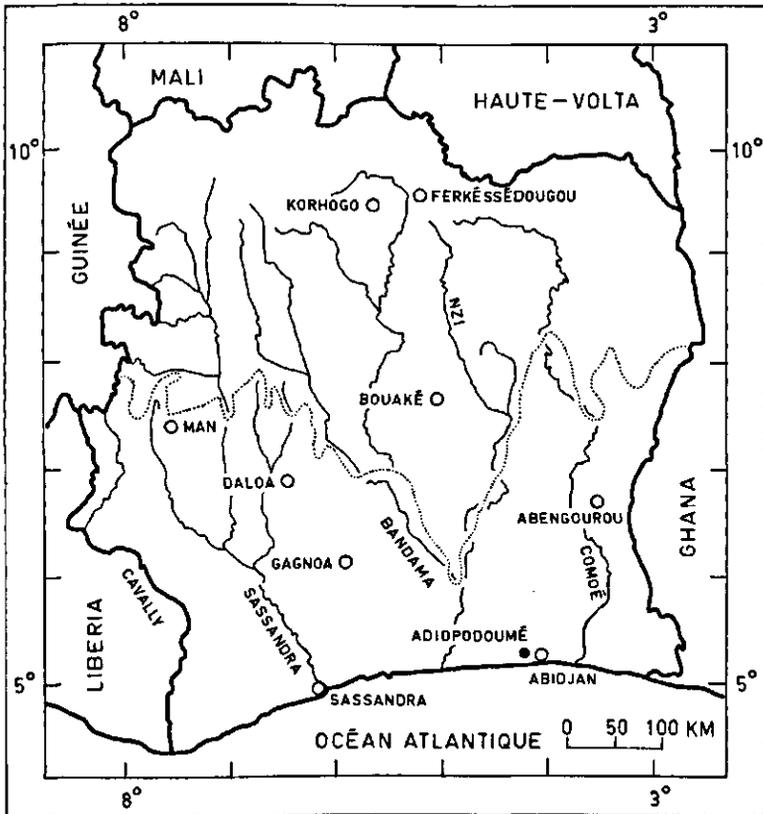


FIG. 2. Carte de la Côte d'Ivoire.

Fig. 2. Sketch map of the Ivory Coast.

TABLEAU 1. Données climatiques d'Abidjan (A), Bouaké (B), Ferkéssédougou (F) et Man (M). Moyennes calculées sur 10 ans: 1959-1968 inclus (ANON., 1969).

	Température moyenne (°C)				Température maximale moyenne (°C)				Température minimale moyenne (°C)				Humidité relative moyenne (%)			
	A	B	F	M	A	B	F	M	A	B	F	M	A	B	F	M
	janvier	26,5	26,5	25,2	24,4	30,0	32,7	34,9	32,3	22,9	20,2	15,3	16,5	84	55	43
février	27,2	27,5	28,0	25,9	30,5	33,2	36,8	33,3	23,8	21,4	19,1	18,4	84	61	44	69
mars	27,4	27,4	29,5	26,6	30,6	33,0	36,8	32,8	24,1	21,8	22,2	20,3	84	66	54	75
avril	27,4	26,8	28,9	26,2	30,7	31,8	34,7	31,5	24,0	21,7	23,1	20,8	83	74	67	80
mai	26,9	26,1	28,2	25,8	30,3	30,8	33,6	30,8	23,7	21,4	22,8	20,7	84	78	74	82
juin	26,0	24,9	26,6	25,0	28,6	28,9	31,5	29,0	23,3	20,9	21,7	20,9	85	83	78	85
juillet	25,2	24,1	25,9	24,0	27,5	27,5	30,2	27,7	23,8	20,6	21,5	20,3	86	84	81	86
août	24,5	23,9	25,4	23,8	26,9	26,2	29,3	27,2	21,9	20,5	21,4	20,4	88	85	84	88
septembre	25,2	24,5	25,9	24,3	27,6	28,3	31,5	28,6	22,2	20,6	21,3	20,3	88	85	82	87
octobre	25,8	25,0	27,3	24,8	28,6	29,4	32,8	29,8	23,1	20,6	21,5	20,0	86	83	78	85
novembre	26,9	25,6	27,1	24,8	29,9	30,5	34,4	30,2	23,9	20,8	20,0	19,4	84	79	70	83
décembre	26,6	25,7	25,2	23,9	29,9	31,2	34,1	30,9	23,4	20,2	16,3	16,9	84	69	58	76
annuelle	26,6	25,6	26,9	25,0	29,3	30,3	33,3	30,3	23,3	20,9	20,5	19,6	85	75	68	80
	Tension de vapeur moyenne (mbar)				Précipitations totales (mm)				Insolation totale (heures)				Évapotranspiration potentielle (mm)			
	A	B	F	M	A	B	F	M	A	B	F	M	A*	B	F	M
	janvier	29,3	18,0	12,9	20,6	40	15	1	10	187	194	277	223	105	130	160
février	30,3	20,3	15,7	21,7	56	55	11	42	196	196	248	201	115	140	162	144
mars	30,5	23,4	20,9	23,8	94	76	50	115	228	202	254	199	145	153	176	149
avril	30,3	25,2	25,2	26,4	152	116	123	170	204	185	234	165	130	147	170	138
mai	30,1	25,9	27,0	26,5	252	128	110	162	184	187	248	177	115	138	167	132
juin	28,5	25,3	26,5	25,7	720	209	197	232	111	116	219	115	85	108	153	107
juillet	27,3	24,5	26,2	25,2	349	112	186	208	130	89	181	82	85	92	131	89
août	26,5	24,5	26,3	24,9	48	97	295	263	116	73	149	74	90	87	122	87
septembre	27,5	25,2	26,4	25,6	57	165	252	287	130	113	172	126	90	109	133	115
octobre	28,5	25,4	26,6	26,1	152	127	95	153	189	165	248	183	115	128	160	138
novembre	29,3	25,3	23,9	25,7	155	40	23	54	214	169	263	178	130	125	162	129
décembre	29,3	21,9	17,2	22,7	103	13	9	18	198	167	258	191	115	121	151	130
annuelle	29,0	23,7	22,9	24,6	2179	1152	1350	1714	2086	1855	2751	1914	1320	1478	1847	1502

* Adiopodoumé

Table 1. Climatic data of Abidjan (A), Bouaké (B), Ferkéssédougou (F) and Man (M). Average values of 10 years: 1959-1968 (ANON., 1969).

3.1.2. Climat

Le climat du Sud de la Côte d'Ivoire est, selon la nomenclature d'AUBREVILLE (1949), du type Guinéen-Forestier. Ce climat est caractérisé par l'existence de deux saisons des pluies, la plus longue ayant son maximum en juin, la plus courte en octobre. La végétation dans cette zone climatique est la forêt dense. Adiopodoumé est situé dans cette région.

Le climat au Nord du pays est, toujours selon AUBREVILLE, du type Soudano-Guinéen. Il n'y a plus ici qu'une seule saison pluvieuse, avec un maximum en août-septembre. La végétation est la savane plus ou moins boisée; Ferkéssédougou est situé dans cette région climatique.

Bouaké et Man sont situés dans une région transitoire entre les deux climats. La ligne pointillée sur la carte (figure 2) marque la limite de la forêt dense et de la savane boisée.

Le tableau 1 groupe des données climatiques pour les quatre endroits en question (ANON., 1969). En fait le tableau fournit des données d'Abidjan et non d'Adiopodoumé, sauf pour l'évapotranspiration potentielle; mais les climats d'Abidjan et d'Adiopodoumé sont peu différents. L'évapotranspiration potentielle a été calculée suivant la formule de TURC, majorée de 15% (ELDIN et DAUDET, 1967).

3.1.3. Sol

La description suivante des sols des quatre endroits en question s'appuie sur le travail de PERRAUD (1967).

ADIOPODOUMÉ: Sol de la classe Ferrallitique, fortement désaturé, groupe Appauvri (en argile), sous-groupe Modal, issu de sables tertiaires. Ce sol est sablo-argileux en surface, la teneur en argile atteint 20 à 30% vers 1 à 2 m. Le sol profond, bien drainant, léger en surface, est chimiquement pauvre.

BOUAKÉ: Sol de la classe Ferrallitique, moyennement désaturé, groupe Remanié, sous-groupe Faiblement rajeuni, issu de granite. Ce sol a un horizon riche en éléments grossiers, proche de la surface et couvert par un horizon humifère peu épais. Il est légèrement tronqué par l'érosion. Ses propriétés chimiques sont médiocres.

FERKÉSSÉDOUGOU: Sol classé comme celui de Bouaké, mais issu de schistes. L'horizon gravillonnaire est très dense et épais. Les propriétés chimiques sont moyennes.

MAN: Sol de la classe Ferrallitique, fortement désaturé, groupe Remanié, sous-groupe Modal, issu de granite à hypersthène. L'horizon gravillonnaire se trouve près de la surface. Ce sol, ayant un horizon humifère épais de 20 à 30 cm, est assez riche en matière organique. Ses propriétés chimiques sont moyennes.

Le tableau 2 présente des données concernant la granulométrie et les propriétés chimiques, du profil de 0 à 20 cm, des sols des quatre endroits où a été effectué l'essai sur l'influence de la localité de culture sur la teneur en glucoside (voir 7.3.).

Pour constituer les échantillons nous avons effectué 50 prélèvements de terre d'un demi-kilo à peu près, également répartis sur les 2000 m² du champ; après

TABLEAU 2. Granulométrie et propriétés chimiques des sols (profil: 0-20 cm) des différentes localités (moyenne de 5 échantillonnages, effectués à des époques différentes).

	Adiopo- doumé	Bouaké	Ferkés- sédougou	Man
Refus (>2000 μm), % de terre totale	0,0	15,0	31,0	3,6
Granulométrie, % de terre fine:				
Argile < 2 μm	7,5	28,1	13,8	25,0
Limon fin 2 à 20 μm	2,4	7,1	17,0	6,9
Limon grossier 20 à 50 μm	3,1	2,8	22,8	5,2
Sable fin 50 à 200 μm	37,6	10,9	25,5	29,2
Sable grossier 200 à 2000 μm	48,5	48,4	19,3	30,2
Matière organique:				
M.O. totale ‰	17,0	26,3	20,4	39,9
Carbone ‰	9,83	15,16	11,81	23,11
Azote ‰	0,77	1,01	0,75	1,83
C/N	12,9	15,1	15,9	12,6
P ₂ O ₅ total ‰	0,501	0,415	0,384	0,586
Complexe absorbant (meq % de terre fine):				
Ca	1,01	1,76	2,32	4,35
Mg	0,46	0,95	1,40	0,91
K	0,03	0,17	0,20	0,14
Na	0,03	0,03	0,02	0,02
Somme des bases échangeables	1,52	2,91	3,91	5,43
Capacité d'échange	4,90	9,78	6,73	11,89
Taux de saturation %	31,4	29,0	58,2	45,9
pH (H ₂ O)	5,4	5,2	6,2	5,4

Table 2. Particle-size distribution and chemical properties of the soil (profile: 0-20 cm) of the experimental field in four regions (average of 5 samples, taken at different times).

avoir mélangé la terre ainsi obtenue, nous en avons conservé 2 kg. Les analyses ont été effectuées au Laboratoire Central d'Analyses de l'O.R.S.T.O.M., Centre d'Adiopodoumé.

3.2. CONSIDÉRATIONS BOTANIQUES

Nous avons effectué nos recherches avec différents clones de manioc (*Manihot esculenta* CRANTZ).

Le genre *Manihot*, de la famille des Euphorbiacées, est originaire de l'Amérique tropicale; sa localisation exacte est sujette à caution (ROGERS, 1963, 1965). D'après ROGERS (1963) le genre *Manihot* comprend environ 350 espèces; cependant, à cause du grand nombre de synonymes, il estime que le nombre exact se situe plutôt entre 100 et 200.

Le caractère cyanogénétique a eu une influence sur la classification taxonomique dans le genre *Manihot*. ROGERS (1963, 1965) présente une revue à ce sujet.

VON CRANTZ (1766) a classé les variétés du manioc cultivé dans l'espèce *Manihot esculenta*. Après lui, d'autres taxonomistes ont refait la classification en tenant compte de la toxicité des tubercules. Ainsi, POHL (1827) a classé les variétés amères sous le nom de *M. utilissima*, et les variétés douces sous le nom de *M. aipi*. *M. dulcis* et *M. palmata* sont des synonymes de *M. aipi*. La distinction entre une espèce amère (cyanogénétique) et une espèce douce (non cyanogénétique) a été litigieuse pendant longtemps. Toutefois, après qu'il eut été démontré que toutes les variétés sont plus ou moins cyanogénétiques et qu'il existe toutes sortes de nuances du caractère cyanogénétique, la plupart des auteurs ont reconnu qu'il ne fallait distinguer qu'une seule espèce de manioc cultivé. Par la suite, les noms des espèces dites 'douces' ont souvent été considérées comme des synonymes de *Manihot utilissima*. Ceci n'est pas correct, puisque le rejet de la distinction des espèces fondée sur la cyanogénèse implique que tous les noms introduits suivant cette distinction doivent être considérés comme des synonymes du nom légitime le plus ancien: *Manihot esculenta* CRANTZ. En effet, CIFFERI (1938) fut le premier à revenir au nom *Manihot esculenta*. Dans les travaux récents ce nom est de plus en plus employé.

3.3. CHOIX DES CLONES

Les clones employés pour nos recherches furent pris dans la collection de l'O.R.S.T.O.M., à Adiopodoumé. D'abord nous avons choisi un nombre de clones, possédant les caractères suivants:

- plantes vigoureuses, ayant une portée commode;
- feuilles peu attaquées par le virus de la Mosaïque du manioc;
- quantité de tubercules suffisante (au moins 2 kg par pied).

Une vingtaine de clones furent ainsi choisis. Ensuite la teneur en glucoside des tubercules écorcés fut déterminée. Nous avons effectué la plupart des essais avec deux clones ayant des tubercules peu toxiques ($< 100 \mu\text{g}$ d'HCN par g de matière fraîche): les clones Tabouca et A 13, et deux clones ayant des tubercules très toxiques ($> 200 \mu\text{g}$ d'HCN par g de matière fraîche): les clones Ta 25 et 461. Le clone 469 (moyennement toxique) fut peu employé et le clone 524 (très toxique) très peu. Un seul essai a été effectué avec 67 des clones de la collection.

Quelques exemplaires des clones Tabouca, A 13, Ta 25, 461 et 469 furent conservés et déposés à l'herbier du Laboratoire de Taxonomie et de Géographie des Plantes de l'Université Agronomique à Wageningen.

Dans la collection de manioc de l'O.R.S.T.O.M. tous les clones étaient plus ou moins virosés. Des clones introduits dans le passé, et qui n'étaient pas virosés au moment de leur introduction, révélaient des symptômes de virose après peu de temps. Donc, il nous était impossible de travailler avec des clones privés du virus. Toutefois, nous n'avons relevé aucune indication montrant qu'une attaque légère par le virus puisse troubler notre expérimentation sur la cyanogénèse.

3.4. TECHNIQUES CULTURALES

La propagation des plantes a été effectuée dans tous les cas par des boutures d'un diamètre de 20 à 30 mm, prélevées sur des tiges bien lignifiées des plantes les moins attaquées par le virus.

Nous avons pu vérifier qu'il ne se présente aucune relation entre le niveau de la bouture sur la plante mère, au-dessous d'un mètre, et la teneur en glucoside des tubercules des plantes résultantes.

Nous avons effectué la plupart des essais avec des plantes cultivées au champ; quelques essais ont été effectués avec des plantes cultivées en pots ou en sachets en plastique.

Pour les essais au champ, les boutures, de 25 cm de longueur, étaient plantées aux trois-quarts de leur longueur dans la terre, faisant un angle d'environ 45° avec la surface de la terre; c'est la méthode employée à l'O.R.S.T.O.M. L'écartement était en général de 1,0 m sur 1,5 m. Deux à trois mois après la plantation les plantes étaient buttées. Généralement nous n'avons pas amendé les champs d'expérimentation, d'autant plus que la plupart des essais étaient effectués sur des terrains défrichés peu avant la plantation.

Pour les essais en pots ou en sachets en plastique, les boutures, dont la longueur était de 15 ou 20 cm, étaient mises verticalement dans la terre, aux trois-quarts de leur longueur. En général une seule pousse était gardée, les autres étant enlevées dès qu'elles paraissaient. Pour ces essais, la quantité de terre étant très limitée, un apport d'engrais fut administré. Les fonds des pots et des sachets étaient munis de quelques trous. Les sachets étaient placés sur des carreaux pour empêcher les racines de s'enfoncer dans la terre au-dessous. Les sachets étaient protégés latéralement contre l'ensoleillement par du foin.

3.5. NOMENCLATURE DES ORGANES DE LA PLANTE

La nomenclature des organes de la plante exige une explication, pour éviter tout malentendu.

Des les ouvrages sur le manioc, on emploie soit le terme 'tubercule', soit le terme 'racine', pour désigner les racines tubéreuses. Pour respecter la distinction entre les racines tubéreuses et celles non tubéreuses, nous emploierons le terme 'tubercule' pour les racines tubéreuses, et le terme 'racine' pour les racines non tubéreuses.

Une confusion pourrait se produire sur la nomenclature des organes du tubercule. En général, le tubercule se laisse partager facilement en deux parties, dont l'une se situe à l'intérieur du cambium et l'autre à l'extérieur. Pour la partie intérieure, COURS (1951) utilise le terme 'cylindre central'. Bien que ce nom soit tentant, il n'est pas correct anatomiquement, puisque le cylindre central contient également le liber. Nous parlerons de 'partie centrale du tubercule' ou bien, plus généralement, de 'tubercule écorcé', pour indiquer qu'il s'agit d'un tubercule privé de la partie extérieure du cambium. La partie à l'extérieur du cam-

bium est appelée en général 'écorce'. Bien que ce terme ne soit pas, non plus, correct au point de vue anatomique, nous l'emploierons quand même à défaut d'une expression exacte. Mais, quand nous parlerons de l'écorce des tubercules, le liège n'est pas compris; celui-ci fut toujours écarté de l'échantillon, parce qu'il est une matière morte qui, en outre, gêne les manipulations.

3.6. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN GLUCOSIDE CYANOGENÉTIQUE

3.6.1. *Introduction*

La teneur en glucoside des tissus différents des plantes a été déterminée par l'intermédiaire du dosage de l'HCN. Celui-ci est détaché du glucoside par hydrolyse enzymatique, sous l'action d'une ou plusieurs enzymes, présentes dans les tissus mêmes. Donc, pour que le dosage donne une teneur en glucoside tout à fait correcte, il faut d'abord que tout le glucoside soit hydrolysé, puis, que l'on puisse isoler et doser tout l'HCN ainsi libéré. Cette situation idéale ne se présente probablement jamais comme il sera expliqué plus tard (3.7.9.).

Initialement, nous avons déterminé la teneur en glucoside des tubercules écorcés selon la méthode employée à l'O.R.S.T.O.M. (VOISIN, 1953, 1954); suivant cette méthode, le dosage de l'HCN est effectué au moyen de la méthode LIEBIG-DENIGÈS (voir 3.7.8.). Nous avons modifié certains points de la méthode décrite par VOISIN (1953). De plus, une méthode pour la détermination de la teneur en glucoside des feuilles, et de l'écorce des tiges et des tubercules, a été mise au point.

Ci-dessous nous présentons les méthodes employées, alors que les études qui y ont mené seront considérées dans la section 3.7.

Pour une revue bibliographique sur la méthodologie de la détermination des glucosides cyanogénétiques des tissus végétaux et les problèmes que cela peut poser, nous renvoyons à la thèse de DILLEMANN (1953).

3.6.2. *Dosage du cyanure libéré par les tubercules écorcés*

L'ensemble des tubercules d'où l'échantillon devait être pris était lavé, écorcé et râpé dans le plus bref délai. Pour des quantités inférieures à 4 kg les tubercules étaient râpés entièrement. Quand le poids total des tubercules recueillis allait de 4 à 8 kg, on n'en retenait que la moitié en pratiquant une coupe longitudinale dans chaque tubercule. Si ce poids dépassait 8 kg, deux coupes longitudinales étaient pratiquées pour n'en conserver que le quart.

Le râpage était effectué au moyen d'une machine électrique, écrasant les tubercules en morceaux de < 1,5 mm de profil. Les tubercules d'un poids inférieur à 1 kg étaient râpés au moyen d'une simple râpe à fromage.

Le produit râpé était bien pétri à la main. Des homogénats ainsi obtenus, des quantités de 27 g étaient pesées dans des ballons de 500 ml, et nous avons ajouté 100 ml d'eau déminéralisée. Les ballons étaient fermés par un bouchon en verre rodé, puis mis dans une étuve à 37°C pendant 16 à 20 heures, afin que s'effectue l'hydrolyse enzymatique.

Quand les échantillons ne pouvaient être traités immédiatement, ce qui était le cas en général, ils étaient pesés dans des flacons de 65 ml, fermés par un bouchon en plastique, et conservés au réfrigérateur à -15°C . Ainsi on peut conserver les échantillons pendant au moins deux mois sans risquer de pertes importantes. Après la conservation, le produit était dégelé, puis mis en ballon en le rinçant avec 100 ml d'eau.

La période d'hydrolyse étant terminée, une distillation à la vapeur était effectuée². L'appareil consistait en six unités de distillation en verre Quickfit, la vapeur étant fournie par un autocuiseur. Nous arrêtons la distillation après avoir obtenu un volume de 150 ml de distillat, ce qui prenait environ 25 minutes. Les distillats étaient recueillis dans des bechers de 400 ml, contenant 50 ml de solution de NaOH, 0,75 M; le bout de l'allonge du réfrigérant étant bien au-dessous de la surface de la solution.

À chaque distillat étaient ajoutés 5 ml d'une solution contenant de NH_3 pure, 13 M, et de KI, 0,3 M, avant de procéder au titrage avec une solution titrée d' AgNO_3 , 0,01 N. Le titrage était effectué sur un fond noir, afin de pouvoir bien observer l'opalescence due à la formation d'AgI. Le titrage n'est terminé que lorsque l'opalescence se maintient, même en agitant bien. Un témoin est fait en remplaçant le distillat par de l'eau déminéralisée. La différence de quantité d' AgNO_3 utilisé indique la quantité de cyanure présente dans le distillat; 1 ml d' AgNO_3 , 0,01 N, correspond à 0,54 mg d'HCN.

Les échantillons pesant 27 g, il suffit de multiplier par 20 le nombre de ml d' AgNO_3 utilisé, pour obtenir la teneur en glucoside, exprimée en μg d'HCN par g de matière fraîche.

3.6.3. Détermination de la teneur en glucoside des feuilles, de l'écorce des tiges et des tubercules, et des racines

La méthode employée pour le dosage du cyanure des feuilles, de l'écorce des tiges et des tubercules, et des racines, diffère de celle employée pour les tubercules écorcés par la façon d'échantillonner et de broyer les tissus, par la durée de l'hydrolyse, et par la quantité de distillat recueillie.

Immédiatement après le prélèvement des échantillons, ceux-ci étaient congelés à -15°C ; on peut ainsi les conserver pendant au moins deux mois sans que de pertes importantes se manifestent. Après leur dégel, les tissus étaient coupés en petits morceaux, et des échantillons de 5 g étaient broyés dans un mixer muni d'un réservoir réfrigéré au moyen d'un courant d'eau glacée. Après le broyage, le contenu du réservoir était rincé dans un ballon de 500 ml avec de l'eau réfrigérée; le volume d'eau dans le ballon était établi à 100 ml environ. Les homogénats de feuilles ainsi obtenus doivent être distillés sans retard, pour éviter une déperdition d'HCN (voir 3.7.5.). Les homogénats de l'écorce des tiges et de l'écorce des tubercules étaient distillés après une macération à l'eau pendant 2

² En termes propres il faudrait employer la locution 'entraînement par la vapeur', au lieu de 'distillation à la vapeur'. Néanmoins, celle-ci étant généralement admise par les auteurs d'ouvrages sur la cyanogénèse, nous continuerons à l'employer.

heures à la température du laboratoire (26 °C), ceux des racines non tubéreuses après une macération de 16 à 20 heures à 26 °C.

La quantité de distillat, recueillie lors de la distillation, était de 100 ml, contre 150 ml pour la distillation des homogénats de tubercules écorcés.

Le titrage du cyanure dans les distillats était effectué d'une manière analogue à celle décrite antérieurement (3.6.2.).

3.7. EXPLICATION DE LA MÉTHODE EMPLOYÉE POUR LA DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN GLUCOSIDE CYANOGENÉTIQUE, ET DES EXPÉRIENCES DE MISE AU POINT

3.7.1. *Prélèvement des échantillons*

Comme il sera expliqué en détail au Chapitre 4, la teneur en glucoside non seulement varie de façon importante d'un organe à l'autre, mais encore elle est inégalement répartie à l'intérieur de chaque organe. Si l'on veut arriver à prélever des échantillons représentatifs de certains organes de la plante, il faut bien tenir compte de ces variations. Nous avons l'impression que ceci a été sous-estimé dans certaines expérimentations sur la toxicité du manioc. Par exemple, on peut admettre qu'à cause des grandes différences de la teneur en glucoside des tubercules de la même plante, il ne sera pas suffisant de prélever, comme l'ont fait PEREIRA et al. (1960), un seul tubercule de dimension moyenne. Il sera préférable de faire entrer dans l'échantillon plusieurs, et si possible tous, les tubercules en question.

Mais, puisque les tubercules de manioc sont, en général, très volumineux, il y a intérêt à trouver un moyen de simplifier le prélèvement des échantillons.

Pour obtenir un échantillon représentatif, PEREIRA et GOMES PINTO (1962) partageaient, par des coupes transversales, les tubercules en trois morceaux de longueur égale. Au milieu de chaque morceau, ils coupaient transversalement une tranche de 3 cm d'épaisseur. Les trois tranches étaient broyées et constituaient l'échantillon. En employant cette méthode, nous avons pu constater que l'écart entre la teneur réelle et la teneur ainsi obtenue est faible. Toutefois, s'il faut faire participer chaque tubercule à l'échantillon, ce à quoi nous tenons, mesurer et couper les tubercules sont des actions plus laborieuses que le simple râpage des tubercules entiers.

Afin de réduire la quantité des tubercules à râper nous avons essayé de procéder par des coupes longitudinales. DARJANTO (1952) et DIDIER DE ST AMAND (1960) ont employé cette méthode, sans d'ailleurs en indiquer la précision.

Une expérience sur 12 tubercules écorcés, chacun pesant environ 1 kg, coupés longitudinalement en deux, nous a appris que l'écart entre la teneur en glucoside de chaque moitié était très faible: l'écart moyen absolu était de 3,3 %, le coefficient de variation de 4 %.

Ensuite, nous avons procédé à une expérience portant sur 12 lots de tubercules écorcés, chacun pesant 10 kg environ. Les tubercules de chaque lot furent partagés en deux parties par découpage longitudinal, puis la teneur en glucoside des

parties fut déterminée. L'écart absolu moyen était de 2,7%, le coefficient de variation de 3,6%.

Dans une troisième expérience, portant sur 12 lots de tubercules écorcés, chacun pesant 10 kg environ, nous avons procédé à deux découpages longitudinaux des tubercules, réduisant ainsi la quantité au quart. La teneur en glucoside des quantités réduites fut comparée à la teneur de la quantité entière. L'écart moyen sur les 12 mesures était de 4,8%, le coefficient de variation de 5,8%.

Nous pouvons conclure de ces expériences que le découpage longitudinal des tubercules écorcés est une bonne méthode pour réduire la quantité à râper. La réduction de moitié donne un meilleur résultat que la réduction au quart. Ces résultats nous ont conduit à adopter la méthode de réduction de la quantité de tubercules, décrite dans la section 3.6.2.

La quantité de feuilles à étudier peut être réduite en ne prenant de chaque feuille qu'un seul lobe, puisque la teneur en glucoside est constante dans les différents lobes d'une même feuille (voir 4.2.).

3.7.2. Conservation des échantillons

La nécessité de prélever de nombreux échantillons en même temps, nous a conduit à déterminer une méthode de conservation, et nous nous sommes orientés vers la conservation à basse température.

Des échantillons de 27 g furent prélevés à partir d'une quantité de tubercules écorcés, râpés et bien mélangés, et conservés au réfrigérateur dans des flacons fermés par un bouchon en plastique, à -15°C . La teneur en glucoside fut déterminée après 0, 1, 4, 6 et 13 jours de conservation. Cette expérience fut renouvelée avec des échantillons provenant du même mélange, mais conservés pendant 0, 1, 3 et 10 jours à la température de 2°C . Les résultats de ces expériences (tableau 3) montrent que l'on peut bien conserver les échantillons à -15°C pendant 2 semaines sans risquer de pertes en HCN. Par une autre expérience nous avons trouvé que l'on peut prolonger cette période jusqu'à au moins deux mois, sans risquer de pertes. En revanche, la conservation à 2°C est moins satisfaisante.

TABLEAU 3. Rendement en HCN (μg par g de matière fraîche) des homogénats de tubercules écorcés, en fonction de la durée de conservation, à -15°C , et à $+2^{\circ}\text{C}$ (moyenne de 6 mesures).

Conservation à -15°C			Conservation à 2°C		
durée (jours)	HCN	perte (%)	durée (jours)	HCN	perte (%)
0	184	-	0	180	-
2	182	1	1	176	2
4	182	1	3	171	5
6	186	-1	10	161	9
13	180	2			

Table 3. HCN output (μg per g fresh weight) of homogenates of peeled tuberous roots after different storage times at -15°C and at $+2^{\circ}\text{C}$ (average of 6 observations).

Mais, les pertes n'étant pas très importantes, on peut, à défaut d'un réfrigérateur à basse température, conserver les échantillons des tubercules à 2°C, par exemple en milieu de glace fondante, comme nous l'avons fait au cours de quelques tournées (7.3). Dans ce cas il faut conserver tous les échantillons pendant un même temps à 2°C, puis les réfrigérer à -15°C.

Des échantillons de feuilles, d'écorce des tubercules, et d'écorce des tiges peuvent être conservés à -15°C pendant au moins deux mois sans risquer de pertes importantes en HCN, comme nous l'avons trouvé par une expérience. Cependant il faut éviter de couper les échantillons en morceaux trop petits avant la conservation. Le découpage de ces organes accélère la libération de l'HCN du glucoside, leur activité enzymatique étant très élevée.

BRIESE et COUCH (1938, 1941) ont mis au point une méthode de conservation des homogénats des plantes cyanogénétiques au moyen d'une solution de HgCl₂. L'inconvénient de la méthode est que l'on doit attendre plusieurs semaines avant d'obtenir le résultat des analyses. Nous n'avons pas examiné la possibilité d'appliquer cette méthode au manioc, puisque la conservation de nos échantillons par le froid nous a donné des résultats satisfaisants.

3.7.3. Homogénéisation des tubercules écorcés

Pour vérifier si les tubercules écorcés, seuls organes de la plante à ne pas être broyés au mixer, étaient suffisamment réduits par la râpe, nous avons procédé à l'expérience suivante. Certains échantillons de 27 g de tubercules écorcés et râpés furent homogénéisés au mixer, d'autres non; puis tous furent mis à macérer. Les distillations furent effectuées après 6, 12 et 24 heures. Les résultats (tableau 4) indiquent qu'après homogénéisation, la libération de l'HCN est plus rapide. Mais la quantité récupérée d'HCN est légèrement inférieure à celle du témoin, peut-être à cause de volatilisation accélérée de l'HCN lors du broyage. Donc, on peut en conclure que l'homogénéisation des tubercules par la râpe est suffisante.

TABLEAU 4. Influence de l'homogénéisation au mixer des échantillons de tubercules écorcés et râpés, sur le rendement en HCN (μg par g de matière fraîche) pour trois temps de macération (moyenne de 3 mesures).

Temps de macération (heures)	Échantillons homogénéisés	Témoins
6	180	170
12	209	211
24	207	218

Table 4. Influence of homogenization by a mixer on HCN output (μg per g fresh weight) of samples of peeled and grated tuberous roots for 3 maceration times (average of 3 observations).

3.7.4. Poids des échantillons

Pour la détermination du glucoside des tubercules écorcés, VOISIN (1954) préconise des échantillons pesant 54 g, auxquels 100 ml d'eau doivent être ajoutés. Cependant, à cause de l'agglutination de l'amidon, la matière devient tellement

TABLEAU 5. Rendement en HCN (μg par g de matière fraîche) d'un homogénat de tubercules écorcés en fonction du poids de l'échantillon (moyenne de 5 mesures).

Poids de l'échantillon (g)	10	20	30	40	50
HCN	145	148	149	145	137

Table 5. Relation between sample weight and HCN output (μg per g fresh weight) of a homogenate of peeled tuberous roots (average of 5 observations).

visqueuse que l'on n'obtiendra pas un rendement optimal en HCN. Nous avons procédé à une expérience, comparant le rendement en HCN en fonction du poids de l'échantillon. Nous avons mis à macérer avec 100 ml d'eau, des échantillons, ayant les poids respectifs de 10, 20, 30, 40 et 50 g.

Le rendement en HCN obtenu (tableau 5) ne varie pas beaucoup en fonction du poids de l'échantillon entre 10 et 40 g; en revanche, pour un échantillon de 50 g le rendement est trop bas. Puisque le rendement optimal paraît être obtenu avec des échantillons de 20 et de 30 g, nous avons choisi 27 g comme poids de l'échantillon, donc la moitié de celui préconisé par VOISIN.

Pour vérifier si les échantillons de 27 g menaient bien à des rendements en HCN comparables, nous avons déterminé le rendement en HCN de 18 échantillons, pris dans un homogénat de tubercules écorcés. Nous avons pratiqué trois répétitions, soit une pour chacune des six unités de notre appareil. Cette expérience nous a permis en même temps de vérifier la concordance des résultats obtenus pour les six unités différentes (cf. section 3.7.7.). Les résultats sont groupés dans le tableau 6.

La moyenne des résultats est de 150, l'écart type de 1,95, le coefficient de variation de 1,3%. La concordance de ces résultats est telle que l'on peut en conclure qu'avec des échantillons de 27 g, on obtient des rendements tout à fait comparables. De plus, il est évident que les différentes unités de l'appareil de distillation donnent des résultats égaux.

Nous avons également déterminé quel doit être le poids des échantillons des

TABLEAU 6. Rendement en HCN (μg par g de matière fraîche) des échantillons de 27 g, pris dans un homogénat de tubercules écorcés, obtenus avec les six unités de l'appareil de distillation.

Répétitions	Unités de l'appareil					
	1	2	3	4	5	6
1	151	151	150	150	148	152
2	149	152	148	151	153	149
3	149	151	150	152	145	151
Moyenne	150	151	149	151	149	151

Table 6. HCN output (μg per g fresh weight) of different samples of 27 g of a homogenate of peeled tuberous roots obtained from the six units of the distillation apparatus.

TABLEAU 7. Rendement en HCN (μg par g de matière fraîche) des échantillons de 5 g et de 10 g, pris de la même quantité de feuilles coupées en morceaux.

Répétitions	Poids de l'échantillon	
	5 g	10 g
1	570	571
2	578	564
3	556	570
4	572	540
Moyenne	569	561

Table 7. HCN output (μg per g fresh weight) of samples of 5 g and of 10 g from the same quantity of chopped leaves.

feuilles. Une quantité de feuilles de 150 g fut coupée en morceaux, dont la surface maximale était d'environ 0,5 cm², puis fut déterminée la teneur en glucoside de 4 échantillons de 5 g et de 4 échantillons de 10 g.

Les résultats (tableau 7) indiquent que les échantillons de 5 g, aussi bien que ceux de 10 g, donnent des rendements en HCN assez concordants. En général, nous avons employé des échantillons d'environ 5 g, puisque la capacité du mixer utilisé était inférieure à 10 g.

Le poids des échantillons d'écorce de tubercules et de tiges, ainsi que celui des échantillons de jeunes racines a été fixé également à 5 g environ.

3.7.5. Température et temps de macération

Dans les travaux sur la toxicité du manioc, les auteurs n'emploient pas la même méthode quant à la température et au temps de la macération à l'eau pendant laquelle l'hydrolyse enzymatique se déroule. VOISIN (1954) effectuait la macération à la température ambiante pendant 24 heures, PEREIRA et al. (1960) pendant 1 h 30 à 2 heures. Le Journal Officiel (ANON., 1948) préconise 32° à 34°C pendant 3 heures. WOOD (1965) maintient d'abord une température de 37°C pendant 2 heures, mais ultérieurement (1966), il préconise 37°C pendant 24 heures.

Au début de nos recherches, nous avons effectué la macération des homogénats de tubercules écorcés à la température ambiante, pendant 24 heures, suivant la méthode de VOISIN. Mais il nous a paru tout de même nécessaire d'examiner à quelle température et après combien de temps de macération on obtient un rendement optimal en HCN.

D'abord nous avons effectué une expérience sur le temps de macération à la température ambiante, soit 26°C. La macération fut effectuée pendant respectivement 1, 3, 6, 16, 20, 24, 44 et 68 heures, avec des tubercules du clone Ta 25. Les résultats (tableau 8) indiquent qu'après 24 heures de macération le rendement en HCN n'augmente plus.

Un essai préliminaire sur l'influence de la température, en comparant 26°, 37° et 45°C, a montré que pour un temps de macération de 24 heures, le rende-

TABLEAU 8. Rendement en HCN (μg par g de matière fraîche) d'un homogénat de tubercules écorcés du clone Ta 25, en fonction du temps de macération, à 26°C (moyenne de 6 mesures).

Temps de macération (heures)	1	3	6	16	20	24	44	68
HCN	49	113	187	245	359	375	372	375

Table 8. Relation between maceration time, at 26°C, and HCN output (μg per g fresh weight) of a homogenate of peeled tuberous roots of clone Ta 25 (average of 6 observations).

ment en HCN obtenu à 37°C était supérieur de 2,5% au rendement obtenu à 26° et de 1,5% à celui obtenu à 45°C.

Ensuite nous avons établi le rapport qu'il y a entre le temps de macération et le rendement en HCN à la température de 37°C, ceci avec des homogénats de tubercules écorcés des clones: Tabouca, A 13, Ta 25 et 461. Le tableau 9 groupe les résultats alors que la figure 3 présente les courbes obtenues pour les clones Tabouca et Ta 25. En effectuant la macération à 37°C, l'hydrolyse se déroule plus rapidement qu'à 26°C (cf. tableau 8): pour tous les clones le rendement maximal est déjà atteint après 16 heures.

Ayant établi que la durée de la macération à 37°C doit être de 16 à 20 heures,

Tableau 9. Rendement en HCN (μg par g de matière fraîche) des homogénats de tubercules écorcés de quatre clones, en fonction du temps de macération à 37°C (moyenne de 4 mesures).

Clones	Temps de macération (heures)						
	3	6	9	12	16	20	24
Tabouca	33	37	38	37	38	39	37
A 13	-	-	-	29	30	29	29
Ta 25	94	143	176	195	198	198	197
461	-	-	-	280	281	283	278

Table 9. Relation between maceration time, at 37°C, and HCN output (μg per g fresh weight) of homogenates of peeled tuberous roots of four clones (average of 4 observations).

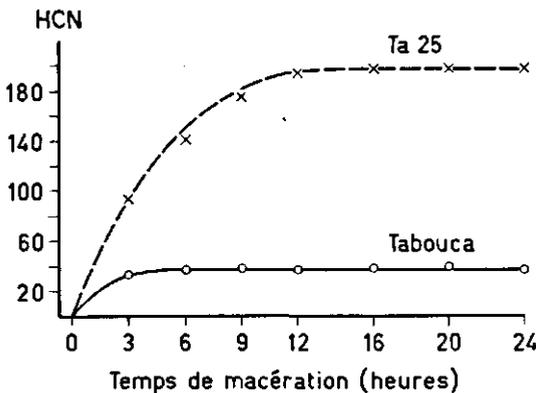


FIG. 3. Rendement en HCN (μg par g de matière fraîche) en fonction du temps de macération, à 37°C, des homogénats de tubercules écorcés des clones Tabouca et Ta 25.

Fig. 3. HCN output (μg per g fresh weight) of homogenates of peeled tuberous roots, as a function of maceration time at 37°C, for clones Tabouca and Ta 25.

TABLEAU 10. Rendement en HCN ($37,5^{\circ}\text{C} = 100$) d'un homogénat de tubercules écorcés, en fonction de la température de macération (moyenne de 6 mesures).

Température	30°	35°	37,5°	40°	45°
HCN	98,4	100,6	100	100,6	96,8

Table 10. Relation between maceration temperature and HCN output ($37,5^{\circ}\text{C} = 100$) of a homogenate of peeled tuberous roots (average of 6 observations).

nous avons procédé à une expérience sur l'influence de la température. En effectuant la macération pendant 18 heures, le rendement en HCN fut déterminé pour les températures de 30, 35, 37,5, 40 et 45°C . Le tableau 10 présente les résultats exprimés par rapport au rendement à $37,5^{\circ}\text{C}$, celui-ci étant fixé à 100. Les résultats mettent en évidence que, sous les présentes conditions de macération, l'influence de la température sur le rendement en HCN n'est pas très importante. On peut tout de même s'attendre à obtenir les meilleurs rendements entre 35° et 40°C ; nous avons choisi 37°C .

Soulignons qu'un temps de macération de 2 heures, que préconise l'A.O.A.C. (HORWITZ, 1965) pour la détermination de la teneur en HCN de plantes cyanogénétiques, ne suffit pas pour les tubercules écorcés (cf. figure 3), comme d'ailleurs, il a déjà été remarqué par JOACHIM et PANDITSEKERE (1944). MONTOYA et al. (1969) ont employé cette méthode, et il est évident que leurs résultats ne sont pas corrects: dans plusieurs cas ces auteurs ont trouvé que la teneur en HCN d'un tubercule entier était supérieure à celles de l'écorce et de la partie centrale du tubercule considérées séparément.

D'une façon analogue à celle employée pour les tubercules écorcés, nous avons essayé d'établir le rapport qu'il y a entre le rendement en HCN des homogénats des feuilles (de Tabouca et de Ta 25) et le temps de macération, la macération étant effectuée à 37°C . La figure 4 présente les résultats graphiquement.

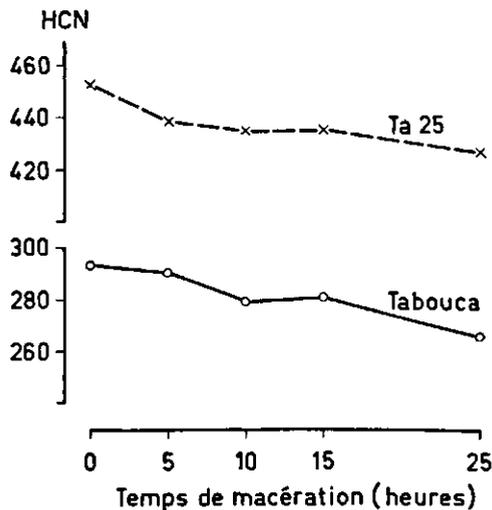


FIG. 4. Rendement en HCN (μg par g de matière fraîche) en fonction du temps de macération, à 37°C , des homogénats de feuilles des clones Tabouca et Ta 25.

Fig. 4. HCN output (μg per g fresh weight) of homogenates of leaves, as a function of maceration time at 37°C , for clones Tabouca and Ta 25.

Il était frappant que, alors que nous nous attendions à un rendement en HCN en relation positive avec le temps de macération, c'est l'inverse qui s'est produit. Pendant la période de macération une quantité d'HCN disparaissait, soit 6% pour Ta 25 et 10% pour Tabouca, en 25 heures. Il y a donc intérêt à effectuer les distillations tout de suite après l'homogénéisation.

Ainsi qu'il sera mis en évidence ultérieurement (11.3.), dans les feuilles, la linamarase a une activité telle qu'en très peu de temps tout le glucoside est hydrolysé, même à basse température.

Pour les homogénats de l'écorce des tubercules, nous avons trouvé qu'au cours d'une période de macération de 18 heures, à la température ambiante (26°C), le rendement en HCN n'augmente ni ne diminue.

Quant aux homogénats de l'écorce des tiges, ils furent mis à macérer pendant 2 heures à la température ambiante, puisque dans quelques cas, l'activité de la linamarase est très faible dans ces tissus (voir 11.3.). Mais nous n'avons jamais obtenu un meilleur rendement en HCN en prolongeant la macération au-delà de 2 heures.

En ce qui concerne les homogénats des racines de jeunes plantes, une expérience nous a appris qu'il faut pratiquer une macération d'au moins 10 heures avant d'effectuer la distillation, pour obtenir un rendement en HCN optimal. Des distillations effectuées après 0, 5, 10, 15 et 20 heures de macération à 26°C, ont donné des rendements respectifs de 35, 61, 63, 62 et 63 µg d'HCN par g de matière fraîche. En général, les distillations étaient effectuées après une macération de 16 à 20 heures, à la température ambiante.

3.7.6. *Action d'un tampon, d'acides dilués, et de l'addition d'enzyme, sur l'hydrolyse*

L'emploi du tampon phosphate pH 6, préconisé par le Journal Officiel (ANON., 1948) pour la macération des homogénats des tubercules écorcés, ne nous a pas donné un rendement en HCN meilleur que celui obtenu en utilisant de l'eau déminéralisée. D'après WOOD (1966) le pH optimal pour l'hydrolyse enzymatique est de 5,5. Nous avons constaté qu'au début de la macération, le pH était de 6,6, alors qu'à la fin il était de 4,3. Or, pendant la macération, il y a une chute du pH, ce qui pourrait expliquer que l'emploi du tampon n'influe pas sur le résultat. Afin de savoir si le tampon accélère l'hydrolyse, nous avons employé de l'eau d'une part et un tampon citrate, 0,1 M, pH 5,5, d'autre part, pour la macération des homogénats de tubercules écorcés, pendant 0 h 30, 2 h 30, et 17 heures, à 37°C. Les rendements en HCN étaient tout à fait identiques pour les deux séries, donc, l'emploi d'un tampon citrate ne semble avoir aucune influence sur le rendement en HCN.

On pourrait présumer que l'addition d'acide avant la distillation faciliterait le dégagement d'HCN du milieu. Néanmoins, en additionnant 10 ml, 0,4 N, des acides H₂SO₄, HCl, HNO₃ et CH₃COOH, au début de la distillation, nous n'avons pu constater aucune action favorable sur le rendement en HCN des homogénats de tubercules écorcés. Au contraire, l'addition des acides provoque un état légèrement trouble des distillats, ce qui rend difficile la perception du vira-

ge, lors du titrage. VOISIN (1953), lui aussi, affirme que l'addition des acides dilués n'augmente point le rendement en HCN.

L'addition d'acide avant que l'hydrolyse soit terminée, paraît avoir un effet nuisible sur le rendement en HCN. En employant une solution d' H_2SO_4 , 0,1 N, au lieu de l'eau, pour la macération, nous avons constaté une diminution du rendement de 84 % pour les homogénats de tubercules écorcés, et de 48 % pour ceux de feuilles. WOOD (1966) a constaté que 40–50 % du glucoside sont hydrolysés sous l'action d' H_2SO_4 , 1 N. En revanche, d'après JOACHIM et PANDITTESEKERE (1944), l'emploi d'une solution d' H_2SO_4 , 10 %, a un effet favorable sur le rendement en HCN.

Afin de vérifier si tout le glucoside est décomposé pendant la macération à l'eau, nous avons ajouté à différents homogénats, après distillation et réfrigération, une quantité d'extrait d'enzyme, préparé à partir de jeunes feuilles de manioc; puis nous avons effectué une nouvelle distillation après 8 heures. Il s'agissait d'homogénats de feuilles, de tubercules écorcés, et d'écorce de tubercules, contenant une quantité élevée d'HCN. Dans n'aucun cas l'addition d'enzyme ne provoquait la libération d'une nouvelle quantité d'HCN. Il apparaît donc que tout le glucoside est décomposé lors de la macération, à condition que celle-ci soit prolongée suffisamment longtemps.

Comme il sera expliqué en détail plus tard (12.4.) l'addition d'un extrait d'enzyme de certains tissus du manioc, notamment des feuilles, peut accélérer l'hydrolyse du glucoside dans les tubercules écorcés. Nous ne pouvons pas fournir des indications prouvant que l'addition d'enzyme puisse augmenter sensiblement le rendement en HCN.

Il a été souligné antérieurement (2.2.) que l'émulsine d'amande ne provoque pas l'hydrolyse du glucoside du manioc.

JOACHIM et PANDITTESEKERE (1944) distinguaient de l'HCN 'autolytique' et de l'HCN 'hydrolysable', l'HCN 'autolytique' étant la quantité d'HCN libérée par la linamarase endogène des tubercules au cours d'une période de deux heures, et l'HCN 'hydrolysable' étant la quantité d'HCN libérée après cette période de 2 heures sous l'action de l'enzyme endogène ou d'acide additionné. Cette distinction nous paraît trop artificielle et sans importance. La quantité d'HCN libérée au cours d'une macération de 2 heures dépend largement de l'activité de la linamarase dans l'homogénat. De plus, nous tenons à ce que tout le glucoside dans les homogénats des tissus du manioc soit hydrolysé sous l'action de l'enzyme endogène si l'on prolonge suffisamment longtemps la macération.

3.7.7. *Entraînement de l'acide cyanhydrique libéré*

DILLEMANN (1953) présente une revue claire des méthodes pour transporter l'HCN de l'homogénat vers une solution de lessive de soude dans laquelle le dosage peut être effectué. Pour certaines plantes la distillation donne de meilleurs résultats, pour d'autres il est préférable d'entraîner l'HCN par un courant d'air ou d'azote. Quant à la distillation, la plupart des auteurs préfèrent la distillation à la vapeur à la distillation normale. Pour le manioc, la méthode classique pour entraîner l'HCN de l'homogénat de tubercules écorcés est la distilla-

tion. Nous avons préféré la distillation à la vapeur. Cette méthode est plus commode que la distillation normale, et les résultats sont plus reproductibles. Une comparaison des rendements en HCN obtenus à partir d'échantillons de tubercules écorcés par la distillation à la vapeur, avec ceux obtenus par l'entraînement de l'HCN par un courant d'air (60 litres/heure) pendant 20 heures, nous a appris que la distillation mène à des rendements supérieurs de 10 à 20%. De plus, parce que la solution dans laquelle l'HCN est retenu après l'entraînement par l'air prend une teinte légèrement brunâtre lors du titrage avec l'AgNO₃, nous avons abandonné cette méthode, puis, employé dans tous les cas la méthode de la distillation à la vapeur.

L'appareil de distillation comprenait 6 unités en verre Quickfit. La vapeur, fournie par un autocuiseur, était transportée par un conduit ayant six dérivations, et répartie sur les 6 unités, de telle sorte que la vitesse de distillation était la même pour chaque unité. Le fonctionnement de l'appareil fut contrôlé par la distillation de solutions contenant 13 mg de KCN après l'addition d'une certaine quantité d'acide. Dans 100 ml du distillat, en moyenne sur les 6 unités, 99,8% du cyanure fut récupéré. Les écarts dans les résultats des unités différentes étaient négligeables, le coefficient de variation étant de 0,8%. Il a déjà été indiqué antérieurement (tableau 6, page 20) que les résultats obtenus avec les six unités de l'appareil sont comparables.

Il s'est avéré très important que, pour les distillations des homogénats de tubercules écorcés, la sortie du tube d'alimentation de la vapeur soit bien placée, afin d'obtenir un brassage optimal du liquide visqueux; pour notre appareil la sortie du tube était placée à 4 mm du fond du ballon. Le brassage du liquide était bon, et presque tout l'HCN fut recueilli dans les premiers 100 ml du distillat. Pour plus de sûreté nous avons recueilli 150 ml de distillat. Dans la fraction de 150 à 300 ml du distillat, nous n'avons jamais trouvé plus d'un pour cent de la quantité d'HCN présente dans la fraction de 0 à 150 ml.

Lors de la distillation, la quantité de liquide dans les ballons augmenta de 150 ml environ. Ceci n'avait pas d'effet nuisible, le liquide étant rendu moins visqueux.

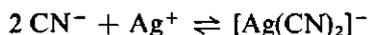
La distillation des homogénats des feuilles, de l'écorce des tubercules et des tiges, et des racines non tubéreuses, se déroule plus rapidement que celles des homogénats des tubercules écorcés, les liquides étant beaucoup moins visqueux. Ainsi, il suffit de ne recueillir que les premiers 100 ml du distillat, ceux-ci contenant pratiquement tout l'HCN libérable.

Les distillations furent donc poursuivies jusqu'à ce qu'une certaine quantité de distillat fut obtenue, sans tenir compte de la durée. Les bechers étaient marqués d'un trait au niveau souhaité, soit 200 ml ou 150 ml. Un léger écart avec la quantité de distillat prévue n'influe pas sur les résultats.

Un délai de quelques heures entre la distillation et le titrage n'a aucun effet nuisible sur le rendement en HCN. Une expérience, répétée trois fois, nous a appris que des distillats contenant 0,285 meq de CN⁻ tout de suite après la distillation, contenaient encore 0,282 meq 7 heures après, ce qui ne représentait donc qu'un écart d'un pour cent.

3.7.8. Dosage du cyanure

La méthode la plus employée pour le dosage du CN^- dans des distillats de manioc est celle de LIEBIG (1851), améliorée par DENIGÈS (1893); nous avons adopté cette méthode. Nous avons suivi le protocole de VOISIN (1954), à quelques modifications près. Pour les concentrations des solutions à employer, nous avons suivi le protocole de KOLTHOFF et STENGER (1947). La réaction principale est la suivante:



L'ion complexe $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ tend à se combiner avec l'ion Ag^+ pour former un précipité d' AgCN ; mais ce précipité ne se forme pas dans un milieu ammoniacal. La fin de la réaction est atteinte lorsque tous les ions CN^- ont été liés. Dès lors, le surplus d' Ag^+ se combine avec les ions I^- , de l'indicateur KI, et l' AgI rend la solution opalescente.

Un avantage important de la méthode est sa simplicité. Un désavantage en est la sensibilité assez réduite: il faut additionner de l' AgNO_3 en excès pour voir le virage. On peut bien corriger cela en effectuant un titrage témoin. L'erreur maximale correspondra à une goutte d' AgNO_3 , 0,01 N, donc à 0,0008 meq de CN^- , à peu près. Nos distillats contenaient, en général, de 0,03 à 0,60 meq de CN^- . Etant donné que pour nos distillats une très grande précision dans le dosage du CN^- n'avait pas de valeur réelle, à cause des grandes variations de la teneur en glucoside, nous avons jugé tout à fait justifié l'emploi de la méthode LIEBIG-DENIGÈS. Pourtant, pour déterminer des quantités de CN^- inférieures à 0,03 meq, il est préférable d'employer une méthode plus sensible.

DE WAAL (1942) employait, pour le dosage de très petites quantités de CN^- dans des distillats de feuilles du trèfle blanc, une modification de la méthode bromométrique de SCHULEK (1923). Cette méthode serait plus spécifique que celle de LIEBIG-DENIGÈS, et sa sensibilité est plus grande. Elle permet de déterminer des quantités de 0,0004 à 0,1500 meq de CN^- dans 50 ml de solution. La méthode de SCHULEK se résume comme suit: à 50 ml de distillat on ajoute 5 ml d' H_3PO_4 20%, puis une solution de brome en excès. L'excès de brome est supprimé par l'addition de 2 ml de phénol 5%. Après 15 minutes on ajoute 0,5 g de KI, puis on garde la solution dans l'obscurité pendant une demi-heure, après quoi le titrage est effectué avec une solution titrée de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,01 N, en utilisant l'amidon comme indicateur; 1 ml de l' $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,01 N, correspond à 0,005 meq de CN^- . Nous avons comparé les rendements en HCN obtenus à partir des mêmes distillats en employant les deux méthodes. Il s'agissait de 12 distillats d'homogénats de tubercules écorcés et de 16 distillats de feuilles. Les résultats moyens obtenus par les deux méthodes étaient presque identiques, et l'on pouvait conclure que la méthode LIEBIG-DENIGÈS donne des valeurs à peine plus élevées que celle de SCHULEK. La différence était, en moyenne sur les 28 distillats, de 0,0008 meq de CN^- . Il est évident qu'une telle différence n'a d'importance que pour des teneurs en CN^- très basses, ce qui, en général, n'était pas le cas pour nos distillats.

Une autre méthode, qui a été souvent employée pour déterminer la teneur en HCN des tissus de plantes, est celle au papier picro-sodé, aussi dénommée méthode de GUIGNARD; DILLEMANN (1953) donne une discussion là-dessus. La méthode repose sur la qualité que possède l'acide picrique de former, en milieu alcalin, avec le cyanure, même en quantité extrêmement faible, de l'acide purpurique, dont la couleur est d'un rouge intense. GUIGNARD (1906), pour déceler l'HCN dans le *Phaseolus lunatus*, a été le premier à utiliser cette réaction dans les tissus végétaux. Mais cette réaction n'est pas spécifique pour le cyanure: les aldéhydes, l'acétone et l'acide sulfhydrique donnent la même couleur (CHARLOT, 1964). KOCH (1933) et BOLHUIS (1952) ont employé la méthode de GUIGNARD dans leurs travaux de sélection du manioc, afin d'obtenir une idée globale de la toxicité de leurs plantes. À partir de cette méthode, DIDIER DE ST AMAND (1960) et, récemment, INDIRA et SINHA (1969), ont mis au point des méthodes rapides de dosage colorimétrique du cyanure dans les tissus du manioc, sans toutefois indiquer dans quelle mesure leurs résultats correspondent avec ceux obtenus par la méthode classique. WOOD (1965) a employé la méthode de GUIGNARD pour doser le cyanure dans les distillats de tubercules du manioc, apparemment avec succès. Toutefois, l'emploi de cette méthode serait plus avantageuse si elle permettait de supprimer la distillation laborieuse.

Pour plus de sûreté nous avons préféré la méthode de LIEBIG-DENIGÈS à la méthode de GUIGNARD. Tout de même, nous admettons qu'à certaines fins, cette dernière est préférable. Ainsi nous l'avons employée dans nos recherches sur l'activité de la linamarase dans le manioc (11.2.).

3.7.9. Pertes en cyanure

La situation idéale serait que tout le glucoside présent dans un échantillon de tissu de la plante, soit scindé lors du broyage et de la macération, et que tout l'HCN formé soit libérable de l'homogénat et entraîné dans le distillat où l'on pourrait le doser. Mais il est fort probable que cette situation ne se présente jamais.

Dès que les tissus sont froissés, l'hydrolyse enzymatique commence et une partie de l'HCN ainsi formé disparaît si l'on ne prend pas des précautions rigoureuses.

Les pertes pendant le broyage et la pesée des échantillons de tubercules écorchés ne sont pas importantes. Une expérience nous a appris que de tels échantillons, gardés dans des boîtes de Pétri ouvertes pendant 0, 15, 30, 45, 75 et 105 minutes, puis que l'on a fait macérer et que l'on a distillé, donnaient des rendements respectifs de 217, 217, 216, 212, 209 et 208 μg d'HCN par g de matière fraîche. Donc, en effectuant les pesées immédiatement après le râpage, on ne risque pas de pertes importantes en HCN.

Pendant l'homogénéisation des échantillons des feuilles et de l'écorce, il y a aussi une déperdition de l'HCN, mais celle-ci n'est pas très importante, à condition que l'on effectue les manipulations très vite et à basse température. L'homogénéisation au mixer limite les pertes puisque la durée est très limitée. Le rendement en HCN des feuilles broyées dans un mortier à la température ambiante

(26°C) était inférieur de 13% à celui obtenu par homogénéisation au mixer à basse température. En effectuant le broyage au mortier dans une chambre froide (2°C) le rendement en HCN baissait de 5% par rapport à l'homogénéisation au mixer.

En dehors des pertes causées par la volatilisation de l'HCN, des pertes importantes peuvent se présenter par blocage des ions de CN^- par des substances dont on connaît mal la nature, se trouvant ou se développant dans l'homogénéat des tissus. D'après PULSS (1962) ces pertes augmentent avec l'âge des organes. La revue bibliographique de DILLEMANN (1953) nous apprend que ce blocage de l'HCN peut se produire aussi bien chez des plantes cyanogénétiques que chez d'autres, non cyanogénétiques. DILLEMANN (1953) affirme que pour certaines espèces de *Linaria*, la disparition de l'HCN était beaucoup moins importante après la cuisson des tissus.

Nous n'avons pas constaté une diminution importante du rendement en HCN en prolongeant la macération des homogénats de tubercules écorcés, une fois le rendement maximal atteint (cf. tableau 8, page 22). Toutefois, il est possible qu'une certaine quantité d'HCN ait été bloquée auparavant. En revanche, nous nous rappellerons que lors de la macération des homogénats de feuilles, le rendement en HCN diminuait (figure 4, page 23).

Nous nous sommes livrés à une expérience prouvant que le rendement en HCN des homogénats de tubercules écorcés dépend de la quantité d'HCN libérable. Nous avons ajouté à de tels homogénats, capables de libérer 0,194 meq de CN^- , des quantités respectives de 0, 1, 2 et 3 ml d'une solution de KCN, 0,1 M, au début de la macération, qui fut effectuée pendant 18 heures à 37°C. Les résultats (tableau 11) montrent que le rendement en HCN diminue au fur et à mesure que l'on ajoute de KCN.

Lors d'une autre expérience, nous avons ajouté à des homogénats de tubercules écorcés, capables de libérer 0,267 meq de CN^- , une solution de KCN contenant 0,170 meq de CN^- , d'une part au début, et d'autre part à la fin de la macération. Le rendement attendu est donc de 0,437 meq de CN^- . Nous avons dosé 0,398 meq de CN^- dans les distillats des homogénats où le KCN a été

TABLEAU 11. Diminution du rendement en HCN (meq de CN^-) d'un homogénéat de tubercules écorcés, en fonction de la quantité de KCN ajouté avant la macération.

Rendement	meq de CN^- ajoutés:		
	0,100	0,200	0,300
Témoin	0,194	0,194	0,194
Attendu	0,294	0,394	0,494
Obtenu	0,291	0,362	0,438
Perte	0,003	0,032	0,056

Table 11. Reduction of HCN output (meq CN^-) of a homogenate of peeled tuberous roots, due to addition of KCN before maceration.

ajouté au début de la macération, et 0,426 meq dans ceux où le KCN a été ajouté peu avant la distillation; les pertes s'élèvent donc respectivement à 0,039 et à 0,011 meq de CN^- . Il y a une perte en CN^- dans les deux cas, mais celle-ci est plus élevée quand on ajoute le KCN au début de la macération. On pourrait donc conclure que non seulement l'hydrolyse enzymatique se déroule moins facilement à mesure que la teneur en CN^- dans l'homogénat est plus élevée, mais encore que l'homogénat est capable de bloquer une partie du CN^- libéré, si toutefois la potasse n'intervient pas.

On voit, par ce qui précède, qu'il faut être très prudent face à l'affirmation selon laquelle le rendement en CN^- dosé dans les distillats correspond à la teneur en glucoside des tissus initiaux.

Pourtant, on peut admettre que la teneur en glucoside, déterminée par la voie du dosage du cyanure dans le distillat, est un élément de comparaison satisfaisant, si l'on effectue les manipulations en respectant toujours le même protocole.

4. RÉPARTITION DU GLUCOSIDE DANS LA PLANTE

4.1. INTRODUCTION

Il est bien connu que les glucosides cyanogénétiques ne sont pas uniformément répartis dans les divers organes de la plante. DILLEMANN (1958) mentionne que les feuilles et, d'une façon générale, les tissus chlorophylliens sont les organes les plus constamment pourvus de composés cyanogénétiques. Déjà TREUB (1910) a remarqué que l'HCN se montre là où il y a formation de substances protéiques, ce qui, d'ailleurs, correspond à son hypothèse que l'HCN serait 'le premier produit reconnaissable de l'assimilation de l'azote' (1896, 1910). WILLAMAN et WEST (1915) concluent que les glucosides cyanogénétiques doivent être liés aux processus vitaux de la plante, puisqu'on les trouve dans les parties de la plante là où l'activité photosynthétique est la plus importante, et pendant les périodes où la plante se développe le plus rapidement. D'une façon générale, c'est dans les jeunes feuilles que la teneur en glucoside cyanogénétique est la plus élevée.

Pour le manioc la répartition du glucoside cyanogénétique dans la plante n'a pas été étudiée de façon rigoureuse. Les données les plus complètes sur les organes des mêmes plantes sont celles de COLLENS (1915). Il est évident que pour déterminer la teneur en glucoside des organes de la plante, il faut savoir prélever des échantillons représentatifs; une connaissance de la répartition du glucoside dans ces organes est donc nécessaire. C'est pour cette raison que, au début, nous avons procédé à la recherche de la répartition du glucoside dans la plante, surtout dans les tubercules écorcés, mais également dans les feuilles et dans l'écorce des tubercules et des tiges.

Dans les trois sections suivantes nous considérons la répartition du glucoside dans les feuilles et dans les fruits (4.2.), dans l'écorce des tiges (4.3.), et dans les tubercules (4.4.). Dans la section 4.5. nous présenterons des données sur la répartition du glucoside dans différents organes de la même plante. Dans la section 4.6., le rapport entre la teneur en glucoside des feuilles et celle des tubercules écorcés des mêmes plantes sera considéré pour un grand nombre de clones, ayant des degrés de toxicité différents. Nous terminerons ce chapitre en présentant une discussion sur les résultats, et en avançant une hypothèse relative au caractère cyanogénétique du manioc (4.7.).

4.2. RÉPARTITION DU GLUCOSIDE DANS LES FEUILLES ET DANS LES FRUITS

TREUB (1907) fut probablement le premier à démontrer que dans le manioc, les jeunes feuilles sont beaucoup plus riches en glucoside cyanogénétique que les feuilles plus âgées, ce qui a été confirmé par plusieurs auteurs. Nous avons pu constater le même phénomène. Mais, pour les limbes et les pétioles des feuilles,

nous avons procédé à des prélèvements séparés, ce qui a révélé que l'évolution de la teneur en glucoside en fonction de l'âge n'est pas la même pour les deux parties de la feuille. Nous avons effectué nos prélèvements sur des feuilles aux stades suivants:

- très jeunes, près du point végétatif;
- jeunes adultes (feuilles venant d'atteindre la taille normale);
- plus âgées, à peu près à mi-chemin entre les feuilles précédentes et les feuilles basales.

Notre expérience portait sur quatre clones. Pour chaque clone, les échantillons furent constitués par des feuilles de six plantes.

Le tableau 12 groupe les résultats; la teneur en glucoside est exprimée par rapport au poids frais et au poids sec. Ces résultats montrent que, dans les feuilles très jeunes, la teneur en glucoside des pétioles est beaucoup plus élevée que celle des limbes, alors que dans les feuilles plus âgées c'est l'inverse qui se présente. Dans les pétioles la teneur en glucoside diminue en fonction de l'âge des feuilles; en revanche, pour les limbes on voit que la teneur dans les feuilles très jeunes est plus basse que dans celles jeunes adultes.

WILLAMAN et WEST (1915) ont démontré que dans les très jeunes plantes de sorgho, la teneur en glucoside des tiges est plus élevée que celle des feuilles. La teneur des tiges y diminue en fonction de l'âge de la plante. En revanche, la teneur en glucoside des feuilles augmente dans les premières phases du développement, et diminue plus tard en fonction de l'âge. On peut admettre que nos

TABLEAU 12. Teneur en glucoside (en μg d'HCN par g des matières fraîche et sèche) des limbes et des pétioles de feuilles, en fonction de l'âge, pour quatre clones.

Clones	Age des feuilles	HCN par rapport au poids frais		HCN par rapport au poids sec	
		limbes	pétioles	limbes	pétioles
Tabouca	très jeunes	190	420	1200	4500
	jeunes adultes	440	230	2000	2000
	plus âgées	290	65	1150	450
A 13	très jeunes	360	590	2000	5800
	jeunes adultes	500	460	2100	3100
	plus âgées	240	90	900	600
Ta 25	très jeunes	570	560	3300	6400
	jeunes adultes	770	360	3200	2700
	plus âgées	650	250	2500	1400
461	très jeunes	340	770	1950	6800
	jeunes adultes	980	710	4000	5500
	plus âgées	760	430	2900	2900

Table 12. Relation between age and glucoside concentration (μg HCN per g fresh and dry weight) in leaf blades and leaf stalks of four clones.

résultats pour le manioc correspondent bien avec ceux de WILLAMAN et WEST pour le sorgho, à condition de pouvoir comparer respectivement les feuilles et les tiges du sorgho aux limbes et aux pétioles des feuilles du manioc.

En ce qui concerne la répartition du glucoside dans les folioles des feuilles du manioc, nous pouvons confirmer l'expérience de DIDIER DE ST AMAND (1960) selon laquelle dans une même feuille la teneur en glucoside est rigoureusement identique pour les différentes folioles.

Quant à la teneur en glucoside des fruits, par rapport à leur poids frais, DIDIER DE ST AMAND (1960) a trouvé de 10 à 100 μg d'HCN par g dans 13 clones. NARTEY (1968) a pu en libérer de 0 à 8 $\mu\text{g}/\text{g}$ dans des graines mûres de 3 clones. Nous en avons décelé des quantités de 320 à 1220 $\mu\text{g}/\text{g}$ dans l'exocarpe des fruits verts de 4 clones. Dans des graines pas encore mûres nous avons pu en libérer 110 $\mu\text{g}/\text{g}$, contre 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ dans des graines mûres.

4.3. RÉPARTITION DU GLUCOSIDE DANS L'ÉCORCE DES TIGES

Dans l'écorce des tiges de plantes âgées de 10 mois, la teneur en glucoside fut déterminée à trois niveaux de la tige dépourvue de feuilles:

- à 25 cm au-dessous de la feuille la plus âgée;
- à la partie médiane;
- à 10 cm au-dessus de la bouture originale.

L'expérience a porté sur six clones. Le tableau 13 groupe les résultats, par rapport au poids frais; la teneur en eau dans l'écorce des tiges se montrait peu variable en fonction de la hauteur.

Nous voyons que la teneur en glucoside de l'écorce augmente de haut en bas sur la tige pour tous les clones. Seulement, en effectuant des expériences plus détaillées, nous avons mis en évidence que là où les feuilles sont encore présentes, la teneur dans l'écorce est plus élevée qu'un peu plus bas. Donc, en descendant, la teneur diminue d'abord pour atteindre un minimum, puis, elle augmente de façon importante pour atteindre le maximum tout à fait au bas de la tige. Ces résultats sont présentés dans les tableaux 20 (page 39) et 21 (page 40).

Nous avons comparé la teneur en glucoside de l'écorce avec celle du bois au même endroit, dans des tiges des clones Tabouca et Ta 25. Sur des plantes âgées de 11 mois, nous avons coupé un morceau de tige juste au-dessous des feuilles

TABLEAU 13. Teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière fraîche) dans l'écorce des tiges à différentes hauteurs (partie privée de feuilles), pour six clones.

	Clones					
	Tabouca	A 13	Ta 25	461	469	524
En haut	100	290	400	310	140	250
Au milieu	140	670	560	350	260	340
En bas	470	950	1030	480	550	360

Table 13. Glucoside concentration (μg HCN per g fresh weight) at different heights in the stem bark (leafless part) of six clones.

TABLEAU 14. Teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière fraîche) dans l'écorce et le bois, en haut (au-dessous des feuilles) et au bas de la tige, des clones Tabouca et Ta25.

	Tabouca		Ta 25	
	écorce	bois	écorce	bois
En haut	70	110	390	180
Au bas	340	150	820	185

Table 14. Glucoside concentration (μg HCN per g fresh weight) in bark and wood at upper and lower end of the stem (leafless part) of clones Tabouca and Ta 25.

basales, et un autre tout à fait en bas. Puis nous avons constitué un échantillon de l'écorce et un du bois pour chacun des deux endroits; les échantillons représentaient la moyenne de 5 tiges par clone. Pour faciliter l'homogénéisation, les échantillons furent congelés avant d'être broyés. Le tableau 14 présente la teneur en glucoside des échantillons; pour ces échantillons, l'activité de la linamarase a aussi été déterminée, et les résultats figurent dans le tableau 50, (page 104). Le tableau 14 montre que la différence importante entre la teneur en glucoside dans l'écorce entre le haut et le bas de la tige, ne se manifeste pas dans le bois, aux mêmes endroits; par conséquent, la différence entre la teneur de l'écorce et celle du bois est beaucoup plus élevée au bas de la tige qu'en haut.

4.4. RÉPARTITION DU GLUCOSIDE DANS LES TUBERCULES

4.4.1. Teneur en glucoside dans différents tubercules de la même plante

En étudiant la variation de la teneur en glucoside entre les tubercules de la même plante, nous nous sommes bornés aux tubercules écorcés. Le tableau 15

TABLEAU 15. Poids (g) et teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière fraîche) des différents tubercules écorcés de 3 plantes du clone Tabouca et 3 du clone Ta 25.

Tabouca						Ta 25					
1		2		3		1		2		3	
poids	HCN	poids	HCN	poids	HCN	poids	HCN	poids	HCN	poids	HCN
415	38	510	52	530	19	2360	300	1690	135	1015	265
390	36	460	47	485	51	2260	235	850	170	840	265
325	31	410	45	420	40	1640	510	790	195	610	165
250	31	362	42	385	46	1290	370	690	330	445	250
225	46	115	33	370	35	1215	235	450	185	340	180
220	31	95	37	185	34	805	330	180	220	285	155
150	34	50	31	65	30	185	205	175	255		
105	33					165	230				

Table 15. Weight (g) and glucoside concentration (μg HCN per g fresh weight) in each of the peeled tuberous roots of 3 plants of Tabouca and 3 of Ta 25.

présente pour 6 plantes, dont 3 du clone Tabouca et 3 de Ta 25, la teneur en glucoside des différents tubercules, ainsi que le poids de ceux-ci. Nous voyons que les variations peuvent être importantes; elles sont en général tellement élevées, que ce serait une source d'erreurs trop importante pour ne pas en tenir compte lors du prélèvement des échantillons.

Ces résultats ne permettent pas de conclure qu'il existe un rapport entre le poids du tubercule et sa teneur en glucoside, comme l'ont suggéré quelques auteurs, dont, d'ailleurs, les résultats sont contradictoires. D'après MOORE (1906), les petits tubercules sont plus toxiques que les grands. GREENSTREET et LAMBOURNE (1933) ont trouvé des teneurs en glucoside respectives de 150, 170 et 120 μg d'HCN par g de matière fraîche dans des tubercules petits, moyens et grands, du même clone. DARJANTO (1952) a trouvé pour le clone Mangi, des teneurs de 95, 98 et 128 dans des tubercules petits, moyens et grands.

À notre tour nous avons procédé à une expérience sur la largeur des tubercules: sur dix plantes du même clone, nous avons pris 20 tubercules, à raison de 2 par plante, un grand et un petit. Sur l'ensemble des grands tubercules, ainsi que sur celui des petits, la teneur en glucoside fut déterminée. Cette expérience fut ré-

TABLEAU 16. Teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière sèche) de la partie centrale de grands et de petits tubercules des clones Tabouca, A 13, Ta 25, et 461 (3 répétitions).

	Tabouca				A 13			
	poids frais moyen (g)		glucoside		poids frais moyen (g)		glucoside	
	pet.t.	gr.t.	pet.t.	gr.t.	pet.t.	gr.t.	pet.t.	gr.t.
1	400	1270	115	170	410	1240	160	130
2	340	1140	155	170	380	1400	155	175
3	310	1020	130	190	260	1210	120	105
Moyenne	350	1140	133	176	350	1280	145	137
Indice			100	132			100	94

	Ta 25				461			
	poids frais moyen (g)		glucoside		poids frais moyen (g)		glucoside	
	pet.t.	gr.t.	pet.t.	gr.t.	pet.t.	gr.t.	pet.t.	gr.t.
1	560	1580	870	930	330	1330	560	700
2	500	1470	1100	1110	430	1830	480	570
3	440	1210	640	680	500	2410	610	590
Moyenne	500	1420	872	906	420	1850	549	619
Indice			100	104			100	113

Table 16. Glucoside concentration (μg HCN per g dry weight) in the inner part of big and small tuberous roots of clones Tabouca, A 13, Ta 25 and 461 (3 repetitions).

pétée trois fois pour chacun des clones: Tabouca, A 13, Ta 25 et 461. Les résultats (tableau 16) sont assez variables et ne permettent guère de supposer que la teneur en glucoside est en relation avec la largeur des tubercules: ce n'est que pour le seul clone Tabouca que les grands tubercules apparaissent avec évidence plus toxiques que les petits.

La variation de la teneur en glucoside des différents tubercules de la même plante pourrait être en rapport avec une différence de l'activité métabolique des tubercules, peut-être due à la disponibilité en éléments nutritifs, disponibilité qui peut être assez différente pour les tubercules dans un sol peu homogène.

4.4.2. Répartition à l'intérieur des tubercules

4.4.2.1. Comparaison de la teneur de l'écorce et de la partie centrale

Il est généralement reconnu que l'écorce des tubercules est plus riche en glucoside que la partie interne. Probablement c'est CARMODY (1900) qui a signalé pour la première fois que la différence de teneur en glucoside entre l'écorce et la partie centrale est beaucoup plus grande pour les tubercules des clones 'doux' que pour ceux des clones 'amers', conclusion qui a été confirmée par plusieurs auteurs. Les résultats de CARMODY indiquent que, en ce qui concerne la teneur en glucoside de l'écorce des tubercules, il n'y a pas de grande différence entre les clones 'doux' et les clones 'amers'. Les résultats moyens de CARMODY sont groupés dans le tableau 17. Nous les avons comparés aux résultats de GREENSTREET et LAMBOURNE (1933), et à ceux de notre propre expérience.

GREENSTREET et LAMBOURNE ont déterminé la teneur en glucoside de l'écorce et de la partie centrale de 49 clones. Nous avons choisi, parmi ces 49 clones, les 10 clones dont la teneur de la partie centrale était la moins élevée et les 10 clones dont cette teneur était la plus élevée; les moyennes de la teneur en glucoside de l'écorce et de la partie centrale des tubercules, pour les deux groupes de 10 clones figurent dans le tableau 17.

Nous avons choisi 8 clones à tubercules peu toxiques, et 8 clones à tubercules très toxiques dans la collection de manioc de l'O.R.S.T.O.M. à Adiopodoumé. De ces clones nous avons déterminé la teneur en glucoside de l'écorce de la partie centrale des tubercules; pour chaque clone, l'échantillon fut prélevé de 6 plantes. Les résultats moyens sont groupés dans le tableau 17; les teneurs pour les clones individuels figurent dans le tableau 51 (page 105).

La teneur en glucoside de la partie centrale des tubercules correspond assez bien pour les trois expériences; pour les clones très toxiques cette teneur est à peu près quatre fois plus élevée que celle des clones peu toxiques. Mais, en ce qui concerne l'écorce des tubercules, nous avons trouvé pour les clones de l'O.R.S.T.O.M. des teneurs beaucoup plus élevées que les autres auteurs. Bien qu'il soit possible que le caractère des clones, ou la différence des conditions écologiques aient causé cette discordance, nous supposons que la méthode de détermination de la teneur en glucoside dans l'écorce a joué un rôle. Notamment la teneur de l'écorce des tubercules des clones très toxiques de CARMODY nous paraît trop basse. Quoi qu'il en soit, il est bien possible de comparer les clones dont la teneur en glucoside a été déterminée de la même façon.

TABLEAU 17. Teneur en glucoside moyenne (en μg d'HCN par g de matière fraîche) de l'écorce et de la partie centrale des tubercules de clones à tubercules peu toxiques et de clones à tubercules très toxiques, pour des clones de CARMODY (1900), de GREENSTREET et LAMBOURNE (1933), et de la collection de l'O.R.S.T.O.M.

	Clones peu toxiques			Clones très toxiques		
	écorce	partie centrale	quotient ec./p.c.	écorce	partie centrale	quotient ec./p.c.
Moyenne de 12 clones de CARMODY	300	70	4,3	210	230	0,9
Indice	100	100		70	330	
Moyenne de 10 clones de GREENSTREET et L.	270	49	5,5	350	220	1,6
Indice	100	100		130	450	
Moyenne de 8 clones de l'O.R.S.T.O.M.	690	73	9,5	840	330	2,6
Indice	100	100		120	450	

Table 17. Average glucoside concentration (μg per g fresh weight) in bark and inner part of tuberos roots of less toxic and very toxic clones, of CARMODY (1900), of GREENSTREET and LAMBOURNE (1933) and of the O.R.S.T.O.M. collection.

En comparant les clones peu toxiques et très toxiques, nous pouvons tirer la même conclusion pour les trois expériences. En effet, nous voyons que la teneur en glucoside de l'écorce des tubercules des clones, classifiés comme 'très toxiques' en raison de la teneur en glucoside de la partie centrale des tubercules, est peu différente de la teneur de l'écorce des tubercules des clones classifiés analoguement comme 'peu toxiques'. Par conséquent, le quotient de la teneur en glucoside de l'écorce et celle de la partie centrale des tubercules est inversement proportionnel à la teneur de la partie centrale. On peut dire que, passant de l'écorce à la partie centrale des tubercules, il se manifeste une chute de la teneur en glucoside, chute plus importante dans les tubercules des clones peu toxiques que dans ceux des clones plus toxiques.

4.4.2.2. Répartition dans les tubercules écorcés

Quelques auteurs ont constaté une différence de teneur en glucoside entre la partie supérieure (proximale) et la partie inférieure (distale) du tubercule. MOORE (1906) observait que, dans un tubercule d'un clone amer, la partie inférieure contenait plus de glucoside que la partie supérieure. COLLENS (1915) a constaté la même chose pour un clone amer, mais, en revanche, il observait le contraire pour un clone doux. Il a été démontré par JOACHIM et PANDITSEKERE (1944), pour un clone amer, et par DIDIER DE ST. AMAND (1960), pour un clone amer, et pour un clone doux, que c'est du côté du pédoncule que la teneur est la plus élevée, et qu'elle diminue assez régulièrement à mesure qu'on s'en éloigne.

TABLEAU 18. Répartition de la teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière fraîche) de haut en bas dans des tubercules écorcés, provenant de plantes différentes des clones Tabouca, A 13 et Ta 25.

	Tabouca		A 13		Ta 25					
	1	2	1	2	1	2	3	4	5	6
Extrémité proximale	41	27	145	110	385	290	105	135	310	290
↑	40	23	105	78	210	195	115	105	260	225
↓	37	23	100	58	275	210	115	110	200	170
Extrémité distale	35	37	80	50	185	230	165	120	145	110
			65		150	290		125		95
			28		125					95

Table 18. Distribution of glucoside (μg HCN per g fresh weight) from proximal to distal end of peeled tuberous roots of different plants of clones Tabouca, A 13 and Ta 25.

SINHA et NAIR (1968) n'ont pas observé de différence entre la teneur de la partie proximale et celle de la partie distale des tubercules écorcés.

Nous avons étudié la répartition de la teneur en glucoside en fonction de la distance du pédoncule pour un grand nombre de tubercules écorcés. Les tubercules furent découpés transversalement en tranches, épaisses de 5 cm, et la teneur fut déterminée pour chaque tranche. Les résultats n'étaient nullement concordants. Passant de la partie proximale à la partie distale, dans certains tubercules la teneur diminuait, alors que dans certains autres, il se manifestait d'abord une diminution, puis une augmentation; de plus, dans certains cas, la teneur augmentait en s'éloignant du pédoncule, et, enfin, dans certains tubercules la variation était très faible. Les divergences constatées chez les auteurs ci-dessus n'ont donc rien de surprenant. Tout de même, nous avons observé que, dans la plupart des cas, la partie supérieure du tubercule, surtout la partie très proche du pédoncule, est la plus riche en glucoside.

En déterminant la répartition dans tous les tubercules de 4 plantes différentes, nous avons constaté qu'elle est plus ou moins identique pour les tubercules de la même plante.

TABLEAU 19. Répartition du glucoside (en μg d'HCN par g des matières fraîche et sèche) de l'extérieur vers le centre de tranches de tubercules écorcés des clones Tabouca et Ta 25.

	HCN par rapport au poids frais		HCN par rapport au poids sec	
	Tabouca	Ta 25	Tabouca	Ta 25
Partie extérieure	30	280	82	900
Partie médiane	21	260	54	750
Partie centrale	18	180	52	600

Table 19. Distribution of glucoside (μg HCN per g fresh and dry weight) in transverse direction in slices of peeled tuberous roots of clones Tabouca and Ta 25.

Le tableau 18 présente la répartition du glucoside dans des tubercules écorcés de 10 plantes différentes, dont 2 du clone Tabouca, 2 du clone A 13, et 6 du clone Ta 25. Chaque chiffre représente la teneur d'une tranche de 5 cm d'épaisseur.

La grande variation dans la répartition de haut en bas dans les tubercules des différentes plantes fait supposer l'existence d'une relation entre la répartition du glucoside et l'état physiologique, peut-être l'activité métabolique, de la plante; ceci devrait être étudié plus à fond.

Nous avons étudié également la répartition du glucoside en direction transversale de tubercules écorcés. Nous avons mis en évidence (tableau 19) qu'il se manifeste une diminution de la teneur de l'extérieur vers le centre des tubercules.

TABLEAU 20. Répartition du glucoside (en μg d'HCN par g de matière fraîche) dans différentes parties de 6 plantes, dont 3 du clone Tabouca et 3 du clone Ta 25.

Partie de la plante	Tabouca				Ta 25			
	1	2	3	moyenne	1	2	3	moyenne
Feuilles:								
1. très jeunes	610	360	500	490	620	390	560	520
2. jeunes adultes	530	290	600	470	490	540	860	630
3. plus âgées	320	220	690	410	210	260	230	230
4. les plus âgées	140	110	290	180	140	180	150	160
Écorce des tiges:								
1. près des feuilles jeunes adultes	280	110	320	240	530	420	540	500
2. près des feuilles les plus âgées	150	210	180	180	500	550	490	510
3. à 2/3 de la partie sans feuilles	140	210	160	170	460	510	380	450
4. à 1/3 de la partie sans feuilles	300	220	190	240	600	920	760	760
5. à l'extrémité inférieure	370	260	340	320	1150	1090	1060	1100
Écorce de la bouture	160	220	180	190	740	590	540	620
Écorce des tubercules:								
1. partie proximale	510	990	620	710	1040	1800	1520	1450
2. partie médiane	620	830	620	690	890	1830	1320	1350
3. partie distale	660	760	690	700	950	1920	1260	1380
Écorce des 7 premiers cm de la racine non tubérisée	150	220	240	200	270	360	270	300
Partie centrale des tubercules:								
1. partie proximale	45	170	90	100	225	240	235	235
2. partie médiane	29	130	90	80	210	245	235	230
3. partie distale	33	105	95	80	235	250	210	230

Table 20. Distribution of glucoside (μg HCN per g fresh weight) in different parts of 6 plants, 3 of clone Tabouca and 3 of clone Ta 25.

4.5. RÉPARTITION DU GLUCOSIDE DANS DIFFÉRENTS ORGANES DES MÊMES PLANTES

Dans les sections précédentes, nous avons comparé entre eux les mêmes organes de plusieurs plantes; nous étudierons maintenant la répartition de la teneur en glucoside dans différents organes de la même plante.

Dans un premier temps nous avons considéré séparément 3 plantes du clone Tabouca, et 3 de Ta 25. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 20.

Nous avons ensuite étendu cette étude à 6 clones. Pour chacun des clones, nous avons établi un échantillonnage représentant la moyenne de 6 plantes; le tableau 21 présente les résultats.

En ce qui concerne la répartition du glucoside dans les feuilles, dans l'écorce des tiges et dans les tubercules, ces résultats confirment ceux relevés dans les sections précédentes. La répartition du glucoside dans la plante présente plus ou moins la même tendance pour tous les clones. Les zones où la teneur en glucoside est la plus élevée se trouvent dans l'écorce des tubercules, dans l'écorce

TABLEAU 21. Répartition du glucoside (en μg d'HCN par g de matière fraîche) dans différentes parties de plantes de six clones.

Partie de la plante	Clones						moyenne
	Ta- bouca	A 13	Ta 25	461	469	524	
Feuilles:							
limbes:							
1. très jeunes	330	330	490	790	550	650	520
2. jeunes adultes	420	340	570	1040	690	700	630
3. plus âgés	250	210	320	730	450	410	400
pétioles:							
1. très jeunes	400	750	770	940	960	860	780
2. jeunes adultes	210	350	350	460	650	270	380
3. plus âgés	120	110	170	180	160	120	140
Écorce des tiges:							
1. près des feuilles les plus âgées	270	350	550	1330	400	370	550
2. à 2/3 de la partie sans feuilles	90	230	330	580	290	410	320
3. à 1/3 de la partie sans feuilles	190	420	430	650	440	450	430
4. à l'extrémité inférieure	550	680	900	970	790	710	770
Écorce de la bouture	190	370	810	390	480	420	440
Écorce des tubercules	400	540	890	730	970	440	660
Partie centrale des tubercules	36	55	210	240	200	110	140

Table 21. Distribution of glucoside (μg HCN per g fresh weight) in different parts of plants of six clones.

des tiges tout à fait en bas, et dans les pétioles des jeunes feuilles. Dans tous les cas, la teneur de l'écorce des boutures est intermédiaire entre celle de l'écorce des tiges tout à fait en bas et celle de l'écorce des tubercules. Il est à remarquer que la teneur dans l'écorce de la même racine est beaucoup plus élevée dans la partie tubéreuse que dans la partie non tubérisée (tableau 20).

4.6. RAPPORT ENTRE LA TENEUR EN GLUCOSIDE DES FEUILLES ET CELLE DES TUBERCULES ÉCORCÉS D'UN GRAND NOMBRE DE CLONES

4.6.1. *Protocole expérimental*

Nous avons déterminé la teneur en glucoside des feuilles et des tubercules écorcés de 67 clones de la collection de l'O.R.S.T.O.M. à Adiopodoumé.

Le champ d'expérimentation comportait 8 blocs; chaque bloc représentait une plante de chacun des clones. Les prélèvements furent effectués sur des plantes âgées de 10 mois. Pour chaque clone un échantillon de feuilles et un de tubercules fut pris. Les échantillons de feuilles furent constitués par les trois premières feuilles adultes, prélevées d'une tige de chacune des 8 plantes par clone. Les échantillons de tubercules furent constitués de l'ensemble des tubercules des 8 plantes; mais quand cette quantité dépassait 15 kg, comme ce fut le cas pour un vingtaine de clones, nous n'avons retenu que la moitié des tubercules. Remarquons que nous ne connaissons pas la précision de cette méthode de réduction de la quantité de tubercules, mais dans cet essai, l'obtention d'une valeur globale de la teneur en glucoside était suffisante.

En plus de la teneur en glucoside des feuilles et des tubercules, nous avons déterminé, pour chaque clone, le poids des feuilles, des tiges, et des tubercules, ainsi que le nombre de tubercules par plante. Dans cette section nous nous bornons à la teneur en glucoside, tandis que les autres caractéristiques seront considérées dans la section 9.2.3.

4.6.2. *Résultats*

Sur l'ensemble des 67 clones, la teneur en glucoside, en μg d'HCN par g de matière fraîche, s'écartait de 31 à 630 pour les tubercules écorcés et de 540 à 1450 pour les feuilles. Or, l'écart-type est beaucoup plus élevé pour les tubercules que pour les feuilles, ce qui s'exprime par le coefficient de variation qui s'élevait à 64 % pour les tubercules et à 28 % pour les feuilles.

Dans le tableau 22, nous avons groupé les 15 clones dont la teneur en glucoside des tubercules écorcés est la plus basse (A), les 15 clones dont cette teneur est proche de la moyenne des 67 clones (B), et les 15 clones dont cette teneur est la plus élevée (C); le tableau présente la teneur en glucoside des tubercules écorcés et celle des feuilles de ces clones. Le tableau montre que la teneur en glucoside des feuilles des clones classifiés comme 'très toxiques' ou comme 'moyennement toxiques' suivant la teneur en glucoside des tubercules écorcés, est peu différente de la teneur des feuilles des clones classifiés analoguement comme 'peu toxique'. Ici nous observons le même phénomène que nous avons

TABLEAU 22. Teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière fraîche) des feuilles et des tubercules écorcés de clones de la collection de l'O.R.S.T.O.M. : pour 15 clones dont la teneur en glucoside des tubercules est la plus basse (A), pour 15 clones dont cette teneur se situe autour de la moyenne (B), et pour 15 clones dont cette teneur est la plus élevée (C).

Clones	A		Clones	B		Clones	C	
	glucoside			glucoside			glucoside	
	feuil- les	tuber- cules écorcés		feuil- les	tuber- cules écorcés		feuil- les	tuber- cules écorcés
Mo 72	750	72	B 8	1190	190	Gbekre	620	270
Kokotou	1090	71	649	730	200	B 37	670	270
465	970	36	B 47	1080	200	EAEF	920	250
Kpedevikoute	850	74	Bouanga Nana	710	190	634	830	260
Bapou II	730	51	314	1400	190	B 28	1210	300
Ketevi	1070	74	469	1270	190	321	770	260
Boke	630	65	B 20	980	160	B 27	1020	340
Kokobassie	700	60	B 1	1350	210	456	1220	490
Mo 70	620	69	B 49	710	200	B 42	990	250
466	910	69	B 38	970	200	606	1450	630
Kataoli Togo	540	42	B 39	730	200	376	1300	520
Kokossokro	680	56	Sodjari	760	200	B 25	1350	290
Ouanga	660	71	B 33	970	200	Mo 68	1020	310
B 9	750	31	B 24	950	190	458	1250	270
Mo 96	540	53	Agba Kokore	980	200	606	1020	360
Moyenne	770	60	Moyenne	990	195	Moyenne	1040	340
Indice	100	100		130	330		135	570

Table 22. Glucoside concentration (μg HCN per g fresh weight) in leaves and peeled tuberous roots of three groups of clones of the O.R.S.T.O.M. collection: 15 clones with lowest (A), 15 clones with average (B), and 15 clones with highest (C) glucoside concentration in peeled tuberous roots.

constaté en comparant la teneur en glucoside de l'écorce et celle de la partie centrale des tubercules (4.4.2.1.). Dans la section suivante nous avançons une hypothèse qui pourrait expliquer ce phénomène.

4.7. DISCUSSION

Comme nous l'avons démontré dans la section 4.4.2.1., la teneur en glucoside de l'écorce des tubercules des clones, classés comme 'très toxiques' ou 'peu toxiques' en raison de la teneur en glucoside des tubercules écorcés, est peu différente. Nous avons démontré dans la section 4.6.2. que le même phénomène se présente pour les feuilles. Donc, la classification des clones au point de vue de la toxicité suivant la teneur en glucoside de la partie centrale des tubercules n'est pas obligatoirement valable pour les autres organes de la plante.

La répartition du glucoside dans la plante nous donne l'impression que l'apparition et la disparition du glucoside se déroule dans les différentes parties de la plante à des taux différents. Il semble que l'équilibre entre ces processus varie suivant les organes. De même, cet équilibre varie d'un clone à l'autre, et il est évident que pour les clones très toxiques cet équilibre est différent de celui des clones peu toxiques, tout au moins en ce qui concerne la partie centrale des tubercules. On pourrait en conclure que, en général, les clones à tubercules peu toxiques et ceux à tubercules très toxiques ont la même capacité de former le glucoside, mais que les clones peu toxiques sont plus aptes à le transformer que les clones très toxiques. Cette transformation paraît la plus importante dans la région autour du cambium des tubercules. Cette hypothèse part de la supposition que le glucoside est principalement formé dans les feuilles, puis transporté dans la plante et que, déjà pendant le transport, mais surtout dans les tubercules, une partie importante est transformée en d'autres substances; la migration du glucoside sera envisagée au Chapitre 10, où nous reviendrons sur la présente hypothèse.

5. ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE DIFFÉRENTS ENGRAIS SUR LA TENEUR EN GLUCOSIDE DES PLANTES

5.1. INTRODUCTION

Les auteurs ayant étudié la cyanogénèse admettent, en général, qu'il existe une corrélation positive entre la richesse du sol en azote et la teneur en glucoside des plantes. La plupart de ces études ont été effectuées avec le sorgho.

Quant au manioc, c'est VAN DE GOOR (1941) qui affirme qu'un apport d'engrais azoté peut augmenter la teneur en glucoside des tubercules. À notre connaissance, cette étude est la seule effectuée sur l'influence de l'azote sur la cyanogénèse du manioc.

L'influence d'autres éléments, importants pour la nutrition, n'a été que très peu étudiée et les résultats ne sont pas concordants. Pour le sorgho, l'apport de phosphate semble en diminuer la toxicité, la potasse la diminue ou ne l'influence pas; PATEL et WRIGHT (1958) présentent une revue à ce sujet. Pour le manioc, DARJANTO (1952) mentionne que la toxicité est plus élevée sur les terrains déficients en potasse, sans toutefois présenter des chiffres exacts.

Étant donné que l'influence des éléments nutritifs sur la cyanogénèse du manioc est très peu connue, il nous a paru utile d'étudier cette question importante. Nous avons étudié l'influence de l'azote, de la potasse, du phosphate, du magnésium et du calcium; nous avons aussi étudié l'influence du fumier. Au début, nous avons effectué nos essais au champ et l'effet des éléments nutritifs ne fut étudié que sur la partie centrale des tubercules. Plus tard nous avons procédé à des essais en pots et en sachets en plastique, et étendu notre étude aux racines non tubérisées, aux feuilles, et aux tiges. Cela nous a permis de comparer les résultats obtenus au cours des essais au champ sur des plantes âgées, avec ceux obtenus sur des plantes très jeunes cultivées en sachets. Nous relevons d'abord les résultats des essais effectués au champ (5.2.), puis ceux des essais effectués en pots et en sachets (5.3.); pour terminer ce chapitre nous présenterons les conclusions sur l'ensemble des essais, ainsi qu'une discussion.

5.2. EXPÉRIMENTATION AU CHAMP

5.2.1. *Essai sur l'influence des engrais azoté et potassique*

5.2.1.1. Protocole expérimental

L'essai fut effectué sur un terrain forestier défriché 7 mois auparavant; le tableau 23 en présente les propriétés chimiques au début de l'essai. La plantation a eu lieu en août 1965. Le dispositif était factoriel, 2². Il y avait neuf blocs, chacun représentant une répétition de l'essai. Chaque bloc comprenait 2 parcelles, une du clone Tabouca et une de Ta 25. Chaque parcelle comptait 4 lots,

TABLEAU 23. Propriétés chimiques des sols (profil: 0-20 cm) des essais au champ (sections 5.2.1. et 5.2.2.), et de la terre de surface utilisée pour les essais en pots et en sachets en plastique (section 5.3.).

	Sol des essais au champ		Terre des essais en pots et en sachets
	premier essai (section 5.2.1.)	deuxième essai (section 5.2.2.)	
Matière organique:			
M.O. totale ‰	16,3	33,6	12,9
Carbone ‰	9,4	19,5	7,5
Azote ‰	0,72	1,32	0,58
C/N	13,1	14,7	12,9
P ₂ O ₅ total ‰	0,560	0,775	0,450
Complexe absorbant (meq ‰):			
Ca	0,86	1,80	0,42
Mg	0,31	0,24	0,36
K	0,03	0,13	0,04
Na	0,02	0,02	0,02
Somme des bases échangeables	1,22	2,19	0,84
Capacité d'échange	5,29	4,82	5,22
Taux de saturation ‰	23,1	45,4	16,1
pH (H ₂ O)	5,3	5,1	4,8

Table 23. Chemical properties of the soil (profile: 0-20 cm) of field trials (sections 5.2.1. and 5.2.2.), and of soil used for experiments in plastic pots or bags (section 5.3.).

séparés l'un de l'autre par une ligne de bordure de plantes du même clone; chaque lot comptait 4 plantes. Chacun des lots d'une parcelle a reçu, par répartition au hasard, un des 4 traitements d'engrais. Les applications d'engrais furent les suivantes:

- azote: 120 kg de N/ha, soit 18 g/plante, administrés sous forme d'urée (N=45%) et de (NH₄)₂SO₄ (N=21%);
- potasse: 180 kg de K₂O/ha, soit 27 g/plante, administrés sous forme de KCl (K₂O=60%).

L'engrais fut administré en deux épandages: le premier, deux mois après la plantation, comprenait 22 g d'urée et 22,5 g de KCl par plante; le deuxième, 5 mois et demi après la plantation, portait sur 18 g de (NH₄)₂SO₄ et 22,5 g de KCl par plante. L'engrais fut réparti uniformément dans deux rigoles de 5 cm de profondeur, creusées à une distance de 20 cm sur les billons.

Le prélèvement a été effectué 8 mois et demi après la plantation; pour les 4 plantes de chaque lot, les caractéristiques suivantes furent déterminées:

- tiges: nombre, longueur, diamètre;
- feuilles: poids sec;
- tubercules non écorcés: nombre, poids brut;
- tubercules écorcés: pourcentage en eau et teneur en glucoside.

L'existence éventuelle de quelque corrélation entre la teneur en glucoside et les autres caractéristiques déterminées sera considérée en 9.2.2. Ici nous nous bornons aux teneurs en glucoside des tubercules écorcés.

TABLEAU 24. Influence des engrais azoté et potassique sur la teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière sèche) des tubercules écorcés des clones Tabouca et Ta 25.

	Engrais azoté			Engrais potassique		
	avec	sans	influence	avec	sans	influence
Tabouca	121	119	+2%	106	134	-21%
Ta 25	634	623	+2%	537	721	-28%

Table 24. Effect of nitrogen and potassium manuring on glucoside concentration (μg HCN per g dry weight) in peeled tuberous roots of clones Tabouca and Ta 25.

5.2.1.2. Résultats

Le tableau 24 groupe les résultats moyens de l'essai. Nous voyons que l'apport d'engrais potassique provoque une diminution importante de la teneur en glucoside; cette diminution s'est révélée statistiquement significative (seuil 0,01). En revanche, l'apport d'engrais azoté ne présente aucune influence sur la teneur en glucoside. Il ne s'est pas manifesté d'interaction entre l'engrais azoté et potassique.

Il peut paraître surprenant que l'apport d'engrais azoté soit sans effet, puisque plusieurs auteurs ont signalé son influence sur la toxicité de diverses plantes cyanogénétiques. Cependant, comme nous le verrons plus loin, dans certains de nos essais il se présente sans aucun doute une influence de l'engrais azoté sur la teneur en glucoside. Il est possible que, dans l'essai présent, l'apport ait été trop faible par rapport à la quantité disponible dans le sol. Il est peu probable que l'azote ait été lessivé puisque l'essai a été fait hors de la saison des grandes pluies.

5.2.2. Essai sur l'influence des engrais azoté, phosphaté, potassique, magnésique et calcique

5.2.2.1. Protocole expérimental

L'essai fut effectué sur une jachère herbeuse défrichée peu auparavant. Les propriétés chimiques du sol (tableau 23), déterminées au début de l'essai, sont plus favorables que pour d'autres essais effectués à Adiopodoumé (cf. tableaux 2 et 34); surtout la teneur en matière organique est relativement très élevée, probablement à cause de l'incorporation dans le sol de la matière organique issue de la jachère herbeuse.

La plantation a eu lieu à la mi-mai 1967. Le dispositif était factoriel, 2⁵. En 'confounding' 2 interactions, les 32 parcelles représentant les combinaisons des traitements d'engrais, furent divisées en 8 blocs de 4 parcelles. Il y avait, par parcelle, 2 plantes utiles de chacun des clones: Tabouca, A 13, Ta 25 et 461. L'essai comportait 2 répétitions.

Les différents traitements d'engrais correspondaient aux quantités suivantes:

- azote: 220 kg de N/ha, administrés sous forme de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (N=21 %);
- phosphate: 100 kg de P_2O_5 /ha, administrés sous forme de superphosphate triple ($\text{P}_2\text{O}_5=45\%$);

- potasse: 360 kg de K_2O /ha, administrés sous forme de KCl ($K_2O=60\%$);
- magnésium: 100 kg de MgO /ha, administrés sous forme de $MgSO_4$ ($MgO=27\%$);
- calcium: 500 kg de CaO /ha, administrés sous forme de $Ca(OH)_2$ ($CaO=70\%$).

Il y a eu 3 épandages: un mois et demi, 3 mois, et 6 mois après la plantation. Chaque épandage comportait un tiers des quantités d'engrais mentionnées ci-dessus.

Lorsque les plantes eurent atteint l'âge de 8 mois, le prélèvement d'une des répétitions fut effectué. La teneur en glucoside des feuilles et celle des tubercules écorcés furent déterminées. Les échantillons de feuilles comprenaient les deux premières feuilles adultes de chaque tige ou ramification.

Deux mois plus tard, le prélèvement de la deuxième répétition fut effectué: seuls les clones Tabouca et Ta 25 furent prélevés, mais, pour ces clones, nous avons déterminé non seulement la teneur en glucoside des feuilles et des tubercules écorcés, mais encore celle de l'écorce des tiges, à la hauteur de 30 à 35 cm, et celle de l'écorce des tubercules.

5.2.2.2. Résultats

Les résultats de l'essai, en moyenne sur les clones, sont groupés dans le tableau 25. Le tableau résume, pour les différents engrais, leur influence en pourcentage par rapport à la moyenne de l'essai, et indique le seuil de signification pour les influences qui sont significatives. Le tableau ne concerne que les effets principaux; les interactions étaient très réduites et non significatives. Le tableau montre que l'engrais potassique a une influence significative dans tous les organes, et que cette influence est la plus importante dans les tubercules. On

TABLEAU 25. Influence (en pourcentage par rapport à la moyenne de l'essai) des engrais azoté (N), phosphaté (P), potassique (K), magnésique (Mg) et calcique (Ca), sur la teneur en glucoside dans quelques organes de la plante, à deux époques de prélèvement (en moyenne pour quatre clones).

	Premier prélèvement (à l'âge de 8 mois)		Deuxième prélèvement (à l'âge de 10 mois)			
	feuilles	tubercules écorcés	feuilles	tubercules écorcés	écorce des tiges	écorce des tubercules
N	+13**	+15**	+10*	+21**	-2	+5
P	+2	-5	+5	+5	+2	+3
K	-13**	-27**	-13*	-19**	-9*	-21**
Mg	0	+1	-5	-9	+2	-6
Ca	-8**	-3	+4	+1	-6	0

Seuils de signification: * = 0,05; ** = 0,01

Table 25. Effect (percentage of average value of trial) of nitrogen (N), phosphate (P), potassium (K), magnesium (Mg) and calcium (Ca) manuring on glucoside concentration in some parts of the plant, at two moments of sampling (averaged over four clones).

constate aussi une influence de l'engrais azoté, mais seulement dans les feuilles et les tubercules écorcés, pas dans l'écorce des tiges ni dans celle des tubercules. L'influence de l'azote sur la teneur en glucoside est positive; en revanche, celle de la potasse est négative.

L'essai ne révèle pas une influence d'importance des engrais phosphaté, magnésique et calcique. Pour le premier prélèvement, l'engrais calcique montre une influence significative sur la teneur en glucoside des feuilles; mais, puisque cette influence ne s'élève qu'à 8% et qu'elle ne se manifeste pas dans le deuxième prélèvement, la signification de ce résultat est douteuse.

5.2.3. Essai sur l'influence du fumier de ferme

5.2.3.1. Protocole expérimental

L'essai fut effectué sur une jachère herbeuse défrichée peu auparavant, terrain tout à fait comparable à celui de l'essai précédent (5.3.2.). Il y avait 8 blocs, chacun représentant une répétition de l'essai. Chaque bloc contenait 2 parcelles, dont l'une a reçu un apport de fumier³ équivalent à 35 tonnes/ha. Chaque parcelle comportait un lot avec des plantes du clone Tabouca, et un avec des plantes du clone Ta 25. La plantation a eu lieu à la fin de juillet 1967.

Neuf mois après la plantation, en avril 1968, un prélèvement fut effectué dans 4 des 8 blocs. Pour chacun des lots les échantillons furent pris sur l'ensemble de 3 plantes. La teneur en glucoside de l'écorce et celle de la partie centrale des tubercules furent déterminées, ainsi que le nombre et le poids des tubercules.

Deux mois plus tard, donc en pleine saison des pluies, nous avons prélevé des échantillons dans les 4 autres blocs. La teneur en glucoside des tubercules écorcés, ainsi que leur nombre et leur poids, furent déterminés.

5.2.3.2. Résultats

Les résultats de l'essai (tableau 26) montrent que la teneur en glucoside de la partie centrale et de l'écorce des tubercules des plantes ayant reçu un apport de

³ À cause d'un malentendu, nous ne disposons pas des données sur la composition chimique du fumier utilisé. Il s'agissait de fumier de vache, constitué en utilisant beaucoup de paille.

TABLEAU 26. Influence du fumier sur la teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière sèche) des tubercules des clones Tabouca et Ta 25.

	Tubercules écorcés				Écorce des tubercules	
	à l'âge de 9 mois		à l'âge de 11 mois		à l'âge de 9 mois	
	Tabouca	Ta 25	Tabouca	Ta 25	Tabouca	Ta 25
Sans fumier	63	618	96	755	1910	4340
Avec fumier	59	544	78	575	1530	4120
Influence du fumier (en %)	-6	-12	-19	-24	-20	-5

Table 26. Effect of farmyard manure on glucoside concentration (μg HCN per g dry weight) in peeled tuberous roots of clones Tabouca and Ta 25.

fumier est moins élevée que celle des plantes témoins. Cette influence du fumier est significative (seuil 0,05).

Il est à remarquer que la teneur en glucoside des tubercules écorcés est beaucoup plus élevée pour les plantes de 11 mois que pour celles de 9 mois, et que cette différence est la moins élevée pour les plantes ayant reçu un apport de fumier. Nous supposons que cette augmentation de la teneur en glucoside est en relation avec l'arrivée des grandes pluies, relation qui sera discutée dans la section 7.2.6.

5.3. EXPÉRIMENTATION SUR DES PLANTES CULTIVÉES EN POTS OU EN SACHETS EN PLASTIQUE

5.3.1. *Essais sur l'influence d'un mélange d'engrais, du fumier, de l'ombrage, et de la sécheresse*

5.3.1.1. Introduction

Ces essais furent les premiers à être effectués en pots et en sachets en plastique. Leur but était d'étudier l'influence de quatre facteurs différents dans le même essai, en employant un dispositif factoriel. Nous avons effectué deux essais; le dispositif expérimental en était commun.

Dans le premier essai, les plantes furent cultivées dans des gros pots en plastique, dans le deuxième dans des sachets en plastique.

La terre utilisée était de la terre de surface du champ d'expérimentation à Adiopodoumé; ses propriétés chimiques figurent dans le tableau 23.

Dans cette section nous nous bornons à considérer les résultats de l'apport de l'engrais et du fumier. Les résultats concernant la sécheresse seront discutés en 7.3., ceux sur l'ombrage en 8.2.

5.3.1.2. Protocole expérimental

Le dispositif des essais était factoriel, 2^4 . Chacun des 16 lots comprenait 4 plantes, une de chacun des clones: Tabouca, A 13, Ta 25 et 461. En 'confounding' deux des interactions, les 16 lots furent divisés en 4 blocs de 4 lots.

Les quatre facteurs furent étudiés comme suit:

- engrais: les pots et les sachets en question ont reçu, par kg de terre, au moment de la plantation, une dose d'engrais comportant: 130 mg d'urée ($N=46\%$), 110 mg de superphosphate triple ($P_2O_5=45\%$), 400 mg de KCl ($K_2O=60\%$) et 140 mg de $MgSO_4$ ($MgO=27\%$);
- fumier: la terre pour les pots et les sachets fut mélangée avec 30 g de fumier⁴ par kg, avant la plantation;
- ombrage: les plantes à traiter furent ombragées à l'aide de nattes en limbes de palmier, dont la surface transmettante était de 30%;
- sécheresse: les plantes destinées à un traitement de sécheresse ont reçu un tiers de la quantité d'eau administrée aux plantes non traitées.

⁴ Cf. annotation 3, page 48.

La partie du protocole expérimental ci-dessus était commune aux deux essais. Le protocole expérimental différait sur les points suivants:

Premier essai:

Les pots utilisés étaient en plastique noir et contenaient 55 kg de terre. L'écartement était de 1 m sur 1 m, à compter du centre des pots. Date de plantation: 19 juillet 1967.

À l'âge de trois mois, un échantillon, comprenant un lobe de chaque feuille, fut prélevé sur chacune des plantes et nous en avons déterminé la teneur en glucoside. Après cela, les plantes destinées au traitement d'engrais ont reçu un deuxième apport égal au premier; au même moment les autres plantes ont reçu également un apport d'engrais, mais en quantité inférieure de moitié.

À l'âge de six mois un deuxième prélèvement fut effectué sur les feuilles. Ensuite les plantes furent enlevées. Les racines furent débarrassées de la terre par un courant d'eau. La teneur en glucoside des racines non tubérisées fut déterminée.

Deuxième essai:

Dans cet essai les plantes furent cultivées dans des sachets contenant 2 kg de terre. Les sachets furent placés entre les gros pots du premier essai, à l'écartement de 25 cm sur 25 cm, profitant ainsi de l'ombrage existant. Date de plantation: 12 août 1967.

L'essai fut terminé 2 mois après la plantation. Pour chaque plante la teneur en glucoside des feuilles et celle des racines furent déterminées; la teneur des racines a été exprimée par rapport au poids frais, la quantité de matière étant trop réduite pour en déterminer également la teneur en eau.

TABLEAU 27. Influence (en pourcentage par rapport à la moyenne de l'essai) de l'engrais (E), du fumier (F), de l'ombrage (O), de la sécheresse (S), et de l'interaction EF, sur la teneur en glucoside des feuilles et des racines de jeunes plantes (en moyenne pour quatre clones).

	Premier essai			Deuxième essai	
	prélèvement 1	prélèvement 2		feuilles	racines
	feuilles	feuilles	racines		
E	- 9	- 9	-37	-22**	-68**
F	-61**	-14	-30	-40**	-88**
O	+10	+10	+17	+17**	- 9
S	+10	+18*	+21	+23**	+60*
EF	+21*	+14	+19	+30**	+73**

seuils de signification: * = 0,05; ** = 0,01

Table 27. Effect (percentage of average value of trial) of fertilizer (E), farmyard manure (F), shade (O), drought (S), and of interaction EF, on glucoside concentration in leaves and roots of young plants, grown in plastic pots or bags (averaged over four clones).

5.3.1.3. Résultats

Le tableau 27 résume les résultats de l'essai en moyenne sur les 4 clones, quant aux effets principaux et quant à l'interaction entre l'engrais et le fumier (EF), seule interaction du premier ordre qui s'est montrée importante. L'influence des différents facteurs a été exprimée en pourcentage par rapport à la moyenne de l'essai. Là où l'analyse statistique a prouvé que les influences étaient significatives, nous avons noté le seuil de signification.

Le tableau montre que la teneur en glucoside des feuilles et des racines est plus basse pour les plantes ayant reçu de l'engrais ou du fumier, que pour les plantes témoins, bien que les influences ne soient pas toujours statistiquement significatives. L'influence paraît être plus forte dans les racines que dans les feuilles. L'interaction entre l'effet de l'engrais et celui du fumier (EF) est positive, donc les influences de chaque facteur ne s'ajoutent pas. Il ne s'est pas manifesté d'interaction statistiquement significative entre les clones et un des facteurs étudiés.

5.3.2. Essai sur l'influence des engrais azoté, phosphaté, potassique et magnésique

5.3.2.1. Protocole expérimental

Les plantes furent cultivées dans des pots en plastique noir, contenant 55 kg de terre de surface. L'écartement des pots était de 1 m sur 1 m.

Le dispositif était factoriel, 2⁴. Les différents traitements d'engrais administrés au moment de la plantation furent, par kg de terre :

- azote: 195 mg d'urée (N=46 %);
- phosphate: 165 mg de superphosphate triple (P₂O₅=45 %);
- potasse: 600 mg de KCl (K₂O = 60 %);
- magnésium: 210 mg de MgSO₄ (MgO=27 %).

En 'confounding' deux interactions, les 16 combinaisons de traitement furent divisées en 4 blocs de 4 lots. L'essai portait sur les clones Tabouca et Ta 25. Date de plantation: 19 juillet 1967.

Trois mois après la plantation, nous avons prélevé sur chaque plante un échantillon, comprenant un lobe de chacune des feuilles, et la teneur en glucoside en fut déterminée. Après ce prélèvement une nouvelle dose d'engrais, égale à la première, fut administrée. Les plantes non destinées au traitement d'un certain engrais ont quand même reçu un apport de cet engrais, en quantité inférieure de moitié, ceci pour favoriser leur croissance.

Lorsque les plantes eurent atteint l'âge de 6 mois l'essai fut terminé. Pour chaque plante fut déterminée la teneur en glucoside des feuilles. Certaines plantes avaient formé des tubercules, d'autres non, ce qui rendit impossible la comparaison de la teneur en glucoside des racines, ni celle des tubercules.

5.3.2.2. Résultats

Le tableau 28 présente les résultats moyens de l'essai quant aux effets principaux et à l'interaction NK, seule interaction qui s'est montrée importante.

Il se manifeste une influence nette de l'azote et de la potasse, plus forte dans le premier prélèvement que dans le deuxième. L'existence d'une interaction entre

TABLEAU 28. Influence (en pourcentage par rapport à la moyenne de l'essai) des engrais azoté (N), phosphaté (P), potassique (K), magnésique (Mg) et de l'interaction NK, sur la teneur en glucoside des feuilles de plantes cultivées en sachets (en moyenne pour deux clones).

	Premier prélèvement	Deuxième prélèvement
N	+66**	+33**
P	-9	-3
K	-48**	-26*
Mg	-14	+7
NK	-31*	-20*

seuils de signification: * = 0,05; ** = 0,01

Table 28. Effect (percentage of average value of trial) of nitrogen (N), phosphate (P), potassium (K) and magnesium (Mg) manuring, and of interaction NK, on glucoside concentration in leaves of plants grown in bags (averaged over two clones).

l'engrais azoté et potassique (NK) indique que la réponse à l'un des deux engrais est affectée par la présence ou l'absence de l'autre. Le caractère négatif de cette interaction indique que l'effet de l'azote est moins fort en présence de la potasse, ou bien, que l'effet de la potasse est plus fort en présence de l'azote.

Ni l'azote, ni la potasse n'eurent une même influence sur les deux clones; en effet, l'interaction entre ces engrais et les clones était significative (seuil 0,05). En moyenne sur les deux prélèvements, l'influence de l'azote était de 40% pour Tabouca, et de 70% pour Ta 25; celle de la potasse était de 36% pour Tabouca et de 52% pour Ta 25.

5.3.3. Essai sur l'influence des engrais azoté, phosphaté, potassique, magnésique et calcique

5.3.3.1. Protocole expérimental

Cet essai fut effectué dans des sachets contenant 2 kg de terre. L'écartement était de 20 cm sur 20 cm. Les traitements d'engrais pour N, P, K et Mg furent, par kg de terre, identiques à ceux de l'essai précédent (5.3.2.). Le calcium fut administré sous forme de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($\text{CaO}=70\%$) à raison de 220 mg par kg de terre.

Le dispositif était factoriel, 2^5 . En 'confounding' deux interactions, 4 blocs de 8 lots furent constitués. L'essai portait sur les clones Tabouca, A 13, Ta 25 et 461. Il n'y eut pas de répétition. Date de plantation: 12 août 1967.

Sept semaines après la plantation, l'essai fut terminé. Pour chaque plante, la teneur en glucoside des feuilles, des tiges entières et des racines fut déterminée.

5.3.3.2. Résultats

Le tableau 29 résume les résultats moyens de l'essai, quant aux effets principaux et quant aux interactions NK et KM, seules interactions qui se sont montrées plus ou moins importantes.

L'influence de la potasse est de nouveau très évidente, mais celle de l'azote

TABLEAU 29. Influence (en pourcentage par rapport à la moyenne de l'essai) des engrais azoté (N), phosphaté (P), potassique (K), magnésique (Mg) et calcique (Ca), et des interactions NK et KMg, sur la teneur en glucoside des feuilles, des tiges, et des racines, de jeunes plantes (en moyenne pour quatre clones).

	Feuilles	Tiges	Racines
N	+ 9**	+10**	+ 4
P	- 6*	-14**	- 9
K	-40**	-40**	-61**
Mg	- 8**	-16**	-26**
Ca	+ 5	- 9**	-16**
NK	-13**	- 3	- 9
KMg	+ 7*	+10**	+10

seuils de signification: * = 0,05; ** = 0,01

Table 29. Effect (percentage of average value of trial) of nitrogen (N), phosphate (P), potassium (K), magnesium (Mg) and calcium (Ca) manuring, and of interactions NK and KMg, on glucoside concentration in leaves, stems and roots of young plants (averaged over four clones).

est très réduite dans cet essai; celle du magnésium est statistiquement significative et plus importante que dans les essais précédents.

Remarquons que dans cet essai, les pourcentages de différence très réduits sont déjà statistiquement significatifs, ce qui indique que l'essai fut très homogène.

5.3.4. Essai sur l'influence des engrais azoté, phosphaté, potassique, magnésique et calcique, et du fumier

5.3.4.1. Protocole expérimental

L'essai fut effectué dans des sachets contenant 5 kg de terre, placés à l'écartement de 40 cm sur 40 cm.

Le témoin était identique pour les six traitements. Les sachets témoins ont reçu un apport d'engrais comme suit:

- azote: 1,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (N=21 %);
- phosphate: 0,40 g de superphosphate triple ($\text{P}_2\text{O}_5=45\%$);
- potasse: 1,10 g de KCl ($\text{K}_2\text{O}=60\%$);
- magnésium: 0,70 g de MgSO_4 ($\text{MgO}=27\%$);
- calcium: 0,54 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($\text{CaO}=70\%$).

Cet apport d'engrais constituait pour les éléments N, P, K, Mg et Ca le niveau 2, ou bien: $\text{N}_2\text{P}_2\text{K}_2\text{Mg}_2\text{Ca}_2$, les autres niveaux étant:

- 0 = pas d'apport d'engrais de l'élément;
- 1 = apport inférieur de moitié au niveau 2;
- 4 = apport double du niveau 2.

Par exemple, pour l'élément azote il y avait les combinaisons: $\text{N}_0\text{P}_2\text{K}_2\text{Mg}_2\text{Ca}_2$, $\text{N}_1\text{P}_2\text{K}_2\text{Mg}_2\text{Ca}_2$, $\text{N}_2\text{P}_2\text{K}_2\text{Mg}_2\text{Ca}_2$, et $\text{N}_4\text{P}_2\text{K}_2\text{Mg}_2\text{Ca}_2$. Pour les autres éléments le système était analogue. En ce qui concerne le fumier, des sachets ayant reçu 75 (F_1), 150 (F_2) et 225 g (F_3) furent comparés avec le témoin ($\text{N}_2\text{P}_2\text{K}_2\text{Mg}_2\text{Ca}_2$).

TABLEAU 30. Influence de différentes doses des engrais azoté (N), phosphaté (P), potassique (K), magnésique (Mg) et calcique (Ca), et de fumier (F), sur la teneur en glucoside des feuilles et des racines de jeunes plantes, cultivées en sachets, pour quatre clones.

Clones	Feuilles doses*				Racines doses*				
	0	1	2	4	0	1	2	4	
N	Tabouca	80	84	100 ^a	130	99	95	100 ^A	144
	A 13	79	90	100 ^b	108	73	85	100 ^B	131
	Ta 25	74	81	100 ^c	143	43	72	100 ^C	116
	461	66	84	100 ^d	112	50	75	100 ^D	106
	moyenne	75	85	100	123	66	82	100	124
P	Tabouca	88	107	100 ^a	101	111	104	100 ^A	79
	A 13	102	106	100 ^b	104	88	93	100 ^B	98
	Ta 25	117	108	100 ^c	107	91	83	100 ^C	98
	461	108	103	100 ^d	97	113	122	100 ^D	105
	moyenne	104	106	100	102	101	101	100	95
K	Tabouca	110	100	100 ^a	110	135	115	100 ^A	64
	A 13	116	102	100 ^b	96	207	138	100 ^B	84
	Ta 25	125	114	100 ^c	100	130	123	100 ^C	84
	461	120	99	100 ^d	93	137	110	100 ^D	74
	moyenne	118	104	100	100	152	122	100	77
Mg	Tabouca	102	98	100 ^a	111	91	92	100 ^A	130
	A 13	101	100	100 ^b	104	89	100	100 ^B	85
	Ta 25	99	86	100 ^c	104	71	72	100 ^C	109
	461	115	109	100 ^d	103	111	100	100 ^D	83
	moyenne	104	98	100	106	91	91	100	102
Ca	Tabouca	120	93	100 ^a	103	122	112	100 ^A	121
	A 13	107	100	100 ^b	107	92	97	100 ^B	115
	Ta 25	91	96	100 ^c	97	65	88	100 ^C	74
	461	106	89	100 ^d	92	96	95	100 ^D	95
	moyenne	106	95	100	100	94	98	100	101
		doses*				doses*			
		2	2+F ₁	2+F ₂	2+F ₃	2	2+F ₁	2+F ₂	2+F ₃
F	Tabouca	100 ^a	91	89	81	100 ^A	72	70	72
	A 13	100 ^b	90	89	92	100 ^B	61	63	62
	Ta 25	100 ^c	77	89	74	100 ^C	71	45	33
	461	100 ^d	73	78	66	100 ^D	69	51	37
	moyenne	100	83	86	78	100	68	57	51

* Explication des doses dans le texte

Teneur en μg d'HCN par g de matière sèche: ^a = 2410 ^A = 1690

^b = 1420 ^B = 1240

^c = 2170 ^C = 1430

^d = 2700 ^D = 1610

Table 30. Effect of manuring at different rates with nitrogen (N), phosphate (P), potassium (K), magnesium (Mg), calcium (Ca) and farmyard manure (F), on glucoside concentration in leaves and roots of young plants of four clones, grown in bags.

L'essai portait sur les clones Tabouca, A 13, Ta 25 et 461. Il y avait deux répétitions; chacune comprenait 4 blocs, un pour chaque clone. Dans chaque bloc figuraient les sachets de tous les différents traitements d'engrais et de fumier, la répartition étant faite au hasard; le témoin figurait deux fois dans chaque bloc. Date de plantation: 13 décembre 1967.

Lorsque les plantes eurent atteint l'âge de deux mois, l'essai fut terminé. La teneur en glucoside des feuilles et celle des racines furent déterminées.

5.3.4.2. Résultats

Les résultats pour les 4 clones sont groupés dans le tableau 30; la teneur en glucoside correspondant aux différentes doses a été exprimée par rapport à celle de la dose témoin (la dose 2). Les résultats moyens sur les 4 clones sont présentés graphiquement dans la figure 5.

Les courbes n'indiquent aucune influence de l'apport des engrais phosphaté, magnésique et calcique. En revanche, on observe une influence très nette des engrais azoté et potassique, et du fumier. La teneur en glucoside varie de façon directement proportionnelle à l'apport d'engrais azoté, dont l'influence sur les feuilles et sur les racines est pratiquement identique. Quant à l'engrais potassique et au fumier, ils provoquent toujours une diminution de la teneur en glucoside, beaucoup plus marquée dans les racines que dans les feuilles.

L'influence des engrais azoté et potassique, et celle du fumier, sur la teneur en glucoside des feuilles, de même que sur celle des racines, se sont montrées statistiquement significatives (seuil 0,01). Il ne s'est pas manifesté d'interaction significative entre les clones et l'influence de l'une de ces fumures, sauf dans le cas de l'influence de l'engrais azoté sur la teneur des feuilles (seuil 0,05). Néanmoins, l'influence des engrais et du fumier était assez différente pour les quatre clones (cf. tableau 30).

5.4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats précédents nous permettent d'affirmer l'importance considérable de la potasse dans la cyanogénèse du manioc. Elle a en effet un rôle négatif, puisque l'apport d'engrais potassique entraîne une diminution sensible de la teneur en glucoside dans toutes les parties de la plante que nous avons étudiées, et plus spécialement dans les racines.

L'influence de l'azote est aussi très nette, comme l'indiquent les résultats de la plupart de nos essais. Mais, à l'inverse de la potasse, elle a une influence positive sur la cyanogénèse.

La supposition que la teneur en glucoside dépend de la disponibilité des acides aminés dans la plante (cf. section 2.1.) permet d'expliquer le rôle que jouent l'azote et la potasse. En effet, pour plusieurs plantes, il a été démontré qu'un apport d'azote provoque l'augmentation de la teneur en différents acides aminés (parmi lesquels la valine et l'isoleucine) dans les feuilles, alors qu'un apport de potasse provoque une diminution de cette teneur (cf.: MULDER, 1956; OZBUN,

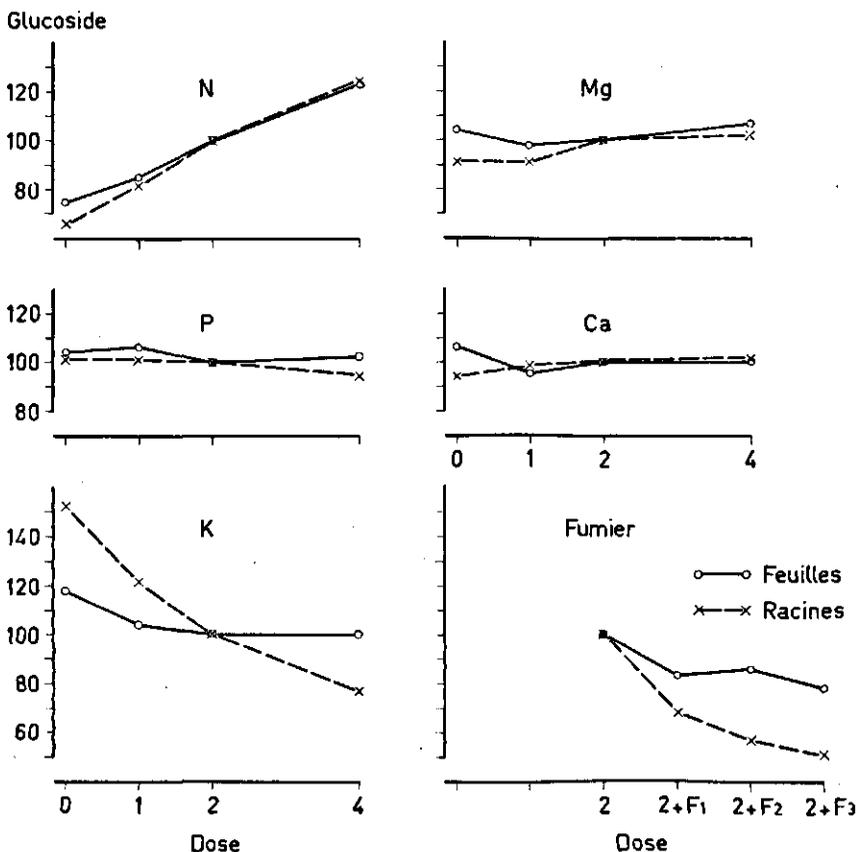


FIG. 5. Influence (en moyenne pour quatre clones) de différentes doses des engrais azoté, phosphaté, potassique, magnésique et calcique, et de fumier, sur la teneur en glucoside (en pourcentage par rapport au témoin, soit la dose 2) des feuilles et des racines de jeunes plantes, cultivées en sachets (explication des doses dans le texte).

Fig. 5. Effect (averaged over four clones) of manuring at different rates with nitrogen, phosphate, potassium, magnesium, calcium and farmyard manure, on glucoside concentration (as a percentage of the control: dose 2) in leaves and roots of young plants, grown in bags (for amounts see text).

1965; MENGEL et HELAL, 1968; HELAL et MENGEL, 1968). Si le même phénomène se manifestait pour le manioc, l'influence de l'azote et celle de la potasse sur la teneur en glucoside seraient compréhensibles. Toutefois, ce que nous présentons là n'est qu'une hypothèse, dont la vérification exige une étude qui aurait dépassé le cadre de notre travail.

Il est à noter que l'influence de la potasse, étant très évidente dans nos essais, n'a pas ou presque pas été décelée dans des travaux sur d'autres plantes cyanogénétiques, par exemple le sorgho. Il est possible que dans les dits travaux, qui, d'ailleurs, se rapportent surtout aux feuilles, la potasse ait été suffisamment dis-

ponible dans le sol, de sorte qu'un apport supplémentaire n'eut aucune influence. Ainsi, dans un de nos essais, comme nous le montre la figure 5, l'influence de l'apport d'engrais potassique sur la teneur en glucoside des feuilles ne se manifeste plus à partir d'une certaine quantité de cet engrais. En revanche, les racines, tubérisées ou non, sont beaucoup plus sensibles. Or, le fait que nous avons concentré notre étude principalement sur les racines, permettait de déceler plus facilement l'influence de la potasse. De plus, nous avons effectué nos essais sur des terrains tellement pauvres en potasse que l'apport de cet élément devait se manifester assez vite.

Quant à l'influence du fumier et à celle du mélange d'engrais, nous supposons que celles-ci s'expliquent surtout par l'intermédiaire de la potasse. Une conséquence de l'apport de fumier est l'augmentation de la teneur du sol en matière organique facilement décomposable, ce qui est très important, étant donné que la fertilité de nos terrains d'expérimentation repose presque entièrement sur la présence de matière organique. Puisque la potasse est connue comme un élément très facilement lessivé, sa présence, surtout pendant la saison des pluies, doit aussi dépendre de la capacité du sol de la retenir, donc du complexe absorbant. Sur ceci nous reviendrons dans la section 7.2.6.

Nos essais sur la fertilité du sol n'ont pas décelé d'influence importante du phosphate, ni du magnésium et du calcium. Dans quelques cas seulement, ces éléments semblèrent influencer légèrement la teneur en glucoside; toutefois, en général ces influences ne sont pas significatives, et si faibles que l'on ne peut guère les prendre en considération.

Bien que l'influence de la potasse et celle de l'azote aient été démontrées clairement, il faudrait des études plus détaillées pour établir plus nettement leur rapport; l'emploi de solutions nutritives pourrait offrir des possibilités à ce sujet. En effet, nous avons pu observer que le manioc est très facile à cultiver en solution nutritive (ASJÉE, 1971).

En comparant les résultats obtenus par les essais au champ, effectués avec des plantes âgées, et ceux obtenus par les essais en pots et en sachets, effectués avec des plantes très jeunes, nous pouvons conclure qu'en général, les tendances sont identiques, bien que les influences étudiées soient plus fortement marquées dans les essais effectués en pots et en sachets que dans ceux effectués au champ. Donc, il est bien possible d'effectuer l'expérimentation avec des plantes très jeunes, au lieu d'attendre qu'elles soient plus âgées. Ceci est très important, puisque ça peut rendre plus rapide et plus efficace l'exécution des essais. Il est tout de même préférable, après avoir ainsi mis en évidence certaines influences, de les vérifier sur des plantes adultes.

6. EXPÉRIMENTATION SUR L'INFLUENCE DE LA SÉCHERESSE

6.1. INTRODUCTION

Plusieurs auteurs ont affirmé ou suggéré que la teneur en glucoside cyanogénétique augmente pendant des périodes de sécheresse. À propos du sorgho TREUB (1910) remarqua: 'partout on trouve des indications que la plante est particulièrement dangereuse pour le bétail pendant des périodes de forte sécheresse'.

Pour le manioc, NIJHOLT (1932) remarque que la toxicité des tubercules paraît être plus élevée après une période de sécheresse prolongée, sans d'ailleurs présenter des chiffres. D'après TURNOCK (1937) la teneur en glucoside des clones doux serait plus élevée pendant la saison des pluies que pendant la saison sèche; mais cet auteur, non plus, ne présente aucun chiffre. DARJANTO (1952), en comparant la toxicité des tubercules d'un champ sec avec celle d'un champ plus humide, a trouvé que la teneur en glucoside sur le champ sec était de 3 à 4 fois plus élevée que celle sur le champ humide. Il attribue la différence surtout à la sécheresse. Cependant, en se référant au même essai, BOLHUIS (1954) croit plutôt à l'influence de la fertilité du sol, puisque le champ sec était très épuisé et très déficient en potasse.

Un rapport entre la teneur en glucoside des tubercules du manioc et la sécheresse a été mis en évidence par DIDIER DE ST AMAND (1960) à Madagascar. Cet auteur a démontré que dans le cycle végétatif de la plante, portant sur deux années, il existe, pour la plupart de ses clones, deux périodes de concentration maximale en glucoside, correspondant à la saison sèche de ces années; pour certains clones la teneur en glucoside était plus élevée pendant la saison des pluies.

Le rôle de la sécheresse n'étant pas suffisamment clair pour le manioc, nous avons effectué quelques essais à ce sujet, dont deux au champ et un en sachets en plastique. Dans le présent chapitre nous discuterons aussi les résultats des essais présentés dans la section 5.3.1., en ce qui concerne la sécheresse.

6.2. ESSAIS AU CHAMP

6.2.1. *Protocole expérimental*

Le premier essai fut effectué au cours de la période 1965/66 sur un terrain de forêt défriché peu avant la plantation, le deuxième essai en 1966/67, sur le même terrain. La plantation fut effectuée au début de la saison des pluies. Quand la saison sèche commençait, les plantes étaient âgées de 7 à 8 mois. Une partie d'entre elles fut arrosée alors que l'autre partie fut soumise à la sécheresse naturelle. Nous avons arrosé en versant de l'eau entre les billons à côté des plantes, le cloisonnement des billons empêchant l'écoulement. Les plantes arrosées recevaient une quantité d'eau correspondant à 6 mm de pluie par jour, la pluie y

comprise; cette quantité dépassait légèrement l'évapotranspiration potentielle. L'arrosage fut effectué 3 fois par semaine. Les essais portaient sur les clones: Tabouca, A 13 et 461.

Premier essai:

La plantation a eu lieu au début de mai 1965. Il y avait 4 blocs, chacun représentant une répétition. Chaque bloc portait sur 2 parcelles, dont l'une fut arrosée, l'autre non. Chaque parcelle comptait 6 lots, dont 2 de chaque clone. L'arrosage fut commencé au début de janvier 1966 et prolongé jusqu'à la fin de l'essai, au début d'avril. Les caractéristiques suivantes des plantes furent déterminées: poids et nombre des tubercules, diamètre et nombre des tiges, poids des feuilles, attaque des feuilles par le virus de la mosaïque, teneur en glucoside et en eau des tubercules écorcés.

Deuxième essai:

La plantation eut lieu au début de juin 1966; l'essai fut terminé à la fin de mars 1967. Du reste le protocole expérimental était identique à celui du premier essai.

6.2.2. Résultats

Nous nous bornons ici aux résultats concernant la teneur en glucoside des tubercules écorcés. L'existence éventuelle d'une corrélation entre cette teneur et quelque autre des caractéristiques déterminées sera discutée en 9.2.2.

Le tableau 31 groupe les résultats moyens de la teneur en glucoside en fonction de l'arrosage, des deux essais, séparément pour les trois clones.

En 1966, il s'est présenté une influence de l'arrosage plus ou moins importante, mais les clones n'ont pas réagi de la même manière. D'ailleurs, les différences n'étaient pas statistiquement significatives. En 1967 l'influence de l'arrosage

TABLEAU 31. Influence de l'arrosage pendant la saison sèche sur la teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière sèche) des tubercules écorcés des clones Tabouca, A 13 et 461, pour deux périodes d'essai.

	Premier essai: 1965/66			Deuxième essai: 1966/67		
	Tabouca	A 13	461	Tabouca	A 13	461
Arrosé	106	108	555	181	140	1240
Non-arrosé	84	93	635	166	149	1340
Influence de l'arrosage (%)	+26	+16	-13	+11	-6	-7
Moyenne	95	101	595	174	145	1290
Indice	100	100	100	183	144	217

Table 31. Effect of irrigation during dry season on glucoside concentration (μg HCN per g dry weight) in peeled tuberous roots of clones Tabouca, A 13 and 461 (two experiments).

était encore plus faible. Il y a donc lieu de supposer que, dans les conditions d'Adiopodoumé, l'arrosage pendant la saison sèche ne provoque pas de différence importante dans la teneur en glucoside des tubercules écorcés. Réciproquement, on pourrait conclure que la saison sèche n'influe pas sur la teneur en glucoside, conclusion qui a été confirmée par les résultats d'autres essais (7.2.).

En comparant la teneur moyenne de 1966 et de 1967 (tableau 31), on s'aperçoit que celle de 1967 est beaucoup plus élevée que celle de 1966. Cette augmentation pourrait être fonction de l'appauvrissement du sol après un an de culture, sujet qui sera discuté ultérieurement (7.3.3.).

6.3. ESSAIS EFFECTUÉS EN POTS ET EN SACHETS EN PLASTIQUE

6.3.1. *Essais en pots*

Ces essais concernent la partie 'sécheresse' des essais présentés dans la section 5.3.1.; les résultats sont groupés dans le tableau 27 (page 50). Pour ces essais, la teneur en glucoside des plantes soumises à la sécheresse est plus élevée que celle des plantes témoins. La différence s'élève, en moyenne sur les essais, à 17% pour les feuilles et à 40% pour les racines; néanmoins, l'influence de la sécheresse n'est pas statistiquement significative dans tous les cas.

6.3.2. *Essai en sachets*

Les sachets contenaient 5 kg de terre, enrichie d'une quantité d'engrais correspondant à la dose témoin ($N_2P_2K_2Mg_2Ca_2$), utilisée dans l'essai présenté dans la section 5.3.4.1. (page 53). L'essai portait sur les clones Tabouca, A 13, Ta 25 et 461; il y avait deux répétitions. Une partie des plantes fut arrosée à dose optimale (c'est-à-dire jusqu'à saturation en eau de la terre), une deuxième partie ne reçut que deux tiers, une troisième partie qu'un tiers de cette dose. L'arrosage

TABLEAU 32. Influence de la sécheresse sur la teneur en glucoside des feuilles et des racines de jeunes plantes, cultivées en sachets, pour quatre clones.

Clones	Feuilles			Racines		
	arrosage optimal	2/3 × optimal	1/3 × optimal	arrosage optimal	2/3 × optimal	1/3 × optimal
Tabouca	100 (= 1030*)	106	108	100 (= 940*)	116	158
A 13	100 (= 540)	139	142	100 (= 450)	149	176
Ta 25	100 (= 640)	125	225	100 (= 710)	134	260
461	100 (= 1000)	95	189	100 (= 560)	138	211
Moyenne	100	116	166	100	134	201

* μg d'HCN par g de matière sèche

Table 32. Influence of drought on glucoside concentration in leaves and roots of young plants of four clones, grown in bags.

Glucoside

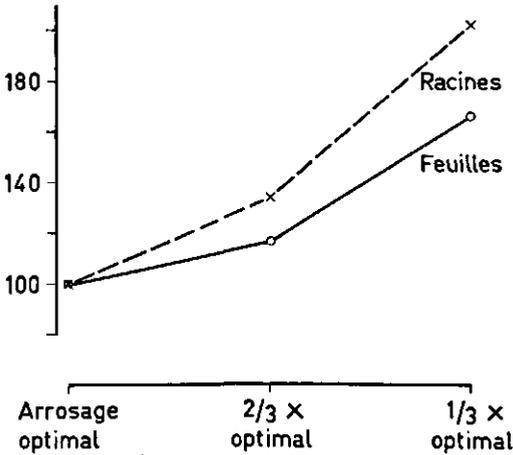


FIG. 6. Influence de la sécheresse sur la teneur en glucoside des feuilles et des racines de jeunes plantes, cultivées en sachets (en moyenne pour quatre clones).

Fig. 6. Influence of drought on glucoside concentration in leaves and roots of young plants, grown in bags (averaged over four clones).

était effectué une fois tous les trois jours. La plantation a eu lieu le 16 décembre 1967; l'essai fut terminé 9 semaines plus tard. La teneur en glucoside des feuilles et des racines fut déterminée.

Le tableau 32 groupe les résultats de l'essai. La teneur en glucoside a été exprimée par rapport à celle des plantes ayant reçu un arrosage optimal. La figure 6 illustre les résultats, obtenus par la moyenne des 4 clones. Pour tous les clones la teneur des feuilles et des racines augmentait en fonction de la sécheresse, mais cette augmentation était assez différente d'un clone à l'autre. L'influence de la sécheresse s'est montrée statistiquement significative (seuil 0,01) pour les feuilles aussi bien que pour les racines. L'effet de la sécheresse paraît être plus fort sur les racines que sur les feuilles.

6.4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats des essais au champ montrent que la teneur en glucoside des tubercules écorcés des plantes âgées d'environ 10 mois ne varie presque pas en fonction de la sécheresse.

En revanche, dans les essais en pots et en sachets, on constate que la sécheresse provoque une augmentation considérable de la teneur en glucoside dans les feuilles aussi bien que dans les racines.

La raison de cette discordance pourrait être qu'il est plus facile de provoquer une sécheresse rigoureuse dans les sachets qu'au champ, où l'eau disponible ne diminue qu'assez lentement, ce qui donne au manioc la possibilité de s'adapter à la sécheresse par sa propre faculté, c'est-à-dire, le dépouillement partiel de ses feuilles. Or, sous les conditions climatiques d'Adiopodoumé, les plantes ne souffrent pas de la sécheresse, elles s'adaptent. Il est probable qu'il faudrait une saison sèche plus rigoureuse et plus longue que celle d'Adiopodoumé pour que

les plantes en souffrent. Cela pourrait expliquer l'affirmation de DIDIER DE ST AMAND (1960) selon laquelle la teneur en glucoside augmente pendant la saison sèche, pour la plupart des clones étudiés par elle. En effet, dans la région de Madagascar où ces essais furent effectués, la saison sèche est très rigoureuse et longue; pendant 6 à 7 mois il n'y pleut pratiquement pas. On peut admettre que la plante peut s'adapter à la sécheresse jusqu'à un certain point et qu'ensuite elle commence à souffrir, ce qui provoque l'augmentation de la teneur en glucoside. Aussi peut-on admettre que les clones diffèrent entre eux en ce qui concerne leur faculté d'adaptation à la sécheresse. Or, les clones qui sont très résistants à la sécheresse ne souffrent pas pendant la saison sèche, ce qui pourrait expliquer que DIDIER DE ST AMAND n'a pas pu constater une augmentation de la teneur en glucoside pendant la saison sèche pour certains clones.

Comme il sera expliqué au Chapitre 7, nos recherches sur l'évolution de la teneur en glucoside en fonction du temps à Adiopodoumé, Bouake, Ferkéssédougou et Man n'ont donné aucun indice prouvant que la teneur des tubercules écorcés augmente pendant la saison sèche, sauf pour deux des trois clones à Ferkéssédougou (figures 7 et 8). En effet, à Ferkéssédougou la saison sèche est assez longue et rigoureuse. Toutefois, il n'est pas sûr que la dite augmentation soit due à la sécheresse; peut-être il y a-t-il aussi une influence des premières pluies après la sécheresse (cf. section 7.2.6.).

Il paraît donc qu'une augmentation de la teneur en glucoside à cause d'un manque d'eau ne se manifeste qu'après une période sèche suffisamment rigoureuse et longue, période proportionnelle à la faculté d'adaptation à la sécheresse des clones.

7. ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN GLUCOSIDE DES TUBERCULES AU COURS DE LA PÉRIODE DE VÉGÉTATION, ET DE L'INFLUENCE DE LA LOCALITÉ DE CULTURE

7.1. INTRODUCTION

Bien qu'il ait été démontré que dans les feuilles du manioc, comme dans celles d'autres plantes cyanogénétiques, la teneur en glucoside diminue en fonction de l'âge, l'évolution de la teneur dans les tubercules au cours de la période de végétation est très mal connue. Quelques auteurs ont présenté des résultats qui, d'ailleurs, ne sont pas concordants. DARJANTO (1952) constatait, pour un clone peu toxique, que la teneur en glucoside des tubercules âgés de 12 mois était supérieure à celle des tubercules de 6 mois; en revanche, un clone très toxique réagissait en sens inverse. D'après BOLHUIS (1954), GODOI a constaté dans les tubercules une teneur plus basse à l'âge de 10 mois qu'à l'âge de 4 mois et demi, pour 9 clones sur les 10 qu'il avait examinés; le dixième montrait un effet contraire. PEREIRA et al. (1960) ont comparé, pour 7 clones, la teneur en glucoside des tubercules à l'âge de 8, 9, 10 et 11 mois; et, bien qu'ils concluent l'absence de différence entre ces époques, leurs résultats indiquent que, sur l'ensemble des clones, à l'âge de 10 et 11 mois la teneur est moins élevée qu'à l'âge de 8 et 9 mois. SINHA et NAIR (1968), en déterminant mensuellement la teneur en glucoside des tubercules entre les âges de 7 et 14 mois, constataient qu'à l'âge de 9 et 10 mois la teneur était le double de celle des autres âges.

Les données ci-dessus suggèrent un rapport éventuel entre l'âge de la plante et la teneur en glucoside dans les tubercules. Cependant, il est bien possible que les variations que l'on constate au cours de la période de végétation ne sont pas dues à l'âge même, mais à l'influence des conditions écologiques. Par exemple l'influence de la sécheresse, comme il a été expliqué dans le chapitre précédent. Afin de tenter d'éclaircir cette question, nous avons étudié pendant trois ans l'évolution de la teneur en glucoside dans les tubercules écorcés en fonction du temps; ces essais furent effectués à Adiopodoumé.

En ce qui concerne l'influence de la localité de culture, il est généralement admis que la teneur en glucoside des tubercules peut varier énormément de l'un endroit à l'autre. Cette variation est attribuée à l'influence du climat et du sol, mais il n'a pas été bien étudié dans quelle mesure ces deux facteurs interviennent. Afin de rechercher la teneur en glucoside des tubercules en fonction de la localité de culture en Côte d'Ivoire, un essai comparatif a été mis en place à Adiopodoumé, Bouaké, Ferkéssédougou et Man. En tentant de distinguer l'influence du sol et celle du climat nous avons effectué des prélèvements à des époques différentes.

Puisque les essais sur l'évolution de la teneur en glucoside au cours de la période de végétation et ceux sur l'influence de la localité de culture se ressemblent beaucoup, ils ont été groupés dans le même chapitre.

7.2. ESSAIS EFFECTUÉS À ADIOPODOUMÉ

7.2.1. Introduction

L'étude portait sur trois essais que nous passerons successivement en revue dans les sections 7.2.2. à 7.2.4. Les essais couvraient la période allant d'avril 1965 à juillet 1968. Le tableau 33 fournit des données climatiques pour la période au cours de laquelle les essais ont été effectués.

Lors de l'exécution des essais nous avons pris quelques échantillons de sol sur les champs d'expérimentation; les résultats d'analyse seront discutés dans la section 7.2.5. La section 7.2.6. concernera la discussion et les conclusions.

7.2.2. Premier essai

7.2.2.1. Protocole expérimental

L'essai fut mis en place au début de mai 1965 sur un terrain de forêt fraîchement défriché. L'essai portait sur 9 blocs, chacun représentant une répétition. Chaque bloc comprenait deux parcelles, une du clone Tabouca, et une du clone Ta 25. Chaque parcelle comptait neuf lots de deux plantes; les lots étaient séparés par des plantes de bordure.

À partir du sixième mois après la plantation, soit en décembre 1965, tous les 45 jours un prélèvement fut effectué, soit au total 9 prélèvements; le dernier eut lieu en décembre 1966.

Pour chaque prélèvement, un des neuf lots de chaque parcelle fut choisi au hasard; les plantes furent arrachées et pour chacune, les caractéristiques suivantes furent déterminées:

- feuilles: virose, poids sec;
- tiges: nombre, diamètre;
- tubercules: nombre, longueur, diamètre maximal, et poids frais, des tubercules non écorcés; teneur en glucoside et pourcentage en eau, des tubercules écorcés.

Les caractéristiques autres que la teneur en glucoside, furent déterminées afin de savoir s'il existe une corrélation entre une ou plusieurs de celles-ci et la teneur en glucoside; ceci sera discuté en 9.2.2.

7.2.2.2. Résultats

Les résultats de l'essai sont présentés dans la figure 7 (premier essai); les points représentent, pour chaque période de prélèvement, la moyenne de la teneur en glucoside des tubercules écorcés sur les neuf répétitions de l'essai.

Pour le clone Tabouca, la courbe de la teneur en glucoside en fonction du temps montre que la teneur reste assez constante pendant les premiers mois. Mais, entre avril et juin il se manifeste une augmentation remarquable, la teneur passant presque du simple au double. Cette teneur se maintient jusqu'au mois de septembre, et alors commence à diminuer. L'augmentation entre avril et juin fait supposer une influence de la saison des pluies, qui commence en mai. L'augmentation de la teneur entre avril et juin, ainsi que la diminution de la teneur entre septembre et décembre, sont statistiquement significatives (seuil 0,01).

TABLEAU 33. Données climatiques d'Adiopodoumé pour la période de mai 1965 à juillet 1968, et de Bouaké, Ferkéssédougou et Man de juin 1966 à décembre 1967. Moyennes mensuelles des températures (°C) moyennes (Tmo), maximales (Tma) et minimales (Tmi) et de l'humidité relative moyenne (H); totaux mensuels des précipitations (P) en mm, et de l'insolation (I) en heures.

	Adiopodoumé 1965*										Adiopodoumé 1966*										Adiopodoumé 1967*										Adiopodoumé 1968*									
	T			H			P			I			T			H			P			I			T			H			P			I						
	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi										
janvier	26,6	31,0	22,2	83	18	163	26,2	31,5	20,8	80	2	217	26,4	30,4	21,6	84	30	221																						
février	27,6	32,0	23,2	79	23	180	27,4	31,9	22,9	78	2	217	27,2	31,0	21,4	81	144	210																						
mars	27,9	32,3	23,9	79	128	206	28,1	32,8	23,4	78	72	209	26,5	30,8	21,3	81	58	209																						
avril	27,3	31,2	23,3	79	66	208	27,5	31,5	23,6	81	90	200	27,2	31,7	22,8	79	59	201																						
mai	27,6	31,4	23,8	82	200	185	27,1	31,1	23,2	83	198	202	26,8	30,9	22,7	81	173	212																						
juin	25,2	28,3	22,1	90	698	94	25,9	29,2	22,6	86	371	134	25,5	28,6	22,4	85	150	108																						
juillet	24,3	26,8	21,7	90	679	56	23,3	28,1	22,6	86	508	123	24,2	28,1	21,4	85	192	113																						
août	24,0	27,0	21,5	88	19	79	24,5	27,2	21,8	86	25	66	23,8	26,3	21,3	87	14	44																						
septembre	24,7	27,7	21,7	87	84	93	24,7	27,6	22,0	87	59	81	24,6	27,5	21,7	86	60	44																						
octobre	25,1	28,2	22,1	83	85	150	26,1	29,3	22,9	85	132	179	25,8	29,2	22,6	83	10	172																						
novembre	26,4	29,8	22,9	84	94	165	26,5	30,4	22,7	82	119	226	26,4	30,1	22,7	82	104	227																						
décembre	25,3	29,0	21,5	84	34	146	26,6	30,9	22,4	84	13	220	26,2	30,1	22,4	87	106	219																						

* Section de Bioclimatologie, O.R.S.T.O.M.

	Bouaké 1966.67**										Ferkéssédougou 1966.67**										Man 1966.67**															
	T			H			P			I			T			H			P			I			T			H			P			I		
	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi	mo	ma	mi						
juin 1966	24,6	28,4	20,8	87	394	112	27,0	32,0	22,0	79	118	264	25,0	29,3	20,7	87	406	123																		
juillet	24,7	28,4	20,9	86	107	126	26,4	31,3	21,5	80	61	217	24,8	28,2	20,6	86	211	131																		
août	24,2	27,5	20,9	88	70	74	25,9	29,9	21,8	85	286	142	24,1	27,5	20,7	90	597	72																		
septembre	24,4	28,1	20,6	87	170	103	26,2	30,8	21,6	83	190	185	24,2	28,1	20,3	90	254	79																		
octobre	25,1	29,3	20,9	87	169	155	28,6	32,5	24,6	82	114	241	24,6	29,2	20,0	88	171	127																		
novembre	24,9	30,8	20,9	80	39	179	27,5	34,5	20,5	76	3	259	24,9	30,1	19,6	85	97	169																		
décembre	26,0	31,2	20,7	74	10	177	25,6	35,2	15,9	61	1	263	23,8	30,3	17,2	85	24	88																		
janvier 1967	25,9	32,8	19,0	39	0	255	25,0	35,9	14,0	38	0	296	22,5	32,0	13,0	70	10	194																		
février	27,6	33,4	21,7	60	59	205	28,3	37,0	19,5	45	14	221	25,9	33,8	18,0	68	7	158																		
mars	26,9	32,1	21,7	71	158	192	29,3	36,2	21,4	59	26	210	26,5	32,8	20,2	76	115	157																		
avril	26,4	31,2	21,6	77	12*	183	29,2	35,0	21,3	73	101	230	26,1	31,5	20,7	81	253	169																		
mai	26,1	30,9	21,3	79	175	230	28,6	34,8	21,0	76	68	263	25,9	30,9	20,9	83	108	203																		
juin	24,7	28,5	20,8	82	139	130	26,9	31,3	21,0	82	231	233	24,5	28,5	20,5	87	138	70																		
juillet	23,4	26,8	19,9	83	32	70	26,0	30,6	21,0	82	169	206	23,2	26,6	19,7	88	38	55																		
août	23,5	26,5	20,5	88	59	48	23,5	29,2	21,7	88	317	138	23,8	27,1	20,5	89	116	48																		
septembre	24,4	28,3	20,4	87	125	109	25,8	30,2	21,4	88	291	172	24,0	27,9	20,1	90	367	85																		

** A. S. E. C. N. A., Côte d'Ivoire

Table 33. Climatic conditions at Adiopodoumé from May 1965 to July 1968, and at Bouaké, Ferkéssédougou and Man from June 1966 to December 1967. Monthly averages of average (Tmo), maximum (Tma) and minimum (Tmi) temperatures, and of average relative humidity (H); monthly totals of precipitation (P) (mm), and insolation (I) (h).

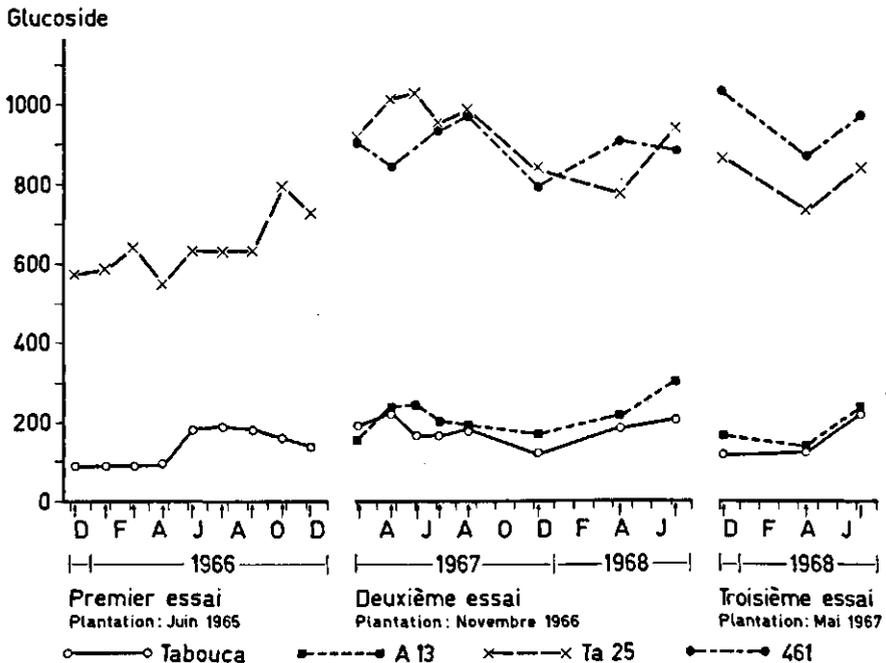


FIG. 7. Évolution de la teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière sèche) des tubercules écorcés, au cours de la période de végétation, dans trois essais, couvrant la période de juin 1965 à juillet 1968.

Fig. 7. Glucoside concentration (μg HCN per g dry weight) in peeled tuberos roots during growth in three trials, from June 1965 up to July 1968.

Pour le clone Ta 25 la courbe (figure 7) diffère de celle relative au clone Tabouca. Bien qu'il y ait une augmentation entre avril et juin, celle-ci est relativement moins importante que celle présentée par le clone Tabouca, et statistiquement non significative. Par ailleurs, entre septembre et octobre, cette courbe présente une augmentation plus importante, celle-ci étant significative (seuil 0,05). Sur l'ensemble des 9 prélèvements, l'augmentation en fonction du temps de la teneur en glucoside du clone Ta 25 s'est montrée statistiquement significative (seuil 0,01).

7.2.3. Deuxième essai

7.2.3.1. Protocole expérimental

L'essai fut mis en place à la mi-novembre 1966, sur un terrain en jachère depuis le défrichement de la forêt un an et demi auparavant. Le dispositif expérimental était différent de celui du premier essai. L'essai portait sur les clones: Tabouca, A 13, Ta 25 et 461. Il comprenait 16 blocs, chacun représentant une répétition. Chaque bloc comptait 9 lots et chaque lot comprenait 4 plantes, une de chaque clone. Les lots étaient séparés l'un de l'autre par des plantes de bordure.

Nous avons effectué 9 prélèvements: sur des plantes de 3 mois et demi, 5 mois, 6 mois et demi, 7 mois et demi, 9, 13, 17 et 20 mois; le premier prélèvement a eu lieu en mars 1967, le dernier en juillet 1968. Pour chacun des prélèvements, dans chaque bloc un lot fut choisi au hasard. Pour chacune des plantes furent déterminés le poids des tubercules, ainsi que la teneur en glucoside des tubercules écorcés.

7.2.3.2. Résultats

La figure 7 (deuxième essai) présente les courbes représentatives de l'évolution de la teneur en glucoside des tubercules écorcés en fonction du temps. La teneur en glucoside se montre assez variable lors de la période de végétation, mais, sur l'ensemble des résultats, nous ne voyons pas de changement important de cette teneur en fonction du temps.

La teneur en glucoside des clones Tabouca et Ta 25 dans cet essai est supérieure à celle des mêmes clones dans le premier essai (cf. figure 7), soit en moyenne de 37% pour Tabouca et de 45% pour Ta 25.

7.2.4. Troisième essai

7.2.4.1. Protocole expérimental

Cet essai a été mis en place à la mi-mai 1967, dans l'intention de comparer l'évolution de la teneur en glucoside en fonction du temps dans ce nouvel essai à l'évolution dans l'essai précédent. Cette fois les plantes étaient donc plus âgées de 6 mois. Le dispositif expérimental était identique à celui du deuxième essai. Le terrain était également comparable: en jachère depuis deux ans après l'abatage de la forêt. Trois prélèvements furent effectués, coïncidant avec les 3 derniers prélèvements du deuxième essai: en décembre 1967, et en avril et juillet 1968.

7.2.4.2. Résultats

Les résultats (figure 7, troisième essai) montrent qu'entre décembre 1967 et avril 1968, la teneur en glucoside diminue pour tous les clones, sauf pour Tabouca; mais, ce n'est que pour A 13 que cette diminution est significative (seuil 0,01). Entre avril et juillet, pour tous les clones, la teneur augmente d'environ 100 unités. Cette augmentation est relativement très importante pour Tabouca (+ 81%) et pour A 13 (+ 72%).

Les résultats du deuxième et du troisième essai ne sont pas du tout concordants en ce qui concerne la période de décembre 1967 à avril 1968. En revanche, entre avril et juillet nous constatons une augmentation de la teneur dans les deux essais.

7.2.5. Évolution de la fertilité du sol

Afin de savoir si la teneur en glucoside des plantes est liée aux propriétés chimiques du sol, nous avons prélevé dans le premier essai, en décembre 1965, peu après le premier prélèvement, 12 échantillons de sol sur le profil: 0-20 cm. Six furent prélevés à côté des plantes dont la teneur en glucoside était la plus

TABLEAU 34. Propriétés chimiques des sols au cours des essais sur l'évolution de la teneur en glucoside en fonction du temps.

	Premier essai		Deuxième essai						Troisième essai						
	décembre 1965		1966		1967		1967								
	(a)	(b) moy- enne	nov.	janv.	mars	avril	juin	juill.	août	moy- enne	mai	juill.	août	moy- enne	
Matière organique:															
M.O. totale ‰	21,4	25,5	23,5	17,9	19,5	20,9	16,6	16,2	15,0	12,8	14,3	14,3	13,1	12,4	13,3
Carbone ‰	12,5	14,8	13,6	10,4	11,3	12,1	9,6	9,4	8,7	7,4	9,9	8,3	7,6	7,2	7,7
Azote ‰	0,71	0,88	0,80	0,71	0,84	0,89	0,68	0,72	0,60	0,56	0,72	0,69	0,59	0,58	0,62
C/N	17,6	17,4	17,5	14,7	13,4	13,6	14,1	13,0	14,4	13,2	13,9	12,1	13,0	12,4	12,5
P ₂ O ₅ total ‰	0,499	0,560	0,530	0,514	0,546	0,574	0,450	0,466	0,487	0,510	0,507	0,402	0,435	0,427	0,421
Complexe adsorbant (meq %):															
Ca	1,84	2,15	2,00	1,69	1,45	1,59	1,20	1,80	1,50	1,65	1,56	1,80	1,71	1,60	1,70
Mg	0,28	0,54	0,41	0,84	0,79	0,87	0,71	0,82	0,80	0,70	0,79	0,70	0,74	0,62	0,69
K	0,06	0,08	0,07	0,05	0,07	0,06	0,04	0,07	0,04	0,04	0,05	0,05	0,04	0,03	0,04
Na	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,04	0,03	0,07	0,02	0,02	0,04	0,04	0,02	0,02	0,03
Somme des bases échangeables	2,19	2,78	2,49	2,60	2,36	2,56	1,98	1,76	2,36	2,41	2,44	2,59	2,51	2,27	2,45
Capacité d'échange	5,02	5,66	5,34	4,88	4,65	4,84	4,49	5,08	5,41	6,08	5,07	5,25	5,22	6,72	5,72
Taux de saturation (%)	43,6	49,1	46,4	53,3	50,8	52,9	44,1	54,3	43,6	39,6	47,4	49,3	48,1	33,8	43,7
pH (H ₂ O)	5,4	5,6	5,5	5,9	5,6	5,6	5,5	5,8	6,2	5,7	5,8	6,0	5,9	5,8	5,9

(a) échantillons prélevés à côté des plantes à teneur en glucoside très élevée

(b) échantillons prélevés à côté des plantes à teneur en glucoside peu élevée

Table 34. Chemical properties of the soil during trials on glucoside concentration as a function of time.

élevée, et 6 à côté des plantes dont cette teneur était inférieure de moitié. Les résultats des analyses figurent dans le tableau 34.

Le sol prélevé à côté des plantes ayant une teneur en glucoside très basse, semble être plus riche en éléments nutritifs et en matière organique, que celui prélevé à côté des plantes plus riches en glucoside; néanmoins, les différences n'étaient pas statistiquement significatives, sauf pour la teneur en magnésium (seuil 0,05). Quoiqu'il en soit, les résultats moyens donnent une idée des propriétés chimiques du sol en question.

Dans le deuxième essai nous avons pris des échantillons de sol en novembre 1966, moment de la plantation, puis en janvier, mars, avril, juin, juillet et en août 1967. Les échantillons furent constitués en mélangeant 50 prises de terre (profil: 0-20 cm) réparties uniformément sur le champ d'expérimentation. Les résultats sont groupés dans le tableau 34.

Dans le troisième essai nous avons pris un échantillon de sol en mai, en juillet et en août 1967, en procédant comme au deuxième essai. Les résultats des analyses figurent également dans le tableau 34.

La richesse moyenne des sols du deuxième et du troisième essai n'est pas très différente. Au contraire, il est évident que le sol du premier essai est beaucoup plus riche que celui des deux autres. La teneur moyenne en matière organique s'élève à 2,35% dans le sol du premier essai et à 1,43% dans celui du deuxième. La répartition des bases échangeables est assez différente. Le fait que la teneur en magnésium dans le deuxième et dans le troisième essai soit presque le double de celle relevée dans le premier essai, semble difficile à expliquer. La teneur en potasse échangeable est très basse dans les deux cas, mais celle du premier essai paraît être la plus élevée.

Il est connu, qu'après le défrichement de la forêt ou de la jachère sous des conditions climatiques comme celles de la Côte d'Ivoire, la fertilité du sol diminue rapidement. Cette diminution de la fertilité est en relation étroite avec la destruction de la matière organique qui a été libérée lors du défrichement. La décomposition se déroule très vite, surtout au début. Au Ghana, CUNNINGHAM (1963) a trouvé qu'en un an et demi, à la suite du défrichement de la forêt, la teneur en carbone organique du sol tombait de 1,90% à 1,30% sur un terrain modérément exposé au soleil.

L'évolution de la matière organique au cours du deuxième essai montre qu'il se manifeste d'abord une augmentation, puis une diminution importante. CUNNINGHAM a constaté le même phénomène en étudiant l'évolution de la fertilité d'un sol de forêt après défrichement; il l'explique par le fait que les grandes racines ne s'intègrent à l'échantillon qu'après leur décomposition. Dans notre essai l'augmentation de la teneur en matière organique peut s'expliquer de la même façon: la matière organique, fournie par la jachère, ne s'incorpore à l'échantillon qu'après décomposition partielle.

7.2.6. Discussion et conclusions

Nous supposons que la différence observée entre la teneur en glucoside du premier essai et celle des deux autres, pour les clones Tabouca et Ta 25 (figure 7),

est en relation avec la fertilité du sol, et spécialement, avec sa richesse en potasse. Nous avons été amenés à cette supposition par le fait que le sol, dans le deuxième et le troisième essai est beaucoup plus pauvre qu'au premier essai (cf. tableau 34) et en considérant que nos recherches (Chapitre 5) ont décelé une influence nette de la richesse du sol en potasse et en fumier (matière organique). Comme il a été mentionné, les terrains des trois essais se situaient l'un à côté de l'autre et provenaient d'un défrichement de la forêt en février 1965. La teneur en azote n'est pas très différente pour les trois essais. Bien que la teneur en potasse soit la plus élevée dans le premier essai, la différence absolue n'est pas importante. Étant donné que la teneur en potasse de nos terrains était très faible, la disponibilité de cet élément pour les plantes dépend surtout de la quantité qui en est libérée par suite de la décomposition de la matière organique. Donc, nous supposons que l'appauvrissement du terrain en matière organique a contribué de façon importante à l'augmentation de la teneur en glucoside des tubercules du deuxième et du troisième essai par rapport au premier essai.

On peut s'attendre à ce que l'appauvrissement le plus important se soit déroulé dans la période immédiatement après le défrichement, donc lors du premier essai. Ceci pourrait expliquer que l'augmentation importante de la teneur en glucoside en fonction du temps, ne s'est manifestée qu'au cours de cet essai.

Nous avons vu que lors du premier essai, la teneur en glucoside des tubercules du clone Tabouca augmenta subitement au début de la saison des pluies; chez Ta 25 l'augmentation s'est déroulée graduellement, mais surtout lors de la petite saison des pluies. Une augmentation de la teneur en glucoside des tubercules au début de la saison des pluies se manifeste plus souvent; par exemple en 1968, entre avril et juin, la teneur s'élève dans la plupart des cas (figure 7), cette augmentation étant relativement très importante pour A 13 dans les deux essais, et pour Tabouca dans le troisième essai. Il nous semble donc que l'arrivée des pluies pourrait avoir une influence sur l'évolution de la teneur en glucoside.

Comment cette relation avec la saison des pluies pourrait-elle être expliquée? On peut admettre qu'après le défrichement de la forêt, surtout dans un sol pauvre en argile, la quantité d'éléments libérés lors de la destruction de la matière organique dépassera largement la quantité qui peut être liée au complexe absorbant; ainsi une partie se trouvera à l'état libre dans la solution du sol. Dès que les grandes pluies arrivent, une bonne partie des éléments libres seront lessivés. GODEFROY et al. (1970) ont démontré que dans un sol de bananeraie en basse Côte d'Ivoire, pratiquement toute la fumure potassique et azotée, apportée avant ou pendant la saison des pluies, était perdue par lixiviation (autrefois appelée: lessivage) lors des grandes pluies. Donc, on peut très bien imaginer que, lors de la saison des pluies il se manifeste un manque de potasse, d'autant plus important que le manioc en est grand consommateur, et que les besoins des plantes deviennent plus grands en raison de leur forte croissance après les pluies. Or, en fonction du manque de potasse, la teneur en glucoside devrait s'élever. Seulement, nous savons que la teneur en glucoside dépend également de la quantité d'azote dans le sol, et que l'azote et la potasse ont une influence opposée sur la teneur en glucoside. L'azote, surtout sous forme de nitrate, est

lixivié aussi facilement que la potasse. Donc, on ne peut s'attendre à une augmentation de la teneur en glucoside que quand les pertes en potasse sont relativement plus importantes que celles en azote. Il est bien possible que la cyanogénèse de la plante est plus sensible à la lixiviation de la potasse qu'à celle de l'azote, étant donné que la teneur en potasse dans nos terrains est extrêmement faible.

Mais il y a un autre facteur qui pourrait être en relation avec l'augmentation de la teneur en glucoside au début de la saison des pluies. En effet, il a été démontré que la nitrification de la matière organique décomposée pendant la saison sèche se déroule à un taux très élevé par suite des premières pluies (BIRCH, 1960; NYE et GREENLAND, 1960). D'après BIRCH cette nitrification est proportionnelle à la durée de la saison sèche et à la quantité de matière organique dans le sol, et elle peut mener à une augmentation sensible de la quantité d'azote disponible pour la plante. Cet azote sera certainement lixivié au cours de la saison des pluies; mais auparavant il pourrait bien avoir une influence sur la cyanogénèse.

Les résultats de nos essais ne donnent aucun indice de l'existence d'une relation directe entre l'âge des plantes et la teneur en glucoside des tubercules. Il nous semble fort probable que les fluctuations de la teneur en glucoside des tubercules qui se manifestent au cours de la période de végétation, sont plutôt dues aux changements des conditions écologiques qu'à l'âge de la plante.

7.3. ESSAI COMPARATIF EFFECTUÉ À ADIOPODOUMÉ, BOUAKÉ, FERKÉSSÉDOUGOU ET MAN

7.3.1. *Protocole expérimental*

L'essai portait sur les clones: Tabouca, Ta 25 et 469. La teneur en glucoside des tubercules du clone 469 est intermédiaire entre celles de Tabouca et de Ta 25.

Les conditions climatiques ont déjà été présentées dans la section 3.1.2. et la nature des sols a été relevée dans la section 3.1.3.

Avant l'essai, les terrains étaient utilisés comme suit:

Adiopodoumé: terrain de forêt défriché au début de 1965, culture de manioc d'août 1965 à avril 1966.

Bouaké: terrain de jachère naturelle, défriché en 1965; culture de riz sec en 1965.

Ferkéssédougou: terrain de jachère naturelle de 15 ans, défriché en avril 1966.

Man: culture de café pendant 25 ans, avec *Tithonia* comme plante de couverture.

Le café a été enlevé en 1964, le *Tithonia* en 1965. Culture de riz sec en 1965.

Les dates de plantation furent respectivement pour Adiopodoumé, Bouaké, Ferkéssédougou et Man: 25 mai, 2 juin, 31 mai et 3 juin 1967.

Les boutures utilisées étaient tout à fait comparables et originaires d'Adiopodoumé.

Le dispositif expérimental était identique pour les quatre localités. Il y avait 15 blocs, chacun représentant une répétition de l'essai. Chaque bloc comptait 3 parcelles, une de chaque clone. Chaque parcelle comptait 25 pieds, dont 4 utiles, séparés l'un de l'autre par une bordure du clone Tabouca.

Nous avons effectué les prélèvements au début des mois de décembre 1966, et de mars, juin et septembre 1967, les plantes étant âgées respectivement de: 6, 9, 12 et 15 mois. À chaque époque, les prélèvements furent effectués au cours d'une semaine, à deux jours d'intervalle, chaque fois dans le même ordre: Adiopodoumé, Man, Ferkéssédougou, Bouaké.

Pour le prélèvement, il fut procédé comme suit: dans chacune des parcelles, un des 4 lots fut choisi au hasard, la plante fut enlevée et les caractéristiques suivantes furent déterminées:

- tiges: nombre, longueur maximale, diamètre, poids sec;
- feuilles: virose, poids sec;

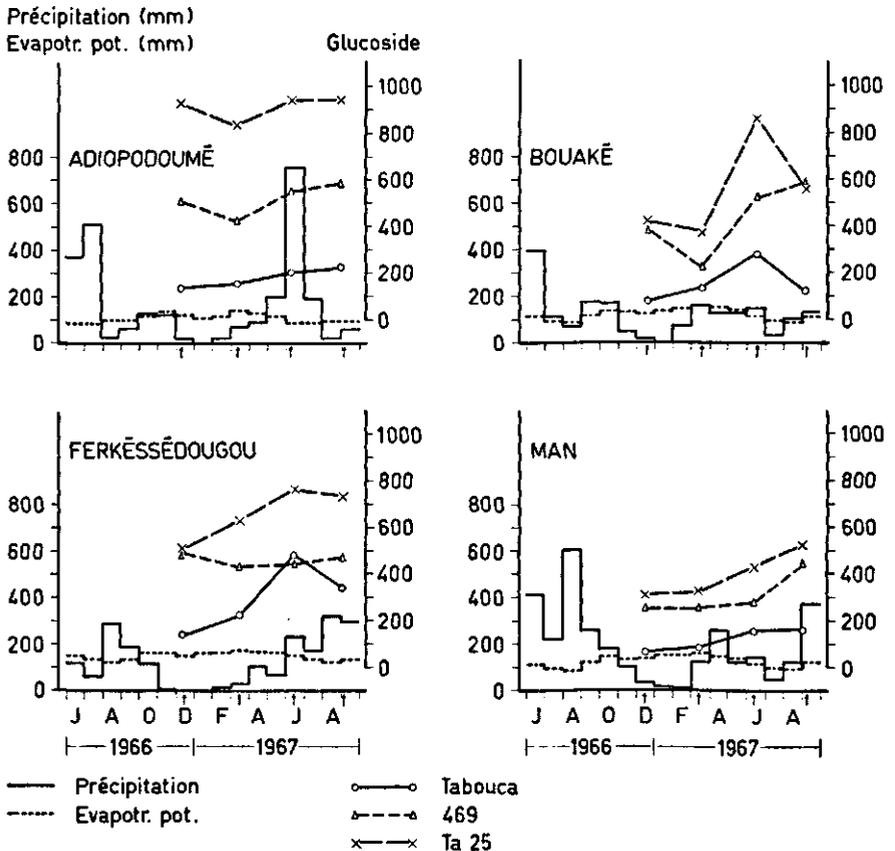


FIG. 8. Évolution de la teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière sèche) des tubercules écorcés, de trois clones, au cours de la période de végétation, mise en parallèle avec la quantité d'eau disponible (précipitation) et demandée (évapotranspiration potentielle) à Adiopodoumé, Bouaké, Ferkéssédougou et Man.

Fig. 8. Glucoside concentration (μg HCN per g dry weight) in peeled tuberos roots of three clones during growth, plotted against available water (precipitation) and needed water (potential evapotranspiration) at Adiopodoumé, Bouaké, Ferkéssédougou and Man.

- tubercules: poids, nombre, diamètre maximal moyen, et longueur moyenne, des tubercules non écorcés; pourcentage en eau et teneur en glucoside, des tubercules écorcés.

Pendant la tournée, nous avons conservé les échantillons des tubercules dans des glacières bien isolées et refroidies par des morceaux de glace. Dès notre retour à Adiopodoumé, les échantillons furent mis au réfrigérateur à -15°C dans l'attente des dosages, qui furent effectués dans un délai de quelques jours.

Au moment de la plantation, puis à chaque prélèvement, nous avons prélevé un échantillon du sol à chaque localité. Les échantillons furent constitués en mélangeant 50 prises de terre du profil de 0-20 cm, réparties uniformément au champ d'expérimentation.

TABLEAU 35. Évolution, pendant la période de végétation, de la teneur en glucoside des tubercules écorcés de trois clones, dans quatre localités de culture.

Localités	Clones	Époques de prélèvement				moyenne
		décembre 1966	mars 1967	juin 1967	septembre 1967	
Adiopodoumé	Tabouca	78	85	112	123	100
	469	98	82	107	112	100
	Ta 25	101	92	103	103	100
	moyenne	92	86	107	113	100
Bouaké	Tabouca	41	76	160	121	100
	469	91	51	123	135	100
	Ta 25	75	68	156	102	100
	moyenne	69	65	146	119	100
Ferkéssédougou	Tabouca	48	75	162	114	100
	469	107	94	96	102	100
	Ta 25	75	96	116	113	100
	moyenne	77	88	125	110	100
Man	Tabouca	54	71	134	138	100
	469	83	82	91	145	100
	Ta 25	77	80	108	134	100
	moyenne	71	76	111	139	100
Moyenne	Tabouca	55	77	142	124	100
	469	95	77	104	124	100
	Ta 25	82	84	121	113	100
	moyenne générale	77	79	122	120	100

Table 35. Glucoside concentration in peeled tuberous roots during growth of three clones in the four regions.

7.3.2. Résultats

Ici nous nous bornons à considérer la teneur en glucoside. Il sera envisagé en 9.2.2. l'existence éventuelle de corrélation entre la teneur en glucoside et les autres caractéristiques déterminées. Les différents relevés de la teneur en glucoside des tubercules écorcés sont présentés graphiquement dans la figure 8. La même figure présente un graphique parallèle concernant les précipitations mensuelles et les évapotranspirations potentielles mensuelles pour les 4 localités.

Les résultats montrent que, dans toutes les localités, et pour tous les clones, il se manifeste une augmentation de la teneur en glucoside entre mars et juin, donc au début de la saison des pluies. Mais les variations entre décembre et mars, et entre juin et septembre, ne présentent pas d'uniformité.

Pour faciliter la comparaison des résultats, nous avons exprimé les teneurs en glucoside par rapport à la moyenne des teneurs des quatre prélèvements, celle-ci étant fixée à 100; le tableau 35 groupe ces chiffres. Partant des moyennes des données du tableau 35, nous avons pu établir deux graphiques (figures 9A et 9B) sur l'évolution de la teneur en glucoside en fonction du temps: dans la figure 9A nous avons tracé la courbe représentative pour chaque localité, de la teneur moyenne entre les trois clones, alors que la figure 9B représente pour chaque clone l'évolution de la teneur moyenne sur les quatre localités. Ces figures montrent avec évidence que dans la période de mars à juin, la teneur en glucoside de tous les clones et dans toutes les localités augmente considérablement. Le tableau 35 montre qu'entre mars et juin la moyenne générale de l'essai s'élève de 79 à 122, alors qu'entre décembre et mars, et entre juin et septembre, cette moyenne ne subit aucun changement.

Glucoside

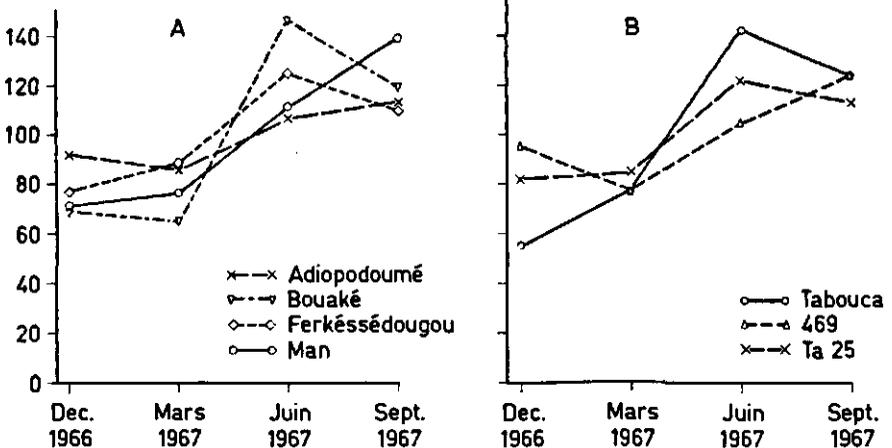


FIG. 9. Courbes représentatives de l'évolution de la teneur en glucoside des tubercules écorcés au cours de la période de végétation, en moyenne pour les trois clones (A), et en moyenne pour les quatre localités (B) (cf. tableau 35).

Fig. 9. Glucoside concentration in peeled tuberculous roots during growth, averaged over the three clones (A) and over the four localities (B) (cf. table 35).

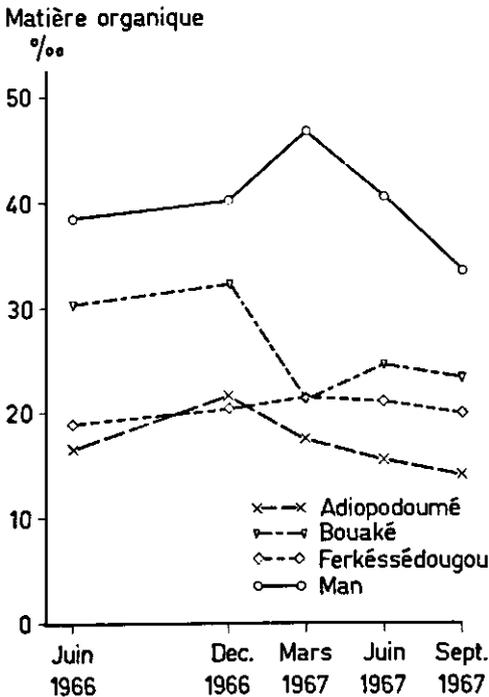


FIG. 10. Évolution de la matière organique totale du sol en fonction du temps, à Adiopodoumé, Bouaké, Ferkéssédougou et Man.

Fig. 10. Organic matter content of soil during comparative trials in Adiopodoumé, Bouaké, Ferkéssédougou and Man.

Les propriétés chimiques des sols, moyennes de 5 prélèvements dans chaque localité, sont groupées dans le tableau 2 (page 12). Les résultats des analyses de sol n'ont pas montré une évolution importante en fonction du temps, sauf en ce qui concerne la teneur en matière organique; cette évolution est présentée dans la figure 10. Pour chaque sol la teneur augmente légèrement au début de la période de végétation, passe par un maximum entre décembre et mars, puis diminue considérablement, sauf à Ferkéssédougou. En 7.2.5. nous avons déjà discuté cette évolution de la matière organique dans le sol.

7.3.3. Discussion et conclusions

Nos résultats (figure 8) confirment l'affirmation d'autres auteurs selon laquelle la toxicité d'un même clone peut varier considérablement suivant la localité de culture. Il apparaît aussi comme évident, que les variations observées dépendent non seulement de la localité considérée, mais encore de la nature des clones. Par exemple, les résultats de décembre 1966 montrent qu'entre Ferkéssédougou et Adiopodoumé, la teneur en glucoside des clones Tabouca et 469 ne varie guère, alors que pour le Ta 25, elle varie du simple au double. Pour la même période de prélèvement, entre Bouaké et Ferkéssédougou, la teneur du clone Tabouca varie aussi du simple au double, mais celle des clones Ta 25 et 469 ne subit que des variations nettement inférieures.

Nous avons mis en évidence, une fois de plus, l'existence d'une relation entre les propriétés chimiques du sol et la teneur en glucoside des tubercules. En

effet, si nous comparons les sols des quatre localités considérées (tableau 2, page 12), quant à leur richesse en matière organique et en argile, et à leur capacité d'échange, nous obtenons le classement suivant, du moins riche au plus riche:

Adiopodoumé	—	sol pauvre
Bouaké	}	sols moyennement riches
Ferkéssédougou		
Man	—	sol riche

Or, si nous considérons la teneur moyenne en glucoside des trois clones à Adiopodoumé (A), Bouaké (B), Ferkéssédougou (F) et Man (M), nous obtenons le résultat suivant:

Tabouca:	F (290)	—	A (180)	—	B (170)	—	M (110)
469:	A (515)	—	F (455)	—	B (420)	—	M (300)
Ta 25:	A (915)	—	F (655)	—	B (555)	—	M (340)

Ce qui nous révèle que la teneur est la plus élevée à Adiopodoumé et la plus basse à Man, donc, que c'est sur le sol le plus riche que les plantes sont les moins toxiques.

En ce qui concerne l'augmentation de la teneur en glucoside entre mars et juin, nous supposons qu'elle est en relation avec l'arrivée de la saison des pluies, relation qui dépend de l'équilibre entre les exigences de la plante en éléments nutritifs, surtout en potasse et en azote, et la disponibilité de ces éléments dans le sol, comme il a été discuté en 7.2.6.

Quant à l'évolution de la teneur en glucoside pendant la saison sèche, dans la section 6.4. nous avons déjà discuté les résultats relatifs au présent chapitre.

La figure 9B montre que l'évolution de la teneur en glucoside en fonction du temps, en moyenne sur les quatre localités, n'est pas uniforme pour les trois clones. Entre décembre et mars, la teneur moyenne de Tabouca augmente de 45 %, celle de 469 diminue de 18 % et celle de Ta 25 reste à peu près la même. Entre mars et juin la teneur des trois clones s'élève de façon importante, surtout pour le clone Tabouca. Entre juin et septembre la teneur de Tabouca et de Ta 25 diminue, et celle de 469 continue à augmenter. On dirait que le clone 469 réagit avec un peu de retard sur les changements climatiques.

Bien qu'il soit évident que la variation de la teneur en glucoside d'une localité à l'autre est en relation étroite avec la fertilité du sol, il y a d'autres facteurs qui jouent un rôle plus ou moins important. Nous n'avons étudié que la sécheresse et la lumière (Chapitre 8). Mais on connaît très peu de choses sur les influences de facteurs divers comme la température et l'humidité relative. HART et CRANKSHAW (1969) notent qu'il y a une relation entre la température et la teneur en glucoside.

Pour bien pouvoir discerner les influences des différents facteurs écologiques, surtout ceux d'ordre climatique, il est évident que des expériences sous des conditions bien contrôlées sont nécessaires. L'expérimentation en phytotron, avec de jeunes plantes, pourrait certainement offrir des possibilités à ce sujet.

8. INFLUENCE DE LA LUMINOSITÉ - FLUCTUATION QUOTIDIENNE DE LA TENEUR EN GLUCOSIDE DES FEUILLES

8.1. INTRODUCTION

D'après DILLEMANN (1958), plusieurs auteurs ont établi que la teneur en glucoside cyanogénétique des feuilles diminue à l'obscurité et augmente après des périodes d'ensoleillement. Bien que ceci soit vrai pour des périodes de plusieurs jours, les opinions sont divergentes quant à la fluctuation quotidienne de la teneur. TREUB (1907) n'a pas pu en constater dans les feuilles du *Phaseolus lunatus* ni de l'*Indigofera galeoides*, alors qu'il a constaté une légère augmentation au milieu de la journée pour le *Passiflora minima*. ROSENTHALER (1927) et STEKELLENBURG (1931) n'ont pu déceler aucune fluctuation quotidienne dans le *Prunus laurocerasus*, ni HOGG et AHLGREN (1942) dans le *Sorghum vulgare*. LÉEMANN (1935) a trouvé plus de glucoside le matin que dans l'après-midi dans l'*Eustachys paspaloides*. DE WAAL (1942) a constaté que dans les feuilles du *Trifolium repens*, il se présente une augmentation au début de la journée, puis une diminution, et que pendant la nuit, la teneur s'élève de nouveau. Pour le manioc, DIDIER DE ST AMAND (1960) a trouvé que, pour deux clones, la teneur en glucoside, par rapport au poids frais, des feuilles cueillies à la fin de la journée, était plus élevée de 44 % et de 88 % que celle des feuilles cueillies à la fin de la nuit. Pour le lin, TRIONE (1960) a constaté, dans de jeunes plantes élevées en phytotron avec une photopériode de 12 heures, qu'à la fin de la période de lumière la teneur en glucoside des feuilles était plus élevée qu'après la période d'obscurité.

Très peu de travaux ont été effectués sur l'influence du taux d'ensoleillement sur la teneur en glucoside. Est ce qu'il y a une relation entre l'ensoleillement moyen et la teneur en glucoside des plantes? TRIONE (1960) a établi qu'au cours de leur croissance, des jeunes plantes de lin, élevées en phytotron, contenaient plus de glucoside à mesure que s'élevait l'intensité lumineuse. HART et CRANKSHAW (1969) notent que, pour le manioc, il existe une corrélation entre l'insolation et la teneur en glucoside.

Nous avons effectué trois essais sur l'influence de la luminosité, par application ou non d'un ombrage à des plantes élevées en pots ou en sachets en plastique. Il s'agit de la partie 'ombrage' des deux essais présentés dans la section 5.3.1., puis d'un troisième essai effectué plus tard.

De plus, nous avons effectué trois essais sur l'évolution de la teneur en glucoside dans les feuilles au cours de la journée: deux en mars 1970, puis un en juillet 1970.

8.2. INFLUENCE DE L'OMBRAGE

8.2.1. Premier et deuxième essai

Le protocole expérimental de ces essais a été expliqué dans la section 5.3.1.2. (page 49). Les résultats sont groupés dans le tableau 27 (page 50).

Les feuilles des plantes ombragées ont une teneur en glucoside respectivement de 10% et de 17% plus élevée que celle des plantes non ombragées.

Pour les racines, les résultats des deux essais sont contradictoires: dans le premier, la teneur des racines des plantes ombragées est de 17% plus élevée que celle des plantes non ombragées, alors que dans le deuxième essai, on constate une différence de 9% dans l'autre sens.

Remarquons que l'analyse statistique a révélé la valeur non significative de ces différences, sauf en ce qui concerne celle de 17% pour les feuilles dans le deuxième essai.

8.2.2. Troisième essai

Cet essai fut effectué en sachets en plastique contenant 5 kg de terre, enrichie d'un apport d'engrais correspondant à la dose témoin: $N_2P_2K_2Mg_2Ca_2$, définie dans la section 5.3.4.1. (page 53). L'essai portait sur les clones: Tabouca, A 13, Ta 25 et 461; il y avait 2 répétitions. Les plantes furent ombragées à l'aide de nattes en limbes de palmier. Il y avait trois degrés d'ombrage:

- témoin, pas d'ombrage;
- 35% d'ombrage (c'est-à-dire: surface transmettante des nattes: 65%);
- 70% d'ombrage.

La plantation eut lieu le 16 décembre 1967; l'essai fut terminé 8 semaines plus tard. La teneur en glucoside des feuilles et celle des racines furent déterminées. Le tableau 36 groupe les résultats pour les 4 clones. La figure 11 présente graphiquement le résultat moyen des clones. Les teneurs en glucoside ont été

TABLEAU 36. Influence de l'ombrage sur la teneur en glucoside des feuilles et des racines de jeunes plantes, cultivées en sachets, pour quatre clones.

Clones	Feuilles			Racines		
	ombrage (%)			ombrage (%)		
	0	35	70	0	35	70
Tabouca	100 (= 1430*)	111	131	100 (= 53**)	80	68
A 13	100 (= 1160)	111	118	100 (= 53)	49	57
Ta 25	100 (= 1140)	113	140	100 (= 55)	55	65
461	100 (= 1360)	131	149	100 (= 64)	105	82
Moyenne	100	117	138	100	72	68

* μg d'HCN par g de matière sèche

** μg d'HCN par g de matière fraîche

Table 36. Influence of shade on glucoside concentration in leaves and roots of young plants of four clones, grown in bags.

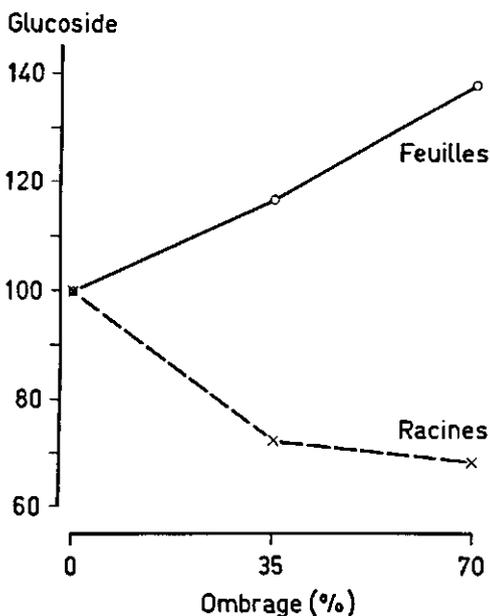


FIG. 11. Influence de l'ombrage sur la teneur en glucoside des feuilles et des racines de jeunes plantes, cultivées en sachets (en moyenne pour quatre clones).

Fig. 11. Influence of shade on glucoside concentration in leaves and roots of young plants, grown in bags (averaged over four clones).

exprimées par rapport à celles des témoins. Pour les feuilles, les résultats concernent la teneur en glucoside par rapport au poids sec, pour les racines celle par rapport au poids frais, la quantité de racines étant trop réduite pour en déterminer également la teneur en eau.

Les résultats montrent que la teneur en glucoside, en fonction de l'ombrage, augmente dans les feuilles, mais, au contraire, diminue dans les racines.

L'effet de l'ombrage s'est révélé statistiquement significatif (seuil 0,01), pour les feuilles ainsi que pour les racines. Les différents clones n'ont pas réagi avec la même intensité à l'ombrage (tableau 36) mais l'interaction entre les clones et l'ombrage n'est pas significative.

8.2.3. Conclusions

Les essais sur l'ombrage n'ont pas été répétés assez souvent pour en tirer des conclusions définitives. Néanmoins, les résultats permettent de supposer que la teneur en glucoside des feuilles est plus élevée dans les plantes ombragées que dans les plantes non ombragées. De plus, il semble évident que l'ombrage a, sur les racines, une influence opposée à celle qu'elle a sur les feuilles; pour le moment nous ne disposons pas de données permettant d'expliquer ce phénomène.

Nos résultats contredisent l'affirmation courante selon laquelle la teneur en glucoside des feuilles serait moins élevée quand la luminosité est moins forte. Mais il nous faut reconnaître que nos plantes ont reçu de l'ombrage pendant toute la période de végétation. Néanmoins, nos observations ne correspondent pas à celles de TRIONE (1960), concernant le lin, pour qui la teneur en glucoside des feuilles serait en relation positive avec la luminosité pendant la croissance des plantes.

8.3. FLUCTUATION QUOTIDIENNE DANS LES FEUILLES

8.3.1. Premier essai

L'essai fut effectué avec 10 feuilles de plantes de 12 mois du clone Ta 25, les feuilles ayant 9 lobes chacune. Au cours de deux jours consécutifs, à 6 h, 12 h et 18 h, et le troisième jour à 6 h, un lobe de chacune des feuilles fut pris au hasard; cela nous a permis de constituer pour chacun des 7 prélèvements un échantillon de 10 lobes, dont nous avons déterminé la teneur en glucoside.

Le tableau 37 (premier essai) résume les conditions climatiques concernant la pluie et l'insolation, pendant l'essai et les 5 jours qui l'ont précédé.

La figure 12 présente graphiquement l'évolution de la teneur en glucoside par rapport aux poids frais et sec, au cours de l'essai; les teneurs ont été exprimées par rapport à celle du premier prélèvement. Nous voyons que la teneur en glucoside par rapport au poids frais, ne varie pas beaucoup au cours de la journée; on observe une légère augmentation au début de la journée. En revanche, la teneur par rapport au poids sec diminue pendant la journée et augmente pendant

TABLEAU 37. Données sur la pluie (mm) et sur l'insolation (heures), relatives aux essais sur la fluctuation quotidienne de la teneur en glucoside dans les feuilles (Fournies par la Section de Bioclimatologie, O.R.S.T.O.M.).

Premier essai (18-20 mars 1970)			Deuxième essai (28-30 mars 1970)			Troisième essai (4-6 juillet 1970)		
dates	pluie	insolation	dates	pluie	insolation	dates	pluie	insolation
13	0,0	9,7	23	0,0	8,2	28 (juin)	2,7	5,0
14	0,0	10,3	24	10,5	8,7	29	0,0	8,0
15	0,0	10,2	25	0,0	7,0	30	88,8	0,5
16	0,0	5,7	26	0,0	8,8	1 (juillet)	1,2	0,2
17	0,0	5,7	27	0,0	8,8	2	0,0	1,0
18	4,6	9,4	28	0,0	8,5	3	0,0	8,7
19	0,0	5,4	29	0,0	9,3	4	0,7	7,2
20	0,0	9,0	30	0,0	8,0	5	2,5	8,7

Table 37. Rainfall (mm) and insolation (h) before and during experiments on daily fluctuation of glucoside concentration in leaves (From the Section of Bioclimatology, O.R.S.T.O.M.).

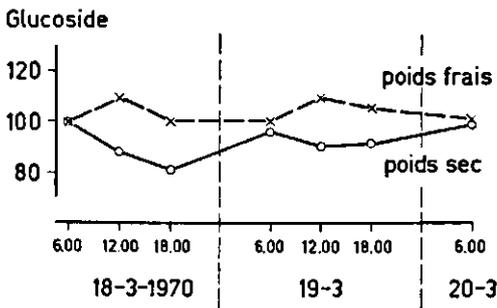


FIG. 12. Fluctuations journalières de la teneur en glucoside, par rapport aux poids frais et sec, des feuilles du clone Ta 25.

Fig. 12. Diurnal fluctuation of glucoside concentration, on fresh and on dry weight basis, in leaves of clone Ta 25.

la nuit. La discordance entre la teneur par rapport au poids frais et celle par rapport au poids sec pourrait s'expliquer par la teneur en eau des feuilles qui diminuait beaucoup (jusqu'à 6%) au cours de la journée. Toutefois, il est très probable que les fluctuations quotidiennes de la teneur en glucoside par rapport au poids sec, et de la teneur en eau, correspondent, tout au moins partiellement, à celle de la quantité de matière sèche des feuilles. En effet, cette quantité, estimée pour plusieurs espèces de plantes, peut varier de façon importante (5-25%) à cause de l'accumulation pendant la journée, et du transport pendant la nuit, des produits de la photosynthèse (CURTIS, 1944; FISCHER, 1958). Mais nous n'avons pas mesuré cette fluctuation de la matière sèche. WIENK (1971) a observé à Surinam que les feuilles des plantes de manioc (Clone Betawi), âgées d'un an, accusèrent pendant la nuit une réduction de 8-9% de leur poids sec.

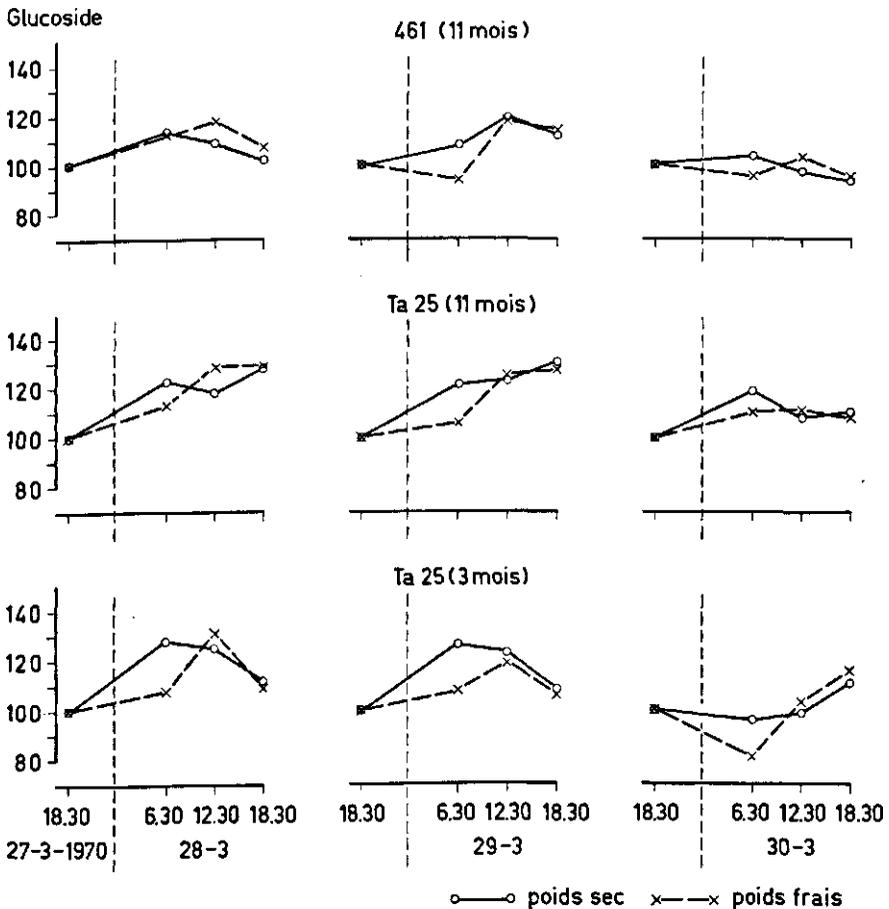


FIG. 13. Fluctuations journalières de la teneur en glucoside, par rapport aux poids frais et sec, des feuilles de deux clones.

Fig. 13. Diurnal fluctuation of glucoside concentration, on fresh and on dry weight basis, in leaves of two clones.

8.3.2. Deuxième essai

Cet essai comportait trois périodes de 24 heures et fut effectué sur des feuilles appartenant aux clones Ta 25 et 461. Nous avons constitué trois lots: les deux premiers avec des feuilles de plantes de Ta 25, âgées de 3 mois et de 11 mois, le troisième avec des feuilles de plantes de 461, âgées de 11 mois. Pour chaque période et dans chaque lot, 10 feuilles furent choisies, ayant 7 lobes. Pour chaque période de 24 heures, les échantillons furent pris à 4 moments différents: à 18.30 h, puis à 6.30 h, 12.30 h et 18.30 h du lendemain; les échantillons comprenaient donc 10 lobes, un de chacune des 10 feuilles. La teneur en glucoside des échantillons fut déterminée par rapport au poids frais et au poids sec.

Comme pour le premier essai, le tableau 37 (deuxième essai) groupe les chiffres sur la pluie et l'insolation.

Les résultats sont présentés graphiquement dans la figure 13. Pour chaque période et pour chaque lot, les teneurs ont été exprimées par rapport à celle du premier prélèvement.

La figure 14 illustre la fluctuation quotidienne de la teneur en eau des feuilles, en moyenne sur les lots; la variation de cette teneur entre les trois périodes était très réduite.

Si nous considérons l'évolution de la teneur en glucoside pendant la nuit, dans la plupart des cas nous constatons une augmentation, surtout marquée par rapport au poids sec.

Pendant le jour, dans tous les cas nous observons entre 6.30 h et 12.30 h une augmentation de la teneur en glucoside par rapport au poids frais. Probablement cette augmentation est principalement due à la diminution du pourcentage en eau des feuilles au début de la journée, puisque, en revanche, dans six cas, la teneur par rapport au poids sec diminue pendant la même période. Entre 12.30 h et 18.30 h l'évolution de la teneur est très variable pour les différents lots.

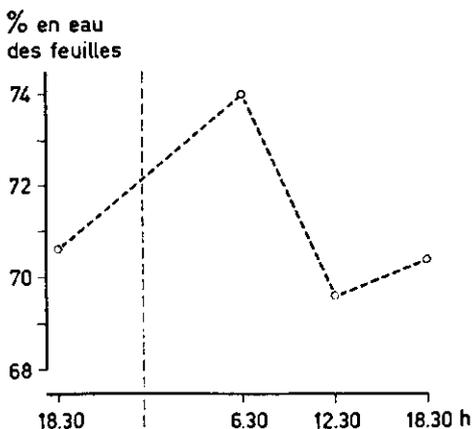


FIG. 14. Fluctuation quotidienne de la teneur en eau des feuilles.
Fig. 14. Diurnal fluctuation of moisture content of leaves.

8.3.3. Troisième essai

L'ensemble des résultats des deux essais précédents nous permet de conclure à l'augmentation pendant la nuit de la teneur en glucoside des feuilles, par rapport au poids sec. Cependant, compte tenu de cette conclusion, et du fait que la teneur en glucoside des feuilles diminue en fonction de l'âge, il résulte que, en moyenne, la teneur doit diminuer pendant la journée. Cela veut dire que les augmentations diurnes, que nous avons constatées dans quelques cas, doivent être dues à des influences spéciales, probablement de nature météorologique.

Pour plus de sûreté, nous avons effectué un troisième essai. Au cours d'une période de 36 heures nous avons prélevé, analoguement aux essais précédents, sur des lots de 12 feuilles un échantillon à 4 moment différents: premier prélèvement le 5.7.70 à 18.30 h; deuxième et troisième prélèvement le 6.7.70 à 6.30 h et à 18.30 h; quatrième prélèvement le 7.7.70 à 6.30 h. L'essai portait sur les clones Tabouca, Ta 25 et A 13; les plantes avaient l'âge de 6 mois.

Les résultats sont présentés graphiquement dans la figure 15. Les teneurs en glucoside ont été exprimées par rapport à celle du premier prélèvement. Les conditions climatiques, concernant la pluie et l'insolation sont présentées dans le tableau 37 (troisième essai).

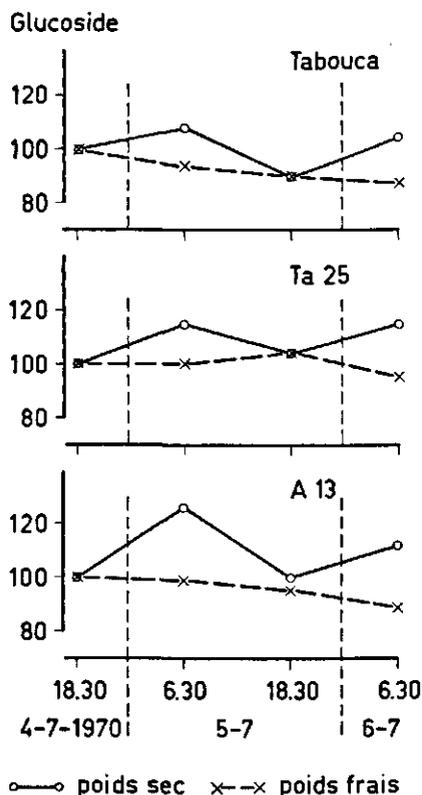


Fig. 15. Fluctuations journalières de la teneur en glucoside, par rapport aux poids frais et sec, des feuilles de trois clones.

Fig. 15. Diurnal fluctuation of glucoside concentration, on fresh and on dry weight basis, in leaves of three clones.

La figure 15 montre que la teneur en glucoside par rapport au poids frais varie très peu en fonction de l'heure de la journée. On observe une légère diminution de la teneur au cours de la période de l'essai. En revanche, la teneur par rapport au poids sec augmente considérablement pendant la nuit et elle diminue au cours de la journée.

8.3.4. *Conclusions*

Nos résultats permettent de conclure que la teneur en glucoside par rapport au poids sec des feuilles augmente pendant la nuit, et que, par conséquent, elle doit, en moyenne sur plusieurs jours, diminuer au cours de la journée. Mais, comme nous l'avons mentionné, il est très probable que cette fluctuation soit provoquée, tout au moins partiellement, par la fluctuation quotidienne de la quantité de matière sèche. Dans nos essais, l'augmentation moyenne de la teneur en glucoside des feuilles pendant la nuit s'élevait à 14%. Bien que cette augmentation puisse être attribuée à la diminution de la quantité de matière sèche, il faudrait mesurer la variation du poids de la matière sèche pour arriver à des conclusions définitives.

Quant à la teneur en glucoside par rapport au poids frais, la fluctuation quotidienne est beaucoup moins nette. Ceci est à expliquer par le fait que le sens de la fluctuation de la quantité de matière sèche est opposé à celui de la fluctuation de la quantité d'eau. Donc, la variation du poids frais des feuilles sera moins importante que celle du poids sec. Tout de même, nous supposons que l'augmentation de la teneur en glucoside par rapport au poids frais qui se manifeste au début de la journée est principalement due à la diminution rapide de la teneur en eau (cf. figure 14).

Bien que nos résultats mettent en évidence qu'il se présente une fluctuation quotidienne de la teneur en glucoside, surtout par rapport au poids sec, ils indiquent, tout de même, que l'existence d'une fluctuation quotidienne de la quantité de glucoside dans les feuilles est peu probable.

9. AUTRES FACTEURS LIÉS À LA TENEUR EN GLUCOSIDE

9.1. ORIENTATION DES BOUTURES

9.1.1. Introduction

En 1905, BOORSMA mentionne qu'en Indonésie, l'opinion était répandue chez les planteurs indigènes que les plantes dont les boutures avaient été posées sens dessus-dessous produisent des tubercules plus toxiques. Il conteste cette opinion, mais en se référant à un essai exécuté par lui d'une manière beaucoup trop simple, et pas convaincante. Plus tard BOLHUIS (1939) a examiné pour 6 clones, dont un qui était très toxique, l'influence du renversement des boutures. Pour deux clones, dont celui qui était très toxique, la teneur en glucoside des tubercules des plantes provenant de ces boutures était de 30% et de 24% plus élevée que pour ceux des plantes témoins; en revanche, pour les autres clones l'influence était opposée, avec des pourcentages respectifs de: 40, 31, 7 et 9%. L'auteur conclut que l'opinion des planteurs indonésiens est correcte en ce qui concerne les clones toxiques; mais cette conclusion nous paraît contestable en raison du nombre réduit de clones toxiques dans l'essai, et au vu des résultats des autres clones. Pour éclaircir ce problème, nous avons poursuivi l'expérimentation à ce sujet; nous avons effectué deux essais, un en sachets en plastique et un au champ.

9.1.2. Essai en sachets

Les sachets contenaient 5 kg de terre enrichie d'une quantité d'engrais correspondant à la dose $N_2P_2K_2Mg_2Ca_2$, définie dans la section 5.3.4.1.

TABLEAU 38. Influence de la plantation des boutures sens dessus-dessous sur la teneur en glucoside des feuilles et des racines de jeunes plantes, de quatre clones.

Clones	Feuilles		Racines	
	plantation normale	boutures renversées	plantation normale	boutures renversées
Tabouca	100 (= 1240*)	114	100 (= 47**)	107
A 13	100 (= 840)	169	100 (= 45)	93
Ta 25	100 (= 1180)	116	100 (= 26)	195
461	100 (= 1460)	102	100 (= 60)	81
Moyenne	100	125	100	119

* μg d'HCN par g de matière sèche

** μg d'HCN par g de matière fraîche

Table 38. Effect of planting cuttings upside down on glucoside concentration in leaves and roots of young plants of four clones.

(page 53). L'essai comportait les 4 clones habituels. Les boutures furent plantées alternativement de manière normale et renversée. Il y avait 5 répétitions. Date de plantation: 15 décembre 1967. Le prélèvement eut lieu 8 semaines plus tard. Le tableau 38 groupe les résultats; la teneur des feuilles et des racines des plantes provenant des boutures renversées est exprimée par rapport à celle des plantes témoins.

Pour les feuilles, la plantation à l'envers des boutures provoque une augmentation de la teneur en glucoside, sauf pour le clone 461; sur l'ensemble des clones, l'effet est statistiquement significatif (seuil 0,01). Pour les racines l'effet n'est pas significatif sur l'ensemble des clones; mais pour Ta 25 il est hautement significatif. Les clones réagissent de façon très différente, et l'interaction entre la nature des clones et le renversement des boutures est significative (seuil 0,05), pour les feuilles aussi bien que pour les racines.

9.1.3. Essai au champ

Nous avons étudié la relation éventuelle entre l'orientation des boutures et la teneur en glucoside des tubercules des plantes qui en résultent, en comparant cinq positions des boutures:

- horizontale;
- inclinée sous l'angle de 45° (méthode normale);
- inclinée sous l'angle de 45°, mais renversée;
- verticale;
- verticale renversée.

L'essai fut effectué avec les quatre clones habituels. Il y avait 5 répétitions. La plantation eut lieu en juillet 1967. Les plantes furent arrachées 11 mois après la plantation. Le tableau 39 groupe les moyennes relevées de la teneur en glucoside des tubercules écorcés, exprimées par rapport aux valeurs de la méthode normale de plantation.

TABLEAU 39. Influence de l'orientation des boutures sur la teneur en glucoside des tubercules écorcés de quatre clones.

Clones	Orientation de boutures				
	horizontale	inclinée	inclinée renversée	verticale	verticale renversée
Tabouca	98	100 (= 185*)	83	88	104
A 13	97	100 (= 265)	83	93	80
Ta 25	91	100 (= 730)	89	99	89
461	99	100 (= 730)	102	96	99
Moyenne	96	100	89	94	93

* μg d'HCN par g de matière sèche

Table 39. Effect of orientation of cuttings on glucoside concentration in peeled tuberous roots of resulting plants.

Il est à remarquer que la production en tubercules des plantes issues des boutures renversées était inférieure de moitié à celle des plantes issues de la plantation normale, et que le nombre de tiges par plante passait du simple au double. Ceci confirme les résultats obtenus par BOLHUIS (1939).

9.1.4. *Discussion et conclusion*

Les résultats obtenus par l'expérimentation au champ indiquent que les tubercules des plantes issues des boutures renversées ne sont nullement plus toxiques. Il y a plutôt une tendance en sens contraire, tout au moins pour les plantes issues des boutures inclinées.

En revanche, pour les jeunes plantes cultivées en sachets, il se présente dans quelques cas, une influence positive de la plantation à l'envers. Ceci peut s'expliquer par le fait que la plantation des boutures à l'envers empêche, surtout au début, le développement normal des plantes. En général, sur les boutures plantées de manière normale, deux ou trois bourgeons de la partie distale de la bouture se développent; les jeunes pousses forment de l'auxine qui empêche les autres bourgeons de se développer. Quand on plante la bouture à l'envers, ce sont aussi les bourgeons distaux qui se développent d'abord, mais les jeunes pousses ne peuvent pas empêcher les bourgeons plus proximaux de se développer. Apparemment le développement anormal des jeunes plantes issues des boutures renversées a des répercussions sur la teneur en glucoside des plantes de quelques-uns de nos clones, et surtout en ce qui concerne les feuilles. On pourrait admettre qu'au cours de la végétation, l'équilibre se rétablit et que, finalement, la teneur en glucoside des plantes issues des boutures plantées normalement et celle des plantes issues de la plantation à l'envers sera plus ou moins du même ordre.

9.2. CORRÉLATIONS ENTRE LA TENEUR EN GLUCOSIDE ET D'AUTRES CARACTÉRISTIQUES DE LA PLANTE

9.2.1. *Introduction*

Plusieurs auteurs ont affirmé l'existence d'une corrélation positive entre la teneur en glucoside des tubercules et la productivité des clones de manioc. D'autres auteurs ont contesté une telle relation. Nous avons porté quelque attention à cette question.

Pour quelques essais nous avons déterminé non seulement la teneur en glucoside des tubercules, mais encore la production de tubercules par plante, ainsi que quelques autres caractéristiques, afin de savoir s'il existe une corrélation entre la teneur en glucoside des tubercules et quelque autre des caractéristiques déterminées. Dans ces cas, il s'agissait donc d'une comparaison entre les caractéristiques de plantes appartenant au même clone (9.2.2.).

Dans une autre expérience nous avons déterminé, pour 67 clones, différentes caractéristiques, parmi lesquelles la teneur en glucoside des feuilles et des tubercules écorcés. Ensuite nous avons examiné l'existence éventuelle d'une

corrélation entre la teneur en glucoside des tubercules et des feuilles de ces clones, et les autres caractéristiques déterminées. Dans ce cas il s'agissait d'une comparaison entre les caractéristiques de plantes différentes de clones différents (9.2.3.).

9.2.2. Comparaison de plantes des mêmes clones

Pour quatre de nos essais présentés dans les chapitres ci-dessus, soit ceux qui concernent les engrais azoté et potassique (5.2.1.), l'arrosage (6.2.), l'âge de la plante (7.2.2.) et la localité de culture (7.3.), nous avons recherché l'existence d'une corrélation entre la teneur en glucoside des tubercules et différentes autres caractéristiques, à savoir:

- feuilles: poids sec, virose;
- tiges: nombre, longueur, diamètre, poids sec;
- tubercules: nombre, poids total, poids moyen, longueur, diamètre.

Nous avons signalé, pour tous les clones en question, dans l'essai sur les engrais et celui sur l'arrosage, l'existence d'une corrélation positive entre la teneur en glucoside des tubercules écorcés et le poids moyen par tubercule. Mais, bien que cette corrélation soit statistiquement significative dans ces essais, elle était faible: elle s'élevait à 0,35 (pour 48 degrés de liberté).

Pour le reste, nos calculs n'ont pas révélé d'autre corrélation entre la teneur en glucoside des tubercules écorcés et l'une ou l'autre des caractéristiques considérées.

Dans quelques cas, nous avons signalé l'existence d'une corrélation significative entre la teneur en glucoside des tubercules et l'un des autres caractéristiques, mais, ces corrélations ne se manifestant qu'occasionnellement, nous ne pouvons guère les prendre en considération.

Nous avons examiné si dans la plante il existe une relation entre la teneur en glucoside et la teneur en: N-total, NO_3 , K, Na, Ca, Mg, Cl, P et S, en ce qui

TABLEAU 40. Teneur moyenne en: N-total, NO_3 , K, Ca, Mg, Cl, P et S, en pourcentage par rapport au poids sec, des limbes de feuilles et des tubercules écorcés, de plantes dont la teneur en glucoside des tubercules écorcés est élevée (groupe I) et de plantes dont cette teneur est peu élevée (groupe II).

	N- total	NO_3	K	Na	Ca	Mg	Cl	P	S
Limbes des feuilles:									
groupe I	5,4	0,075	1,69	0,02	1,07	0,45	0,10	0,43	0,32
groupe II	5,3	0,054	1,64	0,02	0,99	0,40	0,10	0,41	0,32
Tubercules écorcés:									
groupe I	1,06	0,42	0,97	0,06	0,10	0,09	0,08	0,16	0,13
groupe II	0,93	0,35	1,02	0,05	0,10	0,09	0,08	0,14	0,12

Table 40. Average concentration of: N (total), NO_3 , K, Na, Ca, Mg, Cl, P and S (percentage of dry weight) in leaf blades and peeled tuberous roots of plants with a high (group I) and with a low (group II) glucoside concentration in peeled tuberous roots.

concerne les tubercules écorcés et les feuilles. Pour chacun de 3 clones cultivés au même champ, nous avons choisi parmi 16 plantes, les 4 dont la teneur en glucoside des tubercules était la plus élevée, et les 4 dont cette teneur était la moins élevée; la différence moyenne de la teneur en glucoside des deux groupes de plantes était de 37%. De chacune des 24 plantes, nous avons prélevé un échantillon des feuilles et un des tubercules écorcés; les échantillons furent séchés à 45°C. Les analyses chimiques furent effectuées à l'Institut de Recherches Biologiques et Chimiques sur les Plantes de Grande Culture, à Wageningen. Les résultats des analyses (tableau 40) indiquent que pour la plupart des éléments déterminés la teneur moyenne pour les deux groupes de plantes est très peu différente. La différence la plus importante concerne la teneur en nitrate des feuilles, mais à cause de la grande variation des résultats, cette différence n'est statistiquement significative qu'au seuil de 0,10.

9.2.3. Comparaison de clones différents

Pour 67 clones de la collection de l'O.R.S.T.O.M. (cf. section 4.6.1.) nous avons déterminé les 8 caractéristiques suivantes:

- feuilles: teneur en glucoside, pourcentage en matière sèche, poids frais;
- tiges: poids frais;
- tubercules écorcés: teneur en glucoside, pourcentage en matière sèche, nombre, poids frais.

Nous avons calculé pour chacun des clones, 4 autres caractéristiques:

- poids moyen par tubercule;
- poids feuilles/poids tiges;
- poids feuilles/poids tubercules;
- poids tubercules/poids tiges.

Puis nous avons calculé les coefficients de corrélation, intégralement entre toutes les caractéristiques en question. Les résultats sont groupés dans le tableau 41; dans le même tableau figurent la moyenne, l'écart-type, et le coefficient de variation, pour les 12 caractéristiques.

Quant aux résultats, nous nous bornons à considérer les corrélations entre la teneur en glucoside des feuilles et des tubercules, et les autres caractéristiques; dans le tableau on trouve ces résultats dans les deux premières colonnes.

Tout d'abord, nous voyons qu'il existe une corrélation importante entre la teneur en glucoside des tubercules et celles des feuilles ($r_{1,2} = 0,55$).

Les résultats mettent en évidence que la teneur en glucoside (par rapport au poids sec) des feuilles, ainsi que celle des tubercules, est en corrélation négative avec le pourcentage en matière sèche des feuilles ($r_{1,3} = -0,29$; $r_{1,4} = -0,34$) et des tubercules ($r_{2,3} = -0,33$; $r_{2,4} = -0,40$); donc, elles sont en corrélation positive avec le pourcentage en eau de ces organes. Remarquons que nos calculs ont indiqué qu'une de ces corrélations est causale: si l'on exprime la teneur en glucoside des feuilles par rapport au poids frais, le coefficient de corrélation entre cette teneur et le pourcentage en matière sèche des feuilles n'est que de $-0,08$. Mais les autres coefficients de corrélation entre la teneur en glucoside des feuilles, de même que celle des tubercules, et les 10 autres caractéristiques sont

TABLEAU 41. Coefficients de corrélation, calculés intégralement entre 12 caractéristiques de 67 clones. Les coefficients inférieurs à 0,15 ont été négligés et fixés à 0. Moyenne, écart-type, et coefficient de variation pour les 12 caractéristiques.

Caractéristiques	Coefficients de corrélation ($\times 100$)												Moyennes pour les clones	Écart-type	Coefficients de variation (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	100												3640	1040	29
2	55	100											550	360	65
3	-29	-33	100										25,5	1,4	5
4	-34	-40	18	100									33,3	3,1	9
5	26	20	0	-34	100								735	540	73
6	0	24	0	-39	75	100							2430	1510	62
7	0	20	0	-40	64	86	100						2290	1940	85
8	22	0	0	-33	59	69	69	100					5,4	3,2	59
9	0	26	0	-24	43	63	78	16	100				405	210	52
10	22	0	0	0	50	0	0	0	0	100			0,31	0,13	42
11	22	0	-22	0	21	-15	-41	-27	-41	60	100		0,43	0,32	74
12	0	0	18	-24	0	15	58	38	49	0	-68	100	0,91	0,38	42

seuils de signification: 0,05 = 24; 0,01 = 31

Explication des numéros des caractéristiques:

1. teneur en glucoside des feuilles (en μg d'HCN par g de matière sèche)
2. teneur en glucoside des tubercules écorés (en μg d'HCN par g de matière sèche)
3. pourcentage en matière sèche des feuilles
4. pourcentage en matière sèche des tubercules
5. poids frais des feuilles par plante, y compris le poids des jeunes tiges portant les feuilles (g)
6. poids frais des tiges par plante (g)
7. poids frais des tubercules par plante (g)
8. nombre de tubercules par plante
9. poids moyen par tubercule (7/8)
10. poids feuilles/poids tiges (5/6)
11. poids feuilles/poids tubercules (5/7)
12. poids tubercules/poids tiges (7/6)

Table 41. Correlation coefficients between 12 characteristics of 67 clones. Coefficients $< 0,15$ have been neglected ($= 0$). Average, standard deviation and coefficient of variation of the characteristics. Characteristics considered: glucoside concentration (on dry weight basis) in leaves (1) and peeled tuberos roots (2); % of dry weight of leaves (3) and tuberos roots (4); fresh weight of leaves (including young stems) (5), stems (6), and tuberos roots (7); number of tuberos roots per plant (8); 7/8 (9); 5/6 (10); 5/7 (11); 7/6 (12).

pratiquement identiques, que l'on exprime cette teneur par rapport au poids frais ou au poids sec; c'est pour cette raison que le tableau 41 ne concerne que les teneurs en glucoside par rapport au poids sec.

Il se manifeste une corrélation positive, assez faible, mais statistiquement significative, entre le poids frais des feuilles par plante et la teneur en glucoside des feuilles ($r_{1,5} = 0,26$). La teneur en glucoside des tubercules est en corrélation positive avec le poids des feuilles ($r_{2,5} = 0,20$), des tiges ($r_{2,6} = 0,24$) et des tubercules ($r_{2,7} = 0,20$); la corrélation avec le poids des tiges est significative au seuil de 0,5, celle avec le poids des feuilles et celui des tubercules au seuil de 0,10. Il est donc évident que la teneur en glucoside des tubercules est en relation avec la production végétative des clones; mais apparemment, cette relation est si faible qu'en général il est difficile de la mettre en évidence.

Une autre corrélation intéressante, bien qu'elle soit faible, est celle qu'il y a entre la teneur en glucoside des tubercules et le poids moyen par tubercule ($r_{2,9} = 0,26$). Nous nous rappelons que cette corrélation était la seule que nous avons pu signaler dans quelques cas en comparant des plantes des mêmes clones (9.2.2.).

Nous voyons qu'en comparant différents clones, on trouve plus de corrélations entre la teneur en glucoside et d'autres caractéristiques de la plante, qu'en comparant des plantes d'une même clone. Seulement, nos résultats ne reposent que sur un seul essai; il serait donc souhaitable de répéter cet essai, et de le répéter sous des conditions écologiques différentes de celles d'Adiopodoumé.

9.3. INFLUENCE DE LA COLCHICINE

L'influence éventuelle d'un traitement des boutures avec de la colchicine sur la teneur en glucoside des tubercules des plantes issues de ces boutures, a été étudiée par BOLHUIS (1949). Cet auteur a pu obtenir des boutures dont les cellules avaient un nombre de chromosomes supérieur au nombre normal (36), mais il n'a pas constaté une influence importante de la colchicine sur la teneur en glucoside des tubercules des plantes issues des boutures traitées. Pour deux des trois clones examinés, la teneur des tubercules des plantes traitées était légèrement inférieure à la teneur des tubercules témoins, pour le troisième clone, les tubercules des plantes traitées étaient légèrement plus toxiques que les tubercules témoins.

10. ÉTUDE DE LA MIGRATION DU GLUCOSIDE

10.1. INTRODUCTION

Lors de son étude sur l'acide cyanhydrique chez le *Pangium edule*, TREUB (1896) a pratiqué la décortication annulaire sur les tiges de jeunes plantes et sur les pétioles des feuilles. Ainsi a-t-il observé une accumulation de l'HCN dans les tissus situés au-dessus de l'anneau et, inversement, une diminution dans ceux situés au-dessous. Il en concluait qu'il y avait une migration de l'HCN, formé dans les limbes foliaires, de haut en bas dans le liber. TREUB mentionne que le même phénomène a été confirmé pour quelques autres plantes, parmi lesquelles le *Prunus laurocerasus*; mais, il n'a pas pu déceler de l'HCN dans le liber du *Phaseolus lunatus*.

D'autres auteurs ont étudié la même question, mais leurs conclusions ne sont pas concordantes. Ainsi, dans sa revue bibliographique, DILLEMANN (1958) concluait que, d'un point de vue général, les diverses recherches effectuées en vue de déterminer la possibilité d'une migration des composés cyanogénétiques, 'n'ont pas conduit à des conclusions très nettes', et 'elles n'ont permis d'envisager cette possibilité que dans des cas particuliers'.

On ne sait pas avec certitude où ces glucosides sont formés. Est-ce qu'ils sont formés principalement dans les feuilles, et transportés vers les autres parties de la plante, ou sont-ils formés dans des différents organes mêmes de la plante; ou bien, est-ce qu'il se présente une combinaison des deux cas? Comme mentionné, TREUB (1896) supposait que la substance cyanogénétique est formée dans les limbes foliaires et migre dans la plante. STEKELENBURG (1931) a observé que, chez le *Prunus laurocerasus*, la teneur en glucoside augmente dans des feuilles coupées, placées à la lumière, ce qui signifie que les feuilles sont bien en mesure de former le glucoside; toutefois, cet auteur ne s'est pas prononcé sur une migration éventuelle.

Notre attention sur la migration éventuelle du glucoside dans le manioc a été attirée par les résultats de notre étude sur la répartition du glucoside dans la plante (Chapitre 4), surtout par notre observation que dans l'écorce des tiges la teneur en glucoside augmente de haut en bas, et que dans quelques cas, la teneur de l'écorce des tubercules est encore supérieure à celle de l'écorce à l'extrémité inférieure des tiges. On pourrait supposer que le glucoside s'accumule dans l'écorce de haut en bas dans la plante, et que c'est principalement dans l'écorce des tubercules qu'il est transformé. Il fallait donc mettre en évidence sa migration éventuelle. À cette fin, nous avons effectué quelques expériences, en pratiquant la décortication annulaire des tiges. Dans un premier temps, l'influence de la décortication sur la teneur en glucoside au-dessus et au-dessous de l'anneau fut examinée. Dans un deuxième temps, le même essai fut effectué, mais en combinaison avec l'ablation des feuilles au dessus de l'anneau. Enfin furent recherchées les influences de la décortication

annulaire des tiges, de la section des tiges, et de l'ablation des feuilles, sur la teneur en glucoside des tubercules.

10.2. INFLUENCE DE LA DÉCORTICATION ANNULAIRE DES TIGES,
EN COMBINAISON OU NON AVEC L'ABLATION DES FEUILLES,
SUR LA TENEUR EN GLUCOSIDE DANS L'ÉCORCE

Dans un premier essai nous avons, sur des plantes ayant 2 tiges, pratiqué la décortication annulaire d'une tige par plante; il s'agissait de 4 plantes, une de chacun des clones: Tabouca, A 13, Ta 25 et 461. À la hauteur de 60 cm fut détaché un anneau d'écorce haut de 3 cm. Après 2, 4, 6, 8, 20 et 60 jours un autre anneau fut coupé au-dessus et au-dessous de la plaie (après 60 jours au-dessus de la plaie seulement). De tous ces échantillons la teneur en glucoside fut déterminée. Le tableau 42 présente les résultats; la teneur en glucoside est exprimée par rapport à la teneur du premier anneau.

Les résultats montrent qu'après la décortication annulaire, la teneur en glucoside de l'écorce au-dessus de l'anneau augmente considérablement, ce qui indique que le glucoside s'y accumule. Mais, la teneur augmente aussi au-dessous de l'anneau, quoique beaucoup moins et seulement pendant les premiers jours, alors qu'après elle y diminue. Toutefois, remarquons qu'à cet endroit de la tige il est normal que la teneur en glucoside dans l'écorce s'élève vers le bas de la plante (cf. tableaux 20 et 21). Quant aux plantes des clones

TABLEAU 42. Influence, en fonction du temps, de la décortication annulaire de tiges de quatre clones, sur la teneur en glucoside dans l'écorce au-dessus et au-dessous de la plaie.

	Jours après la première incision	Clones				moyenne
		Tabouca	A 13	Ta 25	461	
Anneaux supérieurs	60	405	90	-	190	-
	20	415	85	285	205	250
↑	8	280	95	235	200	205
	6	275	110	175	190	190
	4	230	115	180	170	175
	2	200	105	145	135	145
Premier anneau	0	100(=220*)	100 (=600)	100 (=480)	100 (=990)	100
	2	170	110	115	105	125
	4	170	115	125	115	130
↓	6	170	105	120	125	130
Anneaux inférieurs	8	185	100	100	120	125
	20	160	60	100	100	105

* μg d'HCN par g de matière fraîche

Table 42. Effect, as a function of time, of stem ringing on glucoside concentration in bark above and below the incision (for four clones).

TABLEAU 43. Influence de la décortication annulaire de la tige sur la teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière sèche) des feuilles, pour quatre clones.

Clones	Tige décortiquée		Tige témoin	
	au début	après 8 jours	au début	après 8 jours
Tabouca	1190	1290	1570	1090
A 13	1470	1230	1410	1250
Ta 25	1410	1060	1390	1170
461	2880	2840	2000	1930

Table 43. Glucoside concentration (μg HCN per g fresh weight) in leaves of four clones at the moment of stem ringing and 8 days afterwards.

A 13, Ta 25 et 461, on pourrait supposer qu'après la décortication annulaire, la teneur en glucoside au-dessous de la plaie restera constante pendant les premiers jours, mais qu'après elle diminuera; mais pour la plante de Tabouca il est évident que la teneur au-dessous de la plaie s'élève pendant les deux jours après la décortication⁵.

Nous avons déterminé également la teneur en eau des échantillons pris au vingtième jour: l'écorce contenait en moyenne 2,1% moins d'eau au-dessus de la plaie qu'au-dessous, donc une différence peu importante.

Au début de l'essai et puis 8 jours après, nous avons prélevé un échantillon de feuilles sur les tiges décortiquées, ainsi que sur les tiges témoins. On pourrait présumer que la teneur en glucoside des feuilles au-dessus d'une décortication de la tige augmenterait, le transport étant bloqué. Mais les résultats de l'essai (tableau 43) ne permettent pas d'affirmer que la décortication ait influencé la teneur en glucoside des feuilles.

Le tableau 42 montre que les différentes plantes n'ont pas réagi de la même façon à la décortication. Pour la plante du clone A 13 en particulier, l'influence n'est que très faible. Il s'est trouvé que la tige de cette plante n'avait que très peu de feuilles et qu'il était assez difficile de la décortiquer, ce qui indiquait une activité végétative faible. Ceci nous a conduit à répéter l'essai de décortication en pratiquant ou non l'ablation des feuilles des tiges décortiquées. Un essai fut effectué avec des plantes ayant 2 tiges, des clones A 13 et Ta 25. Une des deux tiges fut décortiquée, en combinaison ou non avec l'ablation des feuilles, au moment de la décortication; 4 jours plus tard un anneau fut coupé au-dessus et un au-dessous de la plaie. Les résultats (tableau 44) montrent clairement qu'après la décortication annulaire des tiges, le glucoside s'accumule au-dessus de la plaie, alors que cette accumulation ne se présente pas si l'on élimine les feuilles au moment de la décortication. Nous avons donc là une indication en faveur de la formation du glucoside dans les feuilles et de sa migration vers le bas par le liber.

⁵ En poursuivant l'expérimentation sur la décortication, dans quelques cas nous avons constaté une telle augmentation de la teneur de l'écorce au-dessous de l'incision, non seulement chez Tabouca, mais encore chez d'autres clones.

TABLEAU 44. Influence de la décortication annulaire de la tige, en combinaison ou non avec l'ablation des feuilles, sur la teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière fraîche) dans l'écorce des tiges au-dessus et au-dessous de la plaie, pour deux clones.

	Sans ablation des feuilles		Avec ablation des feuilles	
	A 13	Ta 25	A 13	Ta 25
Anneau supérieur (après 4 jours)	780	1320	270	510
Premier anneau	370	610	330	480
Anneau inférieur (après 4 jours)	470	620	400	490

Table 44. Effect of stem ringing, whether or not in combination with elimination of leaves, on glucoside concentration (μg HCN per g dry weight) in bark above and below the incision (for two clones).

Nous avons constaté une grande variation dans l'accumulation du glucoside au-dessus de la plaie de l'une plante à l'autre. Ayant l'impression que l'accumulation est plus importante à mesure que la quantité de feuilles est plus élevée, nous avons procédé à un essai avec 4 clones, en pratiquant la décortication annulaire, d'une part chez des tiges de jeunes plantes (4 mois) ayant une grande quantité de feuilles, et d'autre part chez des tiges de plantes plus âgées (10 mois) ayant une quantité de feuilles très réduite. Le premier anneau, haut de 6 cm, fut coupé à environ 50 cm du sol, puis 3 jours après un deuxième anneau fut coupé au-dessus de la plaie. Pour la moitié des tiges, la décortication fut combinée

TABLEAU 45. Influence de la décortication annulaire de la tige, en combinaison ou non avec l'ablation des feuilles, sur la teneur en glucoside de l'écorce au-dessus de la plaie, pour des plantes jeunes et plus âgées, de quatre clones.

Clones	Sans ablation des feuilles				Avec ablation des feuilles			
	jeune plante		vieille plante		jeune plante		vieille plante	
	an- neau 1	an- neau 2*	an- neau 1	an- neau 2*	an- neau 1	an- neau 2*	an- neau 1	an- neau 2*
Tabouca	100	300	100	135	100	120	100	110
A 13	100	280	100	120	100	100	100	105
Ta 25	100	155	100	140	100	100	100	110
461	100	325	100	250	100	115	100	100
Moyenne	100	265	100	160	100	109	100	106

* après 3 jours, au-dessus du premier anneau

Table 45. Effect of stem ringing, whether or not in combination with elimination of leaves, on glucoside concentration in bark above incision of stems of young (4 months) and older (10 months) plants of four clones.

avec l'ablation des feuilles. Les teneurs en glucoside et en eau des échantillons furent déterminées; la teneur en eau ne différait que de façon négligeable pour les deux anneaux de la même tige. Les résultats de l'essai figurent dans le tableau 45. Pour chaque tige la teneur en glucoside du deuxième anneau a été exprimée par rapport à celle du premier. Les résultats mettent en évidence que pour les tiges des jeunes plantes ayant beaucoup de feuilles, l'accumulation du glucoside dans l'écorce au-dessus de l'incision est beaucoup plus importante que pour des plantes plus âgées, ayant peu de feuilles. En revanche, cette accumulation n'est que très réduite dans les tiges dont les feuilles avaient été enlevées au moment de la décortication, qu'il s'agisse des plantes jeunes ou des plantes plus âgées. Donc, l'accumulation du glucoside dans l'écorce au-dessus d'une décortication annulaire devient plus faible à mesure que la quantité de feuilles au-dessous de l'anneau diminue, c'est-à-dire que cette accumulation diminue quand l'activité végétative de la plante ralentit.

10.3. INFLUENCE DE LA DÉCORTICATION ANNULAIRE DES TIGES, DE LA SECTION DES TIGES, ET DE L'ABLATION DES FEUILLES, SUR LA TENEUR EN GLUCOSIDE DES TUBERCULES

10.3.1. *Introduction*

Les essais précédents (10.2.) nous ont fait supposer qu'une partie au moins du glucoside est formée dans les feuilles puis transportée par le liber vers les tubercules. Ceci permet de présumer que l'empêchement de cette migration devrait provoquer une diminution de la teneur en glucoside des tubercules, puisque l'apport du glucoside est bloqué alors que sa décomposition pourrait continuer.

Pour vérifier cela, nous avons effectué quelques essais sur l'influence de la décortication annulaire des tiges, de la section des tiges et de l'ablation des feuilles, sur la teneur en glucoside des tubercules. Déjà DARJANTO (1952) a affirmé que la section des tiges fait diminuer la teneur en glucoside des tubercules, mais il n'a pas donné de précisions.

10.3.2. *Les essais: explication et résultats*

Un premier essai fut effectué avec des plantes du clone Tabouca, âgées de 10 mois. Les plantes furent divisées en 4 groupes: dans le premier, toutes les tiges furent décortiquées; dans le deuxième, elles furent coupées à 40 cm de hauteur; dans le troisième toutes les feuilles furent enlevées; les plantes du quatrième groupe servaient de témoins. Les plantes furent enlevées deux semaines après ces opérations. À deux reprises les feuilles formées entre-temps furent éliminées. Nous avons déterminé la teneur en glucoside de l'écorce et celle de la partie centrale des tubercules. Chaque échantillon représentait la moyenne de 3 plantes.

Dans un deuxième et un troisième essai nous avons examiné, en procédant

TABLEAU 46. Influence de la décortication annulaire des tiges, de la section des tiges, et de l'ablation des feuilles, sur la teneur en glucoside des tubercules, 2 semaines après les opérations (moyenne de 3 répétitions).

Essai	Clones	Partie du tubercule	Témoins	Décortication annulaire des tiges	Section des tiges	Ablation des feuilles
Premier	Tabouca	centre	100 (= 115*)	62	75	77
	Tabouca	écorce	100 (= 1660)	92	93	100
Deuxième	Tabouca	centre	100 (= 92)	80	86	92
	Ta 25	centre	100 (= 830)	90	-	93
Troisième	A 13	centre	100 (= 195)	89	95	-
	461	centre	100 (= 810)	80	87	-
	469	centre	100 (= 420)	77	98	-
	524	centre	100 (= 520)	89	87	-
	Moyenne	centre	100	81	88	87

* μg d'HCN par g de matière sèche

Table 46. Effect of stem ringing, stem cutting and elimination of leaves, on glucoside concentration in tuberous roots, 2 weeks after the operations (average of 3 repetitions).

comme au premier essai, l'influence des trois traitements sur la teneur en glucoside des tubercules écorcés de 6 clones.

Le tableau 46 groupe les résultats des trois essais; les teneurs en glucoside sont exprimées par rapport à celles des témoins. Les résultats montrent que dans tous les cas, la teneur en glucoside de la partie centrale des tubercules diminue par suite des différents traitements. Les résultats du premier essai indiquent que l'influence des traitements est moins forte sur la teneur de l'écorce que sur la teneur de la partie centrale. En moyenne sur les trois essais, la diminution de la teneur des tubercules écorcés est de 19% pour la décortication des tiges, de 12% pour la section des tiges, et de 13% pour l'ablation des feuilles; l'influence de la décortication paraît donc la plus forte.

10.4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats obtenus permettent d'affirmer que le glucoside, ou tout au moins une bonne partie de celui-ci, est formé dans les feuilles, puis transporté vers les autres parties de la plante, notamment vers les tubercules où il pourrait être transformé. Ces résultats confirment notre hypothèse avancée dans la section 4.7. (page 42). Cependant, quelques questions restent encore à étudier.

Le tableau 42 indique que c'est pendant les premiers jours que nous observons l'accumulation la plus importante au-dessus de la décortication annulaire; elle devient ensuite de moins en moins importante. De plus, nous avons vu qu'après

la décortication, la teneur en glucoside des feuilles n'augmente pas (tableau 43). On peut conclure de ces faits qu'après la décortication, il y a soit une diminution de l'élaboration du glucoside dans les feuilles, soit une transformation plus importante du glucoside par les feuilles et l'écorce de la tige, soit encore l'établissement d'un équilibre entre ces deux processus. C'est à cette dernière supposition que nous tenons; en effet, nous avons déjà discuté cet équilibre en 4.7.

L'augmentation de la teneur en glucoside dans l'écorce au-dessous de la plaie, que nous avons observée dans quelques cas après la décortication, est difficile à expliquer. Bien que cette augmentation ne soit que temporaire, elle ne peut pas résulter de la migration descendante du glucoside par le liber. On pourrait supposer qu'après la décortication, qui fait arrêter cette migration descendante dans le liber, une migration du glucoside en sens inverse s'amorce, étant donné que la concentration du glucoside dans l'écorce de la partie inférieure de la tige est beaucoup plus élevée que dans la partie supérieure.

Nos résultats ne correspondent pas à ceux de TREUB (1896), qui constatait une forte diminution de la teneur en glucoside au-dessous de la décortication annulaire des pétioles de feuilles de *Pangium edule*.

Bien que, dans ce qui précède, nous ayons suggéré que c'est le glucoside même qui est transporté, il nous faut reconnaître que ceci est contestable. Il n'est nullement exclu qu'il se présente une migration de produits qui favorisent la formation du glucoside, notamment les acides aminés (cf. section 2.1.), alors que le glucoside est formé par suite de l'accumulation de ces produits dans l'écorce. Seul l'emploi de radio-isotopes pourrait nous fournir la réponse à cette question.

11. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE LA LINAMARASE

11.1. INTRODUCTION

Puisque l'enzyme hydrolysante – chez le manioc, la linamarase – joue un rôle essentiel dans la dégradation des glucosides cyanogénétiques, nous avons consacré une étude à la détermination de l'activité de cette enzyme. Celle-ci a été facilitée par les travaux de WOOD (1965, 1966) sur le glucoside du manioc et son enzyme correspondante. Partant de ces travaux nous avons mis au point une méthode de détermination de l'activité enzymatique des extraits de différents organes de la plante (11.2.). La section 11.3. présente la répartition de l'activité enzymatique dans la plante. Nous avons examiné si, pour les tubercules, l'activité enzymatique de l'écorce et de la partie centrale varie en fonction de la teneur en glucoside de la partie centrale (11.4). Dans la section 11.5. nous envisagerons les conséquences pratiques et physiologiques de l'information obtenue sur la répartition de l'enzyme dans la plante.

11.2. MODE OPÉRATOIRE

11.2.1. Préparation du substrat

Nous avons préparé, à partir de l'écorce des tubercules, du glucoside qui a servi de substrat pour la détermination de l'activité enzymatique. Il est important de choisir un clone dont on sait que l'écorce des tubercules est très riche en glucoside.

Pour l'extraction, nous avons employé la méthode de WOOD (1966) quelque peu modifiée: l'écorce fraîche fut réfrigérée à -15°C , puis broyée dans une chambre froide (3°C) au moyen d'un hachoir à viande en ajoutant 40 ml d'acide perchlorique, 1 N, par 100 g d'écorce. La matière broyée, une fois dégelée, fut pressée à l'aide d'une toile. Le liquide, ainsi obtenu, fut centrifugé, amené au pH 7 avec de la KOH, 10 N, puis gardé pendant une nuit à 0°C , afin que le KClO_4 précipite. Après décantation, le liquide fut centrifugé et filtré sur du kieselguhr. De l'acétate de plomb basique fut ajouté, puis le précipité fut éliminé par centrifugation. L'excès du plomb fut précipité par entraînement d' H_2S . Après centrifugation et filtration sur du kieselguhr, l'excès de l' H_2S fut entraîné par un courant d'air. La solution ainsi obtenue était claire et incolore; le pH, étant de 4,4, fut amené à 5,5 par addition de Na_2CO_3 . Ensuite, la solution fut conservée à -15°C ; ainsi, la concentration en glucoside ne diminue pas durant au moins trois mois, comme nous avons pu le constater.

Cette méthode nous a permis d'obtenir à partir d'un kg d'écorce, 650 ml de solution ayant une concentration en glucoside cyanogénétique de 21 mM.

11.2.2. Préparation et conservation des extraits d'enzyme

Pour préparer l'extrait permettant le dosage de l'activité enzymatique, nous avons, dans un premier temps, préparé à partir de la matière première un jus brut:

- pour les feuilles, et l'écorce des tiges et des tubercules, ce jus fut obtenu par broyage dans le mixer d'une quantité de matière avec une quantité d'eau correspondant à 19 fois le poids de la matière;
- pour la partie centrale des tubercules, la matière râpée fut simplement pressée pour en tirer du jus.

Dans un deuxième temps, le produit obtenu après cette première opération fut centrifugé et filtré. Toutes les opérations furent effectuées à environ 4°C. Après avoir constaté par une expérience que ces extraits bruts peuvent être conservés pendant au moins un mois à la température de -15°C, sans que leur activité enzymatique diminue, nous les avons conservés ainsi. Nous avons constaté que, si la préparation des extraits est effectuée à la température ambiante, les résultats sont les mêmes qu'après la préparation à basse température; nous n'avons pas vérifié si de tels extraits se conservent bien à -15°C. Avant de procéder à la détermination de l'activité, les jus furent dilués suivant des taux différents comme il sera expliqué en 11.2.3.

11.2.3. Dilution des extraits

Il s'est avéré nécessaire de diluer l'extrait brut suivant la richesse en enzyme des tissus considérés.

L'activité enzymatique des extraits doit être déterminée pendant la période au cours de laquelle la libération de l'HCN est fonction linéaire du temps. La durée de cette période dépend de l'activité de l'enzyme et de la concentration du substrat.

Il était difficile d'établir une période au cours de laquelle la libération de

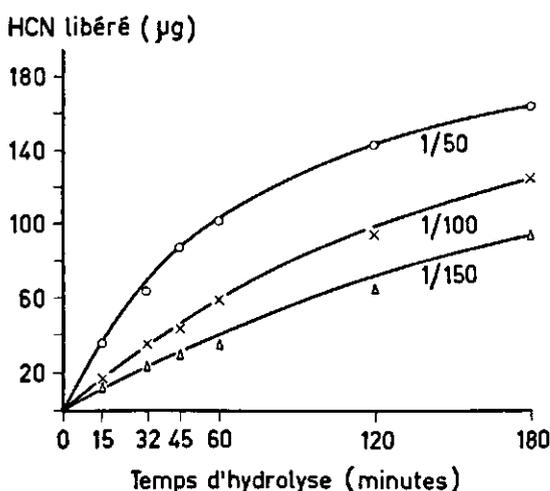


FIG. 16. Libération de l'HCN du substrat en fonction du temps d'hydrolyse, pour trois taux de dilution (1/50, 1/100 et 1/150) d'un extrait d'enzyme de l'écorce des tubercules.

Fig. 16. Liberation of HCN from the substrate, as a function of time of hydrolysis, by an enzyme extract of bark of tuberous roots, diluted at 1/50, 1/100 and 1/150.

TABLEAU 47. Taux de dilution (exprimés par rapport au poids frais de la matière) des extraits bruts de différentes parties de la plante, nécessaire pour obtenir une concentration convenable de la linamarase.

Partie de la plante	Taux de dilution
Feuilles très jeunes	1/500
Feuilles jeunes adultes	1/200
Feuilles plus âgées	1/100
Écorce de la tige	1/50
Écorce du tubercule	1/100
Partie centrale du tubercule	1/5

Table 47. Dilution factor (on fresh weight basis of tissues) for crude extracts of different parts of plant, necessary to obtain a suitable concentration of linamarase.

l'HCN est fonction linéaire du temps d'hydrolyse. En général, il se manifestait un petit écart, même au début de l'hydrolyse.

La figure 16 présente l'évolution de l'intensité de la couleur, due à la formation d'HCN, en fonction du temps d'hydrolyse, pour trois dilutions d'un extrait d'enzyme de l'écorce des tubercules. Comme cette figure le montre, le rapport entre la libération de l'HCN et le temps n'est pas d'ordre linéaire, même au début de l'hydrolyse. Néanmoins, l'écart n'est pas très important lors des premières 30 minutes.

Pour mesurer l'activité enzymatique pendant qu'elle est approximativement fonction linéaire du temps, et alors que la quantité d'HCN libéré est suffisamment élevée, nous avons cherché à déterminer le temps d'hydrolyse et le taux de dilution les plus favorables. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi le même temps d'hydrolyse pour tous nos extraits, ce qui revenait à faire varier le taux de dilution suivant la nature de l'extrait. Nous avons donc établi un schéma de dilution des extraits de différentes parties de la plante. Ce schéma est présenté dans le tableau 47; les taux de dilution sont exprimés par rapport au poids frais de la matière première. Les taux de dilution sont calculés pour une période d'hydrolyse de 20 minutes.

Il est évident que le tableau indique déjà globalement la répartition de l'activité enzymatique dans la plante. Dans la section 11.3. nous reviendrons en détail sur cette répartition.

11.2.4. Détermination de l'activité enzymatique

Comme méthode de détermination de l'activité de la linamarase nous avons adopté celle de WOOD (1965, 1966), à quelques modifications près.

L'activité enzymatique est exprimée par la quantité d'HCN obtenu après l'action de l'enzyme sur une quantité déterminée de glucoside, pendant une unité de temps.

Le dosage de l'HCN fut effectué suivant le procédé de GUIGNARD (1906); deux dosages furent effectués, un avant et un après l'action de l'enzyme. Nous avons adopté le procédé suivant: dans des flacons de 10 ml, posés dans un bain-marie à 30°C et contenant 1 ml d'extrait de l'enzyme, fut mis 1 ml d'un

TABLEAU 48. Schéma de préparation de la série étalon pour la détermination de l'activité de la linamarase (quantités en ml).

Produits	Flacons					
	1	2	3	4	5	6
A	0	0,5	1	1,5	2	3
B	3	2,5	2	1,5	1	0
C	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1

A: solution contenant du KCN (1 mM), du glucose (1 mM) et du Na₂CO₃ (0,2 M)

B: solution de Na₂CO₃ (0,2 M)

C: mélange, 1:1, d'une solution de linamaroside (10 mM) et de tampon acétate (0,2 M, pH 5,5)

D: extrait d'enzyme

E: solution saturée de l'acide picrique

Table 48. Scheme for preparation of solutions to obtain a standard curve for determination of linamarase activity (quantities in ml).

mélange, 1:1, d'une solution de linamaroside, (10 mM)⁶, et d'une solution de tampon acétate (0,2 M, pH 5,5). Immédiatement après, les flacons furent bien bouchés et les contenus légèrement agités; puis ils furent remis au bain-marie. Vingt minutes plus tard un mélange, 1:3, d'une solution saturée d'acide picrique et d'une solution de Na₂CO₃ (0,2 M) fut ajouté; ce mélange bloque rigoureusement l'activité de l'enzyme comme nous l'avons vérifié. Pour les témoins, le mélange: acide picrique-Na₂CO₃ fut ajouté, avant le linamaroside tamponné; ainsi l'enzyme ne peut pas agir sur le linamaroside. À la fin des opérations, tous les flacons contenaient 6 ml de solution. Pour développer la couleur, les flacons furent placés pendant 12 minutes dans de l'eau bouillante. Après refroidissement, les solutions furent diluées avec de l'eau jusqu'à 50 ml, puis filtrées. L'intensité de la couleur fut mesurée au moyen d'un colorimètre, à 540 nm. Les valeurs obtenues furent comparées à celles d'une série étalon. La série étalon comprenait 6 flacons et fut préparée en y mettant successivement des quantités de produits A, B, C, D et E, suivant le schéma du tableau 48. Ainsi, à la fin, chacun des flacons contenait 6 ml de solution. Le développement de la couleur et la détermination de son intensité furent effectués de la même manière que celle décrite ci-dessus.

La courbe étalon était droite pour des quantités allant de 0 à 0,08 mg d'HCN dans les 6 ml de solution en question. Mais toute la coloration ne provenait pas que du cyanure, puisque le picrate de soude donne la même couleur avec d'autres produits, présents dans la solution (cf. section 3.7.8.). En effet, il est préférable que la coloration du témoin ne soit pas trop intense, ce que l'on peut éviter par une dilution de l'extrait.

Nous avons exprimé l'activité enzymatique en unités de µg d'HCN libérés par g de matière fraîche par minute.

⁶ Y compris une petite quantité de lotaustraloside (cf. section 2.2.).

Afin de savoir si pendant l'hydrolyse, il ne se forme par d'autres produits que le cyanure, qui pourraient provoquer la même coloration, nous avons dosé la quantité de cyanure formée pendant l'hydrolyse, non seulement par la méthode colorimétrique, mais encore par distillation, puis titrage à l'AgNO₃. Il s'agissait des extraits d'enzyme des feuilles et de la partie centrale des tubercules. Dans les deux cas, la différence de quantité de cyanure présent au début et à la fin de l'hydrolyse, mesurée par la méthode de distillation, puis titrage, correspondait rigoureusement aux valeurs obtenues par la méthode colorimétrique. Nous pouvons donc en conclure que la différence dans le développement de la couleur des solutions avant et après l'hydrolyse est causée uniquement par l'HCN formé par la dégradation enzymatique du glucoside.

11.3. RÉPARTITION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DANS LA PLANTE

11.3.1. Explication de l'essai

Après avoir obtenu une impression globale de l'activité enzymatique dans différents organes de plantes différentes, nous avons procédé à la détermination de cette activité dans différentes parties de la même plante. Nous avons choisi les clones Tabouca, A 13, Ta 25 et 461. L'essai portait séparément sur les limbes et les pétioles des feuilles de différents âges, sur l'écorce de la tige à différentes hauteurs, sur l'écorce de la bouture, et sur l'écorce et la partie centrale des tubercules. Pour chacun des clones les échantillons furent constitués par 5 plantes. La détermination de l'activité enzymatique fut effectuée selon la méthode présentée ci-dessus.

11.3.2. Résultats

Les résultats (tableau 49) montrent que l'activité enzymatique dans les différentes parties de la plante varie suivant le clone, mais que la tendance de la répartition dans la plante est à peu près la même pour les 4 clones.

Dans les limbes des feuilles, l'activité diminue beaucoup en fonction de l'âge; mais dans les pétioles il ne se présente pas de diminution entre les pétioles des feuilles jeunes adultes et ceux des feuilles plus âgées. Dans les limbes des feuilles, l'activité en fonction de l'âge diminue de façon plus importante chez les clones Tabouca et A 13 que chez les deux autres clones; toutefois, le nombre de clones est trop petit pour en pouvoir conclure que ceci est en rapport avec le degré de toxicité des clones.

Quant à l'écorce des tiges, on observe une forte diminution de l'activité du haut vers le bas et, dans deux cas, nous n'avons pas pu déceler d'activité tout à fait au bas de la tige. L'activité dans l'écorce de la bouture est plus élevée que dans l'écorce du bas des tiges; celle du clone A 13 est relativement très élevée. Dans l'écorce des tubercules, il se présente une activité très forte. En ce qui concerne la partie centrale des tubercules, nous voyons que l'activité enzymatique y est très faible comparée à celle des autres parties de la plante.

TABLEAU 49. Répartition de l'activité enzymatique (μg d'HCN libérés par g de matière fraîche par minute) dans différentes parties de plantes de quatre clones.

Partie de la plante	Clones			
	Tabouca	A 13	Ta 25	461
Feuilles:				
limbes:				
1. très jeunes	450	1000	600	850
2. jeunes adultes	400	600	100	100
3. plus âgés	200	150	10	40
pétioles:				
1. très jeunes	650	1150	350	800
2. jeunes adultes	200	550	300	400
3. plus âgés	250	600	300	350
Écorce des tiges:				
1. près des feuilles les plus âgées	160	170	130	130
2. à 2/3 de la partie sans feuilles	140	110	20	70
3. à 1/3 de la partie sans feuilles	80	160	30	45
4. à l'extrémité inférieure	0	15	0	10
Écorce de la bouture	10	120	0	15
Écorce des tubercules	140	480	160	280
Partie centrale des tubercules	9	13	6	7

Table 49. Distribution of enzyme activity (μg HCN liberated per g fresh weight per minute) in different parts of plants of four clones.

Afin de connaître l'activité enzymatique dans le bois de la tige, nous avons, chez des plantes des clones Tabouca et Ta 25, déterminé l'activité dans l'écorce ainsi que dans le bois des tiges à deux hauteurs: immédiatement au-dessous des feuilles basales et immédiatement au-dessus de la bouture.

Les résultats (tableau 50) montrent qu'au sommet de la tige, l'activité de l'enzyme est moins élevée dans le bois que dans l'écorce, mais qu'en bas c'est l'inverse qui se manifeste. De plus, contrairement aux résultats relevés dans

TABLEAU 50. Activité de la linamarase (μg d'HCN libérés par g de matière fraîche par minute) dans l'écorce et le bois de la tige, en haut (au-dessous des feuilles) et en bas.

	Tabouca		Ta 25	
	écorce	bois	écorce	bois
En haut	145	90	155	75
En bas	15	65	20	35

Table 50. Linamarase activity (μg HCN liberated per g fresh weight per minute) in bark and wood at upper and lower end of stem (leafless part) of two clones.

le tableau 49, dans l'essai présent nous avons bien décelé une activité enzymatique dans l'écorce au bas des tiges des clones Tabouca et Ta 25. Remarquons que pour le dernier essai, les échantillons provenaient de plantes plus jeunes que pour l'autre essai.

11.4. COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES TUBERCULES DE CLONES TRÈS TOXIQUES ET PEU TOXIQUES

L'activité enzymatique paraît être la plus élevée là où la croissance de la plante est la plus importante. Comme nous l'avons expliqué dans la section 4.7. (page 42), nous supposons que la présence du glucoside dans les différents organes de la plante dépend d'un équilibre entre la formation du glucoside, sa transformation, et son transport. On pourrait supposer que cet équilibre

TABLEAU 51. Activité de la linamarase (μg d'HCN libérés par g de matière fraîche par minute) et teneur en glucoside (en μg d'HCN par g de matière fraîche) de l'écorce et de la partie centrale des tubercules de clones peu toxiques et de clones très toxiques.

	Écorce		Partie centrale	
	enzyme	glucoside	enzyme	glucoside
Clones peu toxiques:				
Kokobassie	200	920	9,5	83
Kataoli Togo	180	490	7,0	54
465	90	500	3,5	65
Bapou II	60	600	4,0	59
B 9	160	550	12,0	51
Kokossokro	200	740	10,5	100
Kokotou	250	1180	14,5	120
MO 96	120	520	5,5	46
Moyenne	160	690	8,5	73
Clones très toxiques:				
Gbekre	160	700	8,5	270
513	110	910	4,0	260
B 27	120	870	10,0	340
436	130	1160	9,5	480
435	120	880	7,5	410
619	140	650	10,0	240
B 28	140	800	5,5	380
606	180	710	6,5	220
Moyenne	140	840	7,5	330

Table 51. Linamarase activity (μg HCN liberated per g fresh weight per minute) and glucoside concentration (μg HCN per g fresh weight) in bark and inner part of tuberous roots of less toxic and very toxic clones.

dépend de l'activité enzymatique; si cela était effectivement le cas, on pourrait s'attendre à ce que les tubercules des clones peu toxiques possèdent une activité enzymatique plus élevée que les tubercules des clones très toxiques, supposition qui sera examinée maintenant.

Nous avons déterminé l'activité de la linamarase de l'écorce et de la partie centrale des tubercules de 16 clones, dont 8 peu toxiques et 8 très toxiques. Nous avons également déterminé la teneur en glucoside des échantillons en question.

Les résultats, résumés dans le tableau 51, montrent une variabilité très importante de l'activité enzymatique de l'écorce et de la partie centrale des tubercules. Il ne semble pas que l'activité enzymatique soit en relation avec la teneur en glucoside.

11.5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La connaissance de la répartition de l'activité enzymatique dans la plante nous permet de répondre à quelques questions relatives à la libération de l'HCN par les tissus.

Tout d'abord, l'activité très élevée dans les feuilles et l'écorce des tubercules explique pourquoi l'on n'obtient pas de meilleur rendement en HCN si l'on soumet les homogénats de ces tissus à une macération prolongée (figure 4, page 23): l'enzyme y est tellement active qu'après très peu de temps, tout le glucoside sera hydrolysé. Inversement, puisque l'activité de l'enzyme des tubercules écorcés est très faible, l'hydrolyse de leurs homogénats durera assez longtemps (figure 3, page 22).

Les résultats obtenus nous conduisent à une application pratique: la fermentation des tubercules, que l'on pratique pour se débarrasser de la substance toxique, dure, en général, un ou quelques jours; or, on pourrait s'attendre à accélérer la rapidité de l'hydrolyse en mélangeant du jus de feuilles, ou de l'écorce des tubercules, aux tubercules écorcés et râpés. On pourrait donc faire décomposer en peu de temps le glucoside des tubercules toxiques, puis se débarrasser de l'HCN. En outre, en pratiquant une hydrolyse d'une durée réduite, on pourrait restreindre la dégradation de la valeur nutritive de la matière qui se produit au cours de la fermentation, comme nous l'apprend ADRIAENS (1955).

Par une étude dont les résultats seront présentés dans le chapitre suivant, nous avons vérifié si l'information sur la répartition de l'enzyme dans la plante peut effectivement entraîner des possibilités d'élimination efficace de la substance toxique des tissus de la plante.

En ce qui concerne le point de vue physiologique, nous avons déjà mentionné que l'activité de la linamarase paraît être la plus élevée dans les tissus juvéniles. Il ne se présente pas de relation évidente entre la teneur en glucoside et l'activité de l'enzyme. Il est à remarquer que du haut en bas de l'écorce des tiges, il se manifeste une augmentation de la teneur en glucoside et, inversement, une diminution de

l'activité enzymatique (cf. tableau 21, page 40), ce qui, toutefois, n'implique pas nécessairement une relation directe. Peut être existe-t-il une telle relation, qui ne se révèle pas à cause d'une migration du glucoside. Quoi qu'il en soit, il faudrait effectuer une étude plus approfondie de l'activité de la linamarase pour en tirer des conclusions d'importance physiologique. Remarquons, d'ailleurs, que les phénomènes observés sont peut être la résultante de l'action de toute une série d'enzymes, possibilité que nous n'avons pas étudiée. Des recherches s'y rapportant pourraient apporter une nouvelle clarté dans les problèmes qui nous préoccupent.

12. ÉLIMINATION DE LA SUBSTANCE TOXIQUE DES PARTIES COMESTIBLES DE LA PLANTE

12.1. INTRODUCTION

Avant la consommation des tubercules ou des feuilles de manioc qui contiennent une quantité élevée de glucoside cyanogénétique, il faut les soumettre à une préparation spéciale pour en éliminer la substance toxique. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction générale, dans l'antiquité déjà, la population autochtone de l'Amérique tropicale avait développé des méthodes de préparation des tubercules que en rendaient sans danger la consommation. Dans les nouveaux centres de culture du manioc, hors de l'Amérique, on ne retrouve que partiellement ces anciennes méthodes indiennes; mais dans ces régions de nouvelles méthodes de préparation ont été développées (JONES, 1969). Il y a une grande diversité de méthodes de préparation des tubercules et des feuilles; un aperçu bibliographique détaillé à ce sujet a été fait par GIETEMA-GROENENDIJK (1970); cette dernière prend en considération le degré d'élimination du glucoside cyanogénétique de ces diverses méthodes de préparation. Il est fort probable que la toxicité même du manioc a largement contribué à une telle diversité. En général ces méthodes impliquent l'élimination de l'HCN, bien que dans certains cas, on ne paraisse plus conscient de cette fonction élémentaire (JONES, 1969).

L'élimination de la substance toxique des tubercules et des feuilles du manioc a été le sujet d'étude de plusieurs auteurs; mais une confusion subsiste quant à l'efficacité de certaines de ces méthodes. Dans ce chapitre, nous discuterons du danger d'intoxication par le manioc, puis nous présenterons un aperçu des méthodes d'élimination de l'HCN des tubercules et des feuilles, en ajoutant les résultats de nos propres expériences dans ce domaine.

12.2. DANGER D'INTOXICATION

Bien qu'en général, les consommateurs de manioc connaissent plusieurs méthodes pour éliminer l'HCN il se produit toujours des accidents. Plusieurs auteurs ont rapporté des cas d'intoxication, humaine ou animale, dus à l'ingestion du manioc, non seulement dans le passé, mais encore actuellement. D'après NORMANHA (1965), au Brésil, dans la nouvelle capitale, Brasilia, on a rapporté en juin 1964, 26 cas d'intoxication humaine, dont deux fatals.

Selon BOORSMA (1905), la dose létale d'HCN est de 50-60 mg pour un homme adulte. D'après plusieurs auteurs, cette dose dépend de l'état physiologique de l'organisme. En général, on admet que la dose létale pour l'homme est d'environ 1 mg d'HCN par kg de poids du corps (ADRIAENS, 1946). Pour les animaux elle varie suivant l'espèce (OKE, 1969).

Certains auteurs ont affirmé que la consommation fréquente des quantités de

cyanide, inférieures à la dose létale, peut provoquer des troubles chroniques; mais il n'existe pas de certitude à ce sujet (cf. MONTGOMERY, 1969).

Partant des données de BOORSMA, KOCH (1933) a classifié les clones en trois groupes, suivant la teneur en HCN des tubercules frais et écorcés:

1. < 50 mg d'HCN par kg: inoffensifs;
2. 50-100 mg d'HCN par kg: moyennement toxiques;
3. > 100 mg d'HCN par kg: très toxiques.

Mais cette classification n'est valable que sous des conditions très strictes, puisque, comme nous le savons, la teneur en glucoside des tubercules est très variable et dépend de nombreux facteurs, surtout des facteurs écologiques. On peut donc facilement se tromper en affirmant qu'un clone est inoffensif.

Étant donné que le corps est capable de résister à une certaine quantité d'HCN et de le décomposer peu à peu, la quantité d'HCN administrée au corps par unité de temps est très importante. La quantité d'HCN libre dans les tubercules augmente après l'arrachage, puisque le glucoside est décomposé et l'HCN libéré ne peut pas échapper (CHARAVANAPAVAN, 1944). La quantité totale d'HCN libérable ne paraît pas diminuer lors de la conservation des tubercules pendant 7 jours (JOACHIM et PANDITTESEKERE, 1944). GREENSTREET et LAMBOURNE (1933) ont constaté que l'ingestion par les vaches de certains tubercules, inoffensive tout de suite après la récolte, provoquait des cas d'intoxication au moment où les tubercules étaient devenus colorés, c'est-à-dire après 2 ou 3 jours. Dans les tubercules colorés, tout le glucoside a été décomposé et l'HCN libéré, alors qu'après l'ingestion des tubercules frais, l'HCN n'est libéré que graduellement. D'après BOORSMA (1905), il peut être dangereux de boire de l'eau après l'ingestion de tubercules frais, puisque la libération de l'HCN se déroulerait plus rapide dans un milieu plus aqueux.

Il existe quelque incertitude quant à la possibilité, pour le glucoside d'être hydrolysé dans le système digestif en l'absence de l'enzyme. GUIGNARD (1906) a suggéré que le linamaroside pourrait être décomposé dans l'estomac. NIJHOLT (1932), ainsi que CERIGHELLI (1955), mentionnent que les sucs intestinaux renferment une enzyme capable d'hydrolyser le glucoside. AULD (1911) a donné à des cochons d'Inde une quantité de linamaroside et d'amygdalosite, équivalente à 12 fois la dose létale d'HCN, sans qu'il ait eu à signaler des symptômes de maladie. En revanche, CHARAVANAPAVAN (1944) a constaté que 1,5 g d'une solution contenant une quantité de linamaroside, sans l'enzyme, équivalente à 10 mg d'HCN, tuait de jeunes lapins, pesant 110 g, en 3 heures. GREENSTREET et LAMBOURNE ne considèrent pas comme dangereuse l'ingestion d'une quantité de glucoside dont l'équivalent en HCN est légèrement plus élevé que la dose létale d'HCN, mais ils évoquent le danger de l'ingestion, ensuite, d'une petite quantité de tubercules frais, contenant l'enzyme; il est évident que dans une telle situation, l'ingestion d'autres plantes contenant la linamarase, peut aussi être fatale. MONTGOMERY (1965) affirme qu'il n'a jamais été démontré que les glucosides cyanogénétiques sont toxiques. Cependant, ce dernier auteur cite plusieurs cas d'intoxication dus à l'ingestion de graines de *Phaseolus lunatus*

qu'il ne sait pas expliquer; ces graines étaient privées de l'enzyme hydrolysante par suite de la cuisson.

Puisque l'hydrolyse de la linamaroside exige une enzyme spécifique, la linamarase, il est peu probable que l'estomac contienne une enzyme qui puisse hydrolyser ce glucoside. Mais nous savons que le glucoside peut être hydrolysé par l'action des acides (cf. section 3.7.6.). D'après GREENSTREET et LAMBOURNE (1933), le contenu de l'estomac de l'homme ne peut hydrolyser que peu de glucoside. Mais cela implique que l'ingestion d'une quantité élevée de glucoside, privé de l'enzyme risque d'être dangereuse. Or, nous supposons que le glucoside n'est pas toxique tel quel, et qu'il n'est pas hydrolysé par les enzymes dans l'estomac, mais que, en revanche, il peut être hydrolysé lentement dans le milieu acide de l'estomac, libérant ainsi, dans certaines conditions, une quantité dangereuse d'HCN. Il est évident que ce problème devrait être étudié plus à fond par des nutritionnistes.

12.3. MÉTHODES D'ÉLIMINATION DU GLUCOSIDE ET DE L'HCN

12.3.1. Cuisson et friture

12.3.1.1. Pour les tubercules

Certains auteurs (BOORSMA, 1905; COLLENS, 1915; RAYMOND et al., 1941; CORREIA, 1947; PEREIRA et al., 1960) affirment que pratiquement tout l'HCN est éliminé par la cuisson, ou par le grillage des tubercules, et suggèrent qu'après la cuisson l'ingestion des tubercules est sans danger. Il a été démontré par DUNSTAN et HENRY (1903), que les cristaux de linamaroside fondent à 141 °C, ce qui veut dire que la cuisson élimine l'enzyme, mais pas le glucoside, comme l'ont affirmé d'autres auteurs (GUIGNARD, 1906; NIJHOLT, 1932; GREENSTREET et LAMBOURNE, 1933; JOACHIM et PANDITSEKERE, 1944).

NIJHOLT (1932), supposant que l'estomac contient une enzyme capable d'hydrolyser le glucoside, affirme que le glucoside qui reste dans les tubercules après la cuisson ou le grillage est aussi dangereux que l'HCN. D'après ce dernier auteur, plus de 50% du glucoside peut rester dans les tubercules après la cuisson, et jusqu'à 80% après le grillage. CHARAVANAPAVAN (1944) affirme que les tubercules écorcés, coupés en tranches, et cuits avec beaucoup d'eau, ne contiennent pas plus de glucoside qu'une quantité équivalente à 50 µg d'HCN par g; mais il ne mentionne pas la teneur initiale.

Nous avons effectué une expérience de cuisson. Une quantité de tubercules venant d'être enlevés, fut partagée en deux lots par découpage longitudinal. Pour un lot la teneur en glucoside fut déterminée de façon normale. Les morceaux de l'autre lot furent mis dans de l'eau bouillante pendant un demi heure, puis la teneur en glucoside fut déterminée avec addition ou non d'enzyme exogène, préparée à partir des feuilles. L'expérience fut effectuée avec deux clones. Sans addition d'enzyme, nous n'avons trouvé que 1% et 5% de la teneur en glucoside initiale, mais avec addition d'enzyme nous trouvions 92% et 87% de cette quantité. Donc, par la cuisson, nous n'avons éliminé que 10% du gluco-

side; si la quantité absolue qui reste dans les tubercules est très élevée, l'ingestion de ceux-ci pourrait être dangereuse, comme nous l'avons suggéré ci-dessus (12.2.) Donc, si la cuisson ne rend pas inoffensive l'ingestion des tubercules dans tous les cas, nous supposons qu'elle diminue le risque d'intoxication; mais nous ignorons la dose létale de glucoside pour l'homme.

12.3.1.2. Pour les feuilles

Comme dans le cas des tubercules, plusieurs auteurs (GREENSTREET et LAMBOURNE, 1933; VAN VEEN, 1938; RAYMOND et al., 1941; CHARAVANAPAVAN, 1944; JOACHIM et PANDITSEKERE, 1944; RAZAFIMAHERY, 1954; PECHNIK et GUIMARAES, 1963; TERRA, 1964) ont préconisé la cuisson pour l'élimination de l'HCN des feuilles. Une période de cuisson de 15 minutes paraît être suffisante pour rendre inoffensive la consommation des feuilles, à condition que l'on jette l'eau de cuisson. Certains auteurs recommandent de couper les feuilles en morceaux avant d'effectuer la cuisson.

Nous avons examiné quel pourcentage de glucoside on peut éliminer par la cuisson, pendant 20 minutes, d'une part des limbes entiers des feuilles et d'autre part des limbes coupés en morceaux. Nous avons déterminé la teneur en glucoside des feuilles cuites et celle de l'eau de cuisson séparément. Les résultats, groupés dans le tableau 52, indiquent que l'élimination du glucoside s'effectue d'une manière beaucoup plus efficace si l'on coupe les feuilles en morceaux avant la cuisson: le pourcentage de glucoside disparu, apparemment par hydrolyse avant la cuisson, est très élevé, et il n'en reste que 10% dans les feuilles si l'on jette l'eau de cuisson. Ces 10% représentent une teneur en glucoside équivalente à 75 µg d'HCN par g, quantité inoffensive, étant donné que l'on ne consommera pas une très grande quantité de feuilles en une seule fois.

12.3.2. Séchage

Plusieurs auteurs ont affirmé que le séchage des tubercules en fait diminuer la teneur en glucoside. Plus le découpage est fin, plus le séchage est efficace. CHARAVANAPAVAN (1944) a démontré qu'une bonne méthode pour éliminer le

TABLEAU 52. Influence de la cuisson sur la teneur en glucoside des limbes de feuilles entières et de feuilles coupées en morceaux.

	Feuilles entières	Feuilles coupées
Teneur en glucoside initiale	100 (= 570*)	100 (= 760*)
Glucoside dans l'eau de cuisson	56	21
Glucoside resté dans les feuilles	19	10
Glucoside disparu	25	69

* µg d'HCN par g de matière fraîche

Table 52. Effect of boiling on glucoside content of whole and chopped leaves.

Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 71-13 (1971)

glucoside des tubercules est de les couper en morceaux (cossettes) ou de les râper, puis de garder la matière à la température ambiante pendant un jour, et ensuite de la sécher à 60°C. Il arrivait ainsi à éliminer 83% du glucoside des cossettes et 90% des tubercules râpés. Cet auteur affirme que le séchage à des températures élevées est défavorable, puisque l'enzyme est détruite à 72°, et, par la suite, le glucoside reste dans les tubercules. CORREIA (1947) a séché des échantillons de tubercules coupés en petits morceaux de 20 clones, en les exposant au soleil pendant 3 jours; ainsi la teneur en glucoside fut réduite, suivant les cas, de 57 à 87%, en moyenne de 73%. Des pourcentages analogues ont été obtenus par RAZAFIMAHERY (1954), par DIDIER DE ST AMAND (1960) et par nous-même. JOACHIM et PANDITTESEKERE (1944) arrivaient à éliminer au moyen du séchage, environ 30% du glucoside des tubercules coupés en morceaux.

Quant à l'écorce des tubercules, DIDIER DE ST AMAND fait mention d'une diminution de la teneur en glucoside des échantillons d'écorce coupée variant de 47 à 74%, après exposition à l'air pendant 3 jours. WOOD (1966) observa une diminution de la teneur dans l'écorce, probablement non coupée, de 13% par la dessiccation à l'air, et de 29% par la dessiccation au soleil.

Par notre propre expérience, nous pouvons affirmer que le séchage élimine le glucoside très efficacement, si les tissus ont été broyés auparavant. Par séchage à 50°C, après broyage au moyen d'un hachoir à viande, nous avons pu éliminer 98% du glucoside des tubercules écorcés et de celui de l'écorce des tubercules, et 87% du glucoside des feuilles.

À l'exemple d'une expérience effectuée par CHARAVANAPAVAN (1944) avec des tubercules écorcés, nous avons examiné l'influence du séchage à 50° et à 90° sur la teneur en glucoside des feuilles et de l'écorce des tubercules. Les échantillons de la matière séchée et moulue furent mis à macérer pendant 15 heures à 26°C, après addition ou non d'extrait d'enzyme. Les résultats (tableau 53) montrent que le séchage à 90°C élimine beaucoup plus de glucoside que le séchage à 50°C, ce qui nous paraît étrange puisque lors du séchage à 90°C l'en-

TABLEAU 53. Influence du séchage à 50° et à 90°C sur la teneur en glucoside des feuilles et de l'écorce des tubercules.

	Sans addition d'enzyme		Avec addition d'enzyme	
	feuilles	écorce	feuilles	écorce
Teneur en glucoside initiale	100 (= 3006*)	100 (= 2970*)	100	100
Après séchage à 50°C	74	41	73	36
Après séchage à 90°C	8	15	6	11

* µg d'HCN par g de matière sèche

Table 53. Effect of drying at 50°C and at 90°C on glucoside content of leaves and of bark of tuberous roots.

zyme est détruite et le glucoside devrait rester. Nous ne savons pas expliquer pourquoi l'addition de la linamarase n'augmente pas le rendement en HCN après séchage à 90°C. Remarquons que nous avons trouvé des résultats identiques en répétant l'expérience, et l'activité de la linamarase de l'extrait que nous avons utilisé était très élevée. Nos résultats sont en désaccord avec ceux de CHARAVANAPAVAN; après séchage des tubercules à 90°C, cet auteur obtenait encore 84% de l'HCN libérable initialement. Il est évident que cette question devrait être étudiée plus à fond.

12.3.3. *Trempage*

Pour éliminer la substance toxique des tubercules, le trempage à l'eau, souvent pendant plusieurs jours, est pratiqué dans beaucoup de régions de culture du manioc, comme l'affirment plusieurs auteurs, parmi lesquels JONES (1969). Lors du trempage, le glucoside se dissout dans l'eau ou est hydrolysé dans les tubercules. En général le trempage est suivi de la cuisson ou du séchage de la matière, ce qui élimine la plupart de l'HCN retenu.

D'après GREENSTREET et LAMBOURNE (1933), un trempage de courte durée, mais d'une heure au moins, suivi par la cuisson, permet d'éliminer pratiquement tout le glucoside de tubercules bien coupés en petites tranches. JOACHIM et PANDITTESEKERE (1944) ont constaté que la teneur en glucoside de tubercules coupés en tranches diminuait de 46% par le simple séchage, alors que cette réduction était de 64% si le séchage avait été précédé par un lavage des tranches, et de 68% si, avant le séchage on avait procédé à un trempage des tranches dans l'eau, pendant une nuit.

Bien qu'il soit sûr que le trempage prolongé élimine tout le glucoside et pratiquement tout l'HCN, ADRIAENS (1955) nous apprend que cette méthode provoque une réduction assez importante de la valeur nutritive du produit.

Aussi la teneur en glucoside des feuilles peut être réduite considérablement par le trempage. DARJANTO (1952) a trouvé des pourcentages de réduction de 79 et de 95 par le trempage des feuilles à l'eau pendant 20 heures, alors que la teneur des feuilles témoins n'était réduite que de 14 et de 9%.

12.3.4. *Râpage, broyage, pilage*

Le râpage fait partie de plusieurs méthodes de préparation des tubercules du manioc, et il est un moyen efficace pour éliminer le glucoside cyanogénétique (GIETEMA-GROENENDIJK, 1970). En effet, par râpage, broyage ou pilage des tissus, on brise les cellules ce qui facilite le contact entre le glucoside et l'enzyme, et, par conséquent, permet l'hydrolyse du glucoside. Puis il reste à éliminer l'HCN libéré, ce qui se produit lors du séchage ou du chauffage du produit, actions que l'on effectue en général après le râpage. Mais, comme dans le cas du trempage prolongé, une période de fermentation de quelques jours après le râpage des tubercules, entraîne une diminution de la valeur nutritive (OKE, 1966).

Le pilage est souvent employé pour la préparation des feuilles de manioc. Il est évident qu'à cause de l'activité très élevée de la linamarase dans les

feuilles, le pilage de celles-ci provoque une hydrolyse rapide du glucoside; l'HCN libéré disparaîtra lors de la cuisson. Nous avons constaté que des feuilles broyées au moyen d'un hachoir à viande; puis cuites pendant 20 minutes, contenaient 25 µg d'HCN par g alors que la teneur en glucoside initiale correspondait à 380 µg d'HCN par g.

En 12.3.2. nous avons déjà souligné que le séchage élimine très efficacement le glucoside des tissus si ceux-ci ont été broyés auparavant.

12.3.5. Addition de glucose

D'après ADRIAENS (1946) la farine des cossettes de tubercules, importées en Europe, contient encore une certaine quantité de glucoside et de linamarase. Il affirme que l'HCN libéré du glucoside lors de l'humectation de cette farine, peut être éliminé par l'addition de glucose; 5,4 g de glucose seraient suffisants pour rendre inoffensif 1 kg de farine, même si une quantité de 100 mg d'HCN en est libérée.

Nous avons examiné si l'addition de glucose pouvait éliminer une partie de l'HCN libéré des tubercules frais. À des échantillons de tubercules écorcés et d'écorce des tubercules nous avons additionné une quantité de glucose correspondant à 1% du poids frais, puis nous avons effectué la distillation après différents temps de macération. Les résultats (tableau 54) indiquent que le pourcentage de réduction est très faible, bien que le glucoside semble réduire quelque peu le rendement en HCN.

Nous avons effectué une autre expérience avec des échantillons de tubercules écorcés, en ajoutant des quantités respectives de glucose de 0, 5, et 10% du poids frais des échantillons. Après une période de macération de 18 heures à 37°C, la diminution du rendement en HCN n'était que de 2% après l'addition de 5% de glucose, et de 4% après l'addition de 10% de glucose. Nous ne pouvons donc pas confirmer les résultats obtenus par ADRIAENS.

TABLEAU 54. Influence de l'addition de glucose (1% du poids frais) sur le rendement en HCN (µg par g de matière fraîche) des homogénats de tubercules écorcés et de l'écorce des tubercules, après différents temps de macération.

Temps de macération (heures)	Tubercules écorcés		Écorce des tubercules	
	sans glucose	avec glucose	sans glucose	avec glucose
0	66	64	2330	2280
2	154	154	2270	2260
4	167	166	2270	2220
24	171	169	2240	2130

Table 54. Effect of addition of glucose (1% of fresh weight) on HCN output (µg per g fresh weight) of homogenates of inner part and bark of tuberous roots, for different maceration times.

12.4. INFLUENCE DE L'ADDITION D'ENZYME SUR L'ÉLIMINATION DU GLUCOSIDE DES TUBERCULES ÉCORCÉS ET RÂPÉS

Il est évident que la durée de l'hydrolyse du glucoside dans les tubercules râpés dépendra de l'activité de la linamarase de ceux-ci. Ayant établi que cette activité est très faible dans les tubercules écorcés et très élevée dans les feuilles et dans l'écorce des tubercules, nous avons été amenés à examiner la possibilité d'améliorer l'efficacité de l'élimination du glucoside des tubercules.

Dans un premier temps, nous avons mélangé des homogénats de tubercules écorcés et fraîchement râpés avec des extraits respectifs de feuilles jeunes, de feuilles âgées, d'écorce des tiges et d'écorce des tubercules. La distillation fut effectuée tout de suite après le mélange. Le tableau 55 groupe les rendements en HCN obtenus. Dans tous les cas le rendement en HCN des mélanges est plus élevé que la somme des rendements individuels. Nous pouvons donc conclure que l'hydrolyse du glucoside dans les homogénats des tubercules écorcés est accélérée considérablement par l'enzyme présente dans les extraits. L'influence la plus forte paraît être causée par les jeunes feuilles, certainement à cause de l'activité très élevée de la linamarase dans ces tissus.

Dans un deuxième temps, nous avons examiné l'influence du mélange des homogénats de tubercules écorcés avec ceux de feuilles et d'écorce des tubercules; la quantité des homogénats de tubercules écorcés fut choisie 10 fois plus élevée que la quantité des autres homogénats. Nous avons prélevé sur une plante une quantité de feuilles; celles-ci furent gelées puis broyées dans un hachoir à viande. Puis nous avons décortiqué les tubercules de la même plante; le poids de l'écorce revenait à 12% du poids de la partie centrale. L'écorce fut gelée puis broyée dans le hachoir à viande. Les tubercules écorcés furent refroidis à 4°C puis râpés. Ensuite nous avons pesé, en réfrigérant la matière, des quantités de 25 g de l'homogénat des tubercules écorcés, et des quantités de 2,5 g de l'homogénat des feuilles et de l'écorce des tubercules. Nous avons aussi préparé des

TABLEAU 55. Influence sur le rendement en HCN (mg), du mélange d'un homogénat de tubercules écorcés avec des extraits de feuilles jeunes, de feuilles âgées, de l'écorce des tiges et de l'écorce des tubercules.

Origine des extraits	Rendement des extrait simples	Rendement des mélanges		
		'prévu'	obtenu	différence
Feuilles jeunes	1,25	1,73 (= 0,48* + 1,25)	4,55	+ 2,82
Feuilles âgées	0,42	0,90 (= 0,48 + 0,42)	2,69	+ 1,79
Écorce des tiges	1,33	1,81 (= 0,48 + 1,33)	3,15	+ 1,34
Écorce des tubercules	2,32	2,80 (= 0,48 + 2,32)	4,30	+ 1,50

* rendement témoin de l'homogénat des tubercules écorcés: 0,48 mg

Table 55. Effect of addition of extracts of young leaves, older leaves, stem bark, and bark of tuberous roots, on HCN output (mg) of a homogenate of peeled tuberous roots.

TABLEAU 56. Influence sur le rendement en HCN (mg), du mélange d'un homogénat de tubercules écorcés avec celui des feuilles et celui de l'écorce des tubercules, en fonction du temps de macération à l'eau.

Temps de macération (heures)	Homogénats simples			Mélanges des homogénats					
	tubercules écorcés	feuilles	écorce des tubercules	tuberc. éc. + feuilles			tuberc. éc. + éc. des tuberc.		
				'prévu'	ob-tenu	diffé-rence	'prévu'	ob-tenu	diffé-rence
0	1,59	2,34	2,17	3,93	4,62	+0,69	3,74	4,07	+0,33
1	3,30	2,33	2,15	5,63	7,55	+1,92	5,45	7,45	+2,00
2	4,54	2,31	2,12	6,85	7,52	+0,67	6,66	7,41	+0,75
3	5,08	2,37	2,20	7,45	7,59	+0,14	7,28	7,38	+0,10
6	5,27	2,33	2,12	7,60	7,56	-0,04	7,39	7,38	-0,01
18	5,27	2,20	2,10	7,47	7,30	-0,17	7,37	7,07	-0,30

Table 56. Effect on HCN output (mg) of a homogenate of peeled tuberous roots, of mixing this homogenate with those of leaves and bark of tuberous roots, as a function of maceration time.

mélanges contenant 25 g de l'homogénat des tubercules écorcés et 2,5 g de l'homogénat des feuilles ou de celui de l'écorce des tubercules. La distillation fut effectuée après différents temps de macération à l'eau (100 ml). Le tableau 56 groupe les rendements en HCN obtenus. Nous voyons que dans les mélanges, l'hydrolyse du glucoside des tubercules écorcés se déroule beaucoup plus rapidement que dans les échantillons de l'homogénat des seuls tubercules écorcés. Dans les mélanges, le rendement maximal est atteint après une heure. Après 6 heures de macération le rendement en HCN des mélanges correspond à la somme des rendements des homogénats simples, mais après 18 heures de macération le rendement des mélanges est légèrement inférieur à la somme des rendements simples; donc une quantité d'HCN a disparu lors de la macération.

L'activité de la linamarase des homogénats des tubercules écorcés, des feuilles et de l'écorce des tubercules, s'élevait respectivement à 3,3, 174, et 140 µg d'HCN libéré par g de matière fraîche par minute.

Nous avons effectué une autre expérience de mélange, plus ou moins analogue à la précédente. Dans cette expérience, la préparation des homogénats et la pesée des échantillons ne furent pas effectuées en réfrigérant la matière, mais à la température ambiante. De plus, les homogénats furent d'abord bien mélangés, puis les échantillons furent pesés et, sans addition de l'eau, mis dans des flacons bouchés. Les 100 ml d'eau ne furent ajoutés que peu avant la distillation, et celle-ci fut effectuée après des temps de conservation respectifs de 0, 1, 2, 3, et 4 heures. Les résultats (tableau 57) montrent que la conservation simple des homogénats donne un aussi bon rendement en HCN que la macération à l'eau (tableau 56). Après une heure, pratiquement tout le glucoside a été hydrolysée dans les mélanges avec l'homogénat de l'écorce des tubercules. Dans le mélange avec l'homogénat des feuilles, le rendement maximal en HCN est déjà atteint tout de suite après le mélange, probablement parce que la

TABLEAU 57. Influence sur le rendement en HCN (mg), du mélange d'un homogénat de tubercules écorcés avec celui des feuilles et celui de l'écorce des tubercules, en fonction du temps de conservation, à 26°C.

Temps de conservation (heures)	Homogénat simple de tubercules écorcés	Mélanges des homogénats					
		tuberc. éc. + feuilles			tuberc. éc. + éc. des tuberc.		
		'prévu'	obtenu	différence	'prévu'	obtenu	différence
0	1,05	1,55*	5,60	+4,05	2,51**	6,20	+3,69
1	1,81	2,31	5,35	+3,04	3,27	6,80	+3,53
2	3,88	4,38	5,40	+1,02	5,34	6,82	+1,48
3	4,65	5,15	5,19	+0,04	6,11	6,86	+0,75
4	5,20	5,70	5,33	-0,17	6,66	6,90	+0,24

* 1,05+0,50: (homogénat simple des feuilles = 0,50)

** 1,05+1,46: (homogénat simple de l'écorce des tubercules = 1,46)

Table 57. Effect on HCN output (mg) of a homogenate of peeled tuberous roots, of mixing this homogenate with those of leaves and bark of tuberous roots, as a function of storage time, at 26°C.

préparation des homogénats fut effectuée à une température plus élevée que dans l'expérience précédente.

Quelques échantillons de l'homogénat des tubercules écorcés, ainsi que des mélanges furent conservés pendant 21 heures à 37°C dans des flacons ouverts. Le rendement en HCN obtenu après cette période était considérablement inférieur au rendement potentiel initial (tableau 58); le rendement en HCN des échantillons de l'homogénat des tubercules écorcés, après une période normale de macération à l'eau, s'élevait à 6,47 mg. Après la conservation les échantillons n'étaient pas encore secs, et on peut s'attendre à ce qu'il ne reste que très peu d'HCN dans la matière après séchage complet, le séchage après broyage

TABLEAU 58. Diminution du rendement en HCN (mg) d'un homogénat de tubercules écorcés et des mélanges de cet homogénat avec celui des feuilles et celui de l'écorce des tubercules, au cours d'une période de conservation de 21 heures à 37°C dans des flacons ouverts.

	Homogénat simple des tubercules écorcés	Mélanges des homogénats	
		tuberc. éc. + feuilles	tuberc. éc. + éc. des tuberc.
Rendement potentiel initial	6,47	6,97	7,93
Rendement après conservation	1,08	1,62	0,97
HCN disparu	83%	77%	88%

Table 58. Reduction of HCN output (mg) of samples of a homogenate of peeled tuberous roots and of a mixture of samples of this homogenate with those of leaves and bark of tuberous roots, after storage in open jars for 21 hours at 37°C.

provoquant une diminution importante de la teneur en glucoside (cf. section 12.3.2.).

Les résultats de nos expériences permettent de conclure que l'on peut provoquer une accélération considérable de l'hydrolyse du glucoside des tubercules écorcés et râpés, en les mélangeant avec de la matière broyée des feuilles ou de l'écorce des tubercules.

12.5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les différentes méthodes de préparation du manioc entraînent l'élimination d'une quantité plus ou moins importante de glucoside ou d'H₂CN. La connaissance de la répartition de la linamarase dans la plante permet de mieux comprendre l'efficacité de ces méthodes pour éliminer la toxicité des produits du manioc. Certaines méthodes de préparation provoquent la disparition d'une partie du glucoside par la simple solution à l'eau, par exemple le trempage de tranches de tubercules et la cuisson des feuilles. Mais, en général le glucoside doit être hydrolysé. Comme nous l'avons mentionné, la rapidité de l'hydrolyse du glucoside dépend d'une part, de l'intensité du contact entre le glucoside et la linamarase, donc du degré de réduction des tissus, et, d'autre part, de l'activité de l'enzyme. Dans les feuilles et dans l'écorce des tubercules, l'activité de la linamarase est tellement élevée que l'hydrolyse du glucoside se déroule très rapidement après le broyage de ces tissus. Mais dans la partie centrale des tubercules, l'activité de l'enzyme est très faible, et l'hydrolyse peut être accélérée considérablement par l'addition d'une quantité d'enzyme après le râpage (12.4). On peut ainsi provoquer l'hydrolyse rapide du glucoside des tubercules par broyage des tubercules entiers, donc l'écorce incluse. Le glucoside sera hydrolysé en très peu de temps, et l'on peut se débarrasser de l'H₂CN libéré par séchage de la matière. Remarquons qu'un tel mélange pourrait être important également au point de vue nutritif, puisque l'écorce, qui comprend environ 15% du poids des tubercules, est beaucoup plus riche en éléments nutritifs que la partie centrale du tubercule (BARRIOS et BRESSANI, 1967). Mais il est possible que le goût du produit obtenu ne soit pas agréable, et que le produit doive être plutôt destiné à la consommation animale qu'à la consommation par l'homme. Pour accélérer l'hydrolyse du glucoside des tubercules écorcés destinés à la consommation humaine, l'addition de jus de feuilles ou d'écorce de tubercules pourrait présenter des possibilités pour simplifier certaines méthodes de préparation.

Quoi qu'il en soit, la continuation de l'expérimentation sur ce domaine nous paraît opportune, en ce qui concerne la préparation des produits du manioc destinés, non seulement à la consommation humaine, mais encore à la consommation animale.

RÉSUMÉ

Les tubercules du manioc peuvent émettre une quantité d'acide cyanhydrique (HCN), telle que leur consommation, sans préparation spéciale, peut être très dangereuse. Bien qu'on connaisse plusieurs méthodes pour éliminer la substance toxique, on rencontre toujours des cas d'intoxication, parfois mortels, dus à la consommation de tubercules. De plus, certaines de ces méthodes aboutissent à une diminution importante de la valeur nutritive.

Pour la préparation des denrées alimentaires à base de manioc, destinées à la consommation humaine ou animale, il est très important d'avoir une connaissance détaillée du caractère cyanogénétique de la plante. Les recherches entreprises jusqu'à ce jour renferment encore beaucoup de lacunes et souvent les résultats obtenus sont contradictoires.

Nous présentons un aperçu bibliographique sur la cyanogénèse des plantes (Chapitre 2).

La propriété cyanogénétique a été signalée dans de nombreuses espèces parmi les Phanérogames, mais on la trouve aussi parmi les Cryptogames. Plusieurs plantes cultivées sont cyanogénétiques; nous mentionnons, en dehors du manioc: le sorgho, l'hevéa, le trèfle blanc, le *Phaseolus lunatus*, l'amande et plusieurs autres espèces de *Prunus*.

Dans la plante l'HCN est émis quand le glucoside cyanogénétique est mis en contact avec l'enzyme qui provoque sa décomposition; ce contact peut être établi par simple froissement des tissus. Selon la conception actuelle de la cyanogénèse, la formation et la décomposition des glucosides cyanogénétiques s'effectuent dans la plante parallèlement, et on admet que la cyanogénèse est en relation avec le métabolisme des acides aminés. En effet, des études récentes ont démontré que, pour plusieurs glucosides cyanogénétiques, la biosynthèse d'un glucoside passe par l'acide aminé dont la constitution moléculaire ressemble à celle de l'aglycone du glucoside en question. Ainsi, dans le manioc, le linamaroside et le lotaustraloside, glucosides cyanogénétiques de cette plante (proportion 20:1), sont respectivement formé par la voie de la valine et de l'isoleucine.

La teneur en glucoside cyanogénétique (dans la suite nous désignerons le terme 'glucoside cyanogénétique' simplement sous le nom de 'glucoside') est très différente pour les espèces de la même famille, et pour les plantes d'une même espèce. Cette teneur dépend aussi du stade de développement des tissus ou des plantes, et, de plus, elle est très variable suivant les conditions écologiques.

Au début nous avons limité nos recherches à l'étude de l'influence de quelques facteurs écologiques sur la toxicité des tubercules. Mais, pour mieux comprendre le caractère cyanogénétique, il nous a paru indispensable d'étudier aussi d'autres parties de la plante, et notamment les feuilles.

Nous présentons (Chapitre 3) les méthodes utilisées pour déterminer la

Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 71-13 (1971)

teneur en glucoside des différentes parties de la plante, dont la mise au point permet de dégager quelques conclusions:

- pour constituer des échantillons, la quantité de tubercules à râper peut être réduite par découpage longitudinal des tubercules;
- les échantillons de tubercules écorcés et râpés peuvent être conservés à 2°C dans des flacons bouchés, pendant une semaine, sans risquer une diminution importante de l'HCN libérable;
- la conservation de différents tissus, coupés ou non, à -15°C ne provoque pas de diminution de l'HCN libérable pendant au moins deux mois;
- pour l'hydrolyse du glucoside des homogénats de tubercules écorcés nous préconisons une macération de 16-20 heures, à 35-40°C;
- l'homogénéisation au mixer des feuilles, et de l'écorce des tiges et celle des tubercules, provoque une hydrolyse très rapide du glucoside; une macération prolongée est inutile et même diminue le rendement en HCN des homogénats des feuilles;
- l'addition d'un tampon (pH 5,5-6,0), d'acide dilués, ou d'enzyme supplémentaire, pendant la macération des homogénats de tubercules écorcés, n'influe pas sur le rendement en HCN;
- la teneur en glucoside déterminée par la voie du dosage de l'HCN est, en général, sousestimée, à cause du blocage partiel de l'HCN libéré.

Nous avons étudié la répartition du glucoside dans la plante et plus spécialement dans les tubercules (Chapitre 4).

Dans les feuilles la teneur diminue en fonction de l'âge, plus fortement dans les pétioles que dans les limbes. Pour les feuilles très jeunes, non adultes, la teneur des limbes est inférieure à celle des pétioles; dans les feuilles âgées c'est l'inverse qui se présente.

Dans l'écorce de la tige (partie dépourvue de feuilles) la teneur diminue de façon importante du haut vers le bas. La teneur de l'écorce de la bouture originale est inférieure à celle de l'écorce à l'extrémité inférieure des tiges. La teneur de l'écorce des tubercules égale ou surpasse celle de l'écorce à l'extrémité inférieure, la partie proche du pédoncule est la plus riche en glucoside. En direction transférieure des tiges.

Dans la même plante la teneur peut varier de façon importante d'un tubercule à l'autre. L'existence d'une relation entre la teneur en glucoside et la largeur des tubercules n'est pas évidente. Dans les tubercules écorcés, la répartition du glucoside en fonction de la distance du pédoncule est assez variable, mais en versale la teneur augmente en passant de l'extérieur vers le centre.

L'écorce des tubercules est beaucoup plus riche en glucoside que la partie interne; la différence est beaucoup plus grande pour les clones peu toxiques que pour les clones très toxiques. Mais en ce qui concerne les feuilles et l'écorce des tubercules, on ne relève que de faibles différences de teneur entre des clones peu et très toxiques. C'est donc surtout la teneur en glucoside de la partie centrale des tubercules qui permet d'opposer les clones au point de vue de leur toxicité. L'hypothèse est avancée que les clones à tubercules peu toxiques et ceux à tuber-

cules très toxiques ont la même capacité de former le glucoside, mais que les clones peu toxiques sont plus aptes à le transformer. Cette transformation paraît la plus forte dans la région autour du cambium.

L'étude de l'influence des engrais azoté, phosphaté, pottassique, calcique et magnésique, et du fumier (Chapitre 5), a mis en évidence que la potasse et le fumier ont un rôle négatif dans la cyanogénèse, alors que l'azote a un rôle positif. L'influence de la potasse et du fumier était plus marquée dans les tubercules que dans les feuilles. En général, les engrais phosphaté, magnésique et calcique n'avaient pas d'influence importante.

La supposition que la teneur en glucoside est en corrélation positive avec la disponibilité de la valine et de l'isoleucine dans la plante nous permet d'expliquer le rôle que jouent l'azote et la potasse. En effet, pour plusieurs plantes il a été démontré que la teneur en acides aminés dans les feuilles est augmentée par un apport d'azote et diminuée par un apport de potasse.

L'expérimentation sur l'influence des engrais a fourni des résultats de même tendance suivant que les essais furent effectués au champ avec des plantes adultes, ou en sachets en plastique avec des jeunes plantes. Donc, l'expérimentation pourrait être simplifiée en utilisant de jeunes plantes, cultivées en sachets.

Aucun indice ne permet d'affirmer que la saison sèche à Adiopodoumé, Bouaké et Man modifie la teneur en glucoside des tubercules écorcés; ce n'est qu'à Ferkéssédougou que peut-être, il y a une augmentation.

Mais, les essais avec de jeunes plantes cultivées en sachets, ont mis en évidence que la teneur en glucoside des feuilles et des racines augmente en fonction de la sécheresse (figure 6).

Nous concluons que la sécheresse provoque aussi au champs une augmentation de la teneur en glucoside, mais qu'au champ, l'influence de la sécheresse ne se manifeste qu'après une période sèche suffisamment longue et rigoureuse, les plantes étant capables de s'adapter à des petites périodes sèches, par le dépouillement partiel de leurs feuilles.

Pendant trois ans, l'évolution de la teneur en glucoside des tubercules écorcés au cours de la période de croissance a été étudiée sur un terrain de forêt récemment défrichée (Chapitre 7). Dans la première année il s'est manifesté une augmentation importante. Pendant la deuxième année, la teneur n'a plus subi d'augmentation. Nous supposons que l'augmentation pendant la première année est causée par l'appauvrissement du terrain, surtout en matière organique.

L'expérimentation dans quatre localités en Côte d'Ivoire a mis en évidence que la teneur en glucoside des tubercules écorcés peut augmenter de façon importante au début de la saison des pluies (figures 7 - 9). Nous supposons que cette augmentation est en relation avec l'augmentation des besoins des plantes en éléments nutritifs, parmi lesquels l'azote et la potasse sont très importants, et

avec le changement de la disponibilité des éléments (augmentation de la nitrification de la matière organique à cause des premières pluies; plus tard, lixiviation des éléments pendant les grandes pluies).

La toxicité des tubercules varie de façon importante suivant la localité de culture; elle est en relation inverse avec la richesse du sol, qui en est responsable au moins partiellement. Cette variation n'est pas la même pour les différents clones.

Nos résultats ne permettent pas de conclure à l'existence d'une relation directe entre l'âge des plantes et la teneur en glucoside des tubercules, contrairement aux affirmations d'autres auteurs. Il nous semble fort probable que les fluctuations qui se manifestent au cours de la période de végétation sont plutôt dues aux changements des conditions écologique qu'à l'âge des plantes.

L'ombrage des jeunes plantes provoque une augmentation de la teneur en glucoside des feuilles et une diminution de celle des racines (figure 11).

La teneur en glucoside, par rapport au poids sec, des feuilles augmente pendant la nuit et diminue pendant la journée (figures 12 - 15), probablement à cause de la fluctuation quotidienne du poids sec lui-même. La fluctuation quotidienne de la teneur en glucoside des feuilles par rapport au poids frais est beaucoup moins importante; souvent il se présente une petite augmentation au début de la journée, probablement à cause de la diminution assez importante de la teneur en eau des feuilles. Une fluctuation quotidienne et régulière de la quantité absolue de glucoside dans les feuilles ne semble donc pas probable.

La plantation des boutures sens dessus-dessous n'influence pas la toxicité des tubercules des plantes qui en résultent. Dans quelques cas nous avons signalé une influence de cette façon de procéder sur la teneur en glucoside de jeunes plantes.

En recherchant l'existence d'une corrélation entre la teneur en glucoside et quelques autres caractéristiques de plantes appartenant au même clone, nous avons signalé, dans quelques essais, l'existence d'une corrélation ($r = +0,35$; 48 d.l.) entre la teneur en glucoside des tubercules écorcés et le poids moyen par tubercule.

La comparaison des caractéristiques de 67 clones a décelé plusieurs corrélations bien que souvent elles soient assez faibles (tableau 39). La teneur en glucoside des feuilles s'est révélée être en corrélation avec: la teneur en glucoside des tubercules écorcés ($r = +0,55$), la teneur en matière sèche des tubercules ($r = -0,34$), le nombre de tubercules par plante ($r = +0,22$). La teneur en glucoside des tubercules écorcés s'est révélée être en corrélation avec: la teneur en glucoside des feuilles, la teneur en matière sèche des feuilles ($r = -0,33$) et des tubercules ($r = -0,40$), le poids moyen par tubercule ($r = +0,26$), le poids frais des feuilles ($r = +0,20$), des tiges ($r = +0,24$) et des tubercules ($r = +0,20$).

La décortication annulaire de la tige provoque une augmentation considéra-

ble de la teneur en glucoside de l'écorce au-dessus de l'incision, surtout pendant les premiers jours (Chapitre 10). Mais une telle augmentation ne se présente pas quand les feuilles sont éliminées. La décortication des tiges, l'ablation des feuilles et la section des tiges provoque une diminution de la teneur en glucoside des tubercules écorcés. Les résultats des essais sur la décortication permettent d'affirmer que le glucoside, ou les produits nécessaires pour sa formation (acides aminés) sont formés dans les feuilles, puis transportés, tout au moins partiellement, par l'écorce des tiges vers les tubercules.

Une méthode pour déterminer l'activité de l'enzyme linamarase dans différentes parties de la plante a été mise au point, et la répartition de cette enzyme dans la plante a été étudiée (Chapitre 11).

Cette activité est la plus élevée dans les très jeunes feuilles proches du point végétatif, et elle est la plus basse dans la partie centrale des tubercules. Dans les très jeunes feuilles l'activité peut être cent fois plus élevée qu'elle ne l'est dans les tubercules écorcés.

Dans les tubercules, l'enzyme est environ vingt fois plus active dans l'écorce que dans la partie centrale. Dans les feuilles l'activité diminue en fonction de l'âge, dans les limbes plus fortement que dans les pétioles. Dans l'écorce de la partie de la tige dépourvue de feuilles, l'activité est beaucoup plus faible que dans les feuilles et elle diminue de façon importante du haut vers le bas.

L'activité enzymatique des tubercules des clones très toxiques n'est guère différente de celle des tubercules des clones peu toxiques, que ce soit dans l'écorce ou dans la partie centrale.

Le danger d'intoxication par la consommation du manioc est discuté, alors qu'il est indiqué dans quelle mesure les différentes méthodes de préparation des tubercules et des feuilles provoquent l'élimination de la toxicité (Chapitre 12). Les résultats de nos propres recherches à ce sujet sont ajoutés.

Après la cuisson de tubercules toxiques, il reste encore 90% du glucoside, mais l'enzyme est détruite. Nous supposons que la cuisson des tubercules réduit le danger d'intoxication mais ne rend pas inoffensive la consommation des tubercules dans tous les cas.

L'addition de glucose avant la macération des homogénats de tubercules écorcés n'en diminue guère le rendement en HCN.

L'élimination du glucoside des feuilles, par la cuisson, s'effectue d'une manière efficace, si, auparavant, les feuilles ont été broyées ou coupées en morceaux.

L'addition de jus, préparés à partir des feuilles ou de l'écorce des tubercules, à des homogénats de tubercules écorcés provoque une accélération considérable de l'hydrolyse du glucoside présent dans ces homogénats, à cause de l'activité enzymatique très élevée de ces jus.

Après broyage des tubercules non-écorcés, tout le glucoside présent est hydrolysé en moins d'une heure, puis l'HCN libéré peut être éliminé.

SUMMARY

The tuberous roots of cassava can release such quantities of hydrocyanic acid (HCN) that consumption without pretreatment may be very dangerous. Methods to eliminate the poison are known but cases of poisoning, of which some are fatal, still occur; moreover these methods often reduce the food value. For the preparation of cassava products for human and animal consumption it is very important to understand the poisonous character of the plant. Too little research has been performed in the past on the cassava toxicity, and the results obtained are often contradictory.

A review of cyanogenesis in plants is given (Chapter 2).

Cyanogenesis occurs in many families of higher plants but has also been observed in some lower organisms. Besides cassava some other cyanogenetic cultivated plants are: sorghum, flax, rubber, white clover, lima beans, almond and several other *Prunus* species.

HCN is liberated enzymically from cyanogenetic glucosides, this process starting as soon as the glucoside and the enzyme are brought together, e.g. after plant tissues are damaged. It is thought that the formation and degradation of cyanogenetic glucosides take place simultaneously in the living plant, whilst cyanogenesis is connected with protein metabolism. Recent studies show that amino acids can serve as precursors of cyanogenetic glucosides. There has proved to be a structural relation between the cyanogenetic glucoside and the precursor amino acid. Thus in cassava, valine and isoleucine serve as precursors of the aglycone moieties of linamarin and lotaustralin, cyanogenetic glucosides which occur in this plant (proportion 20:1).

The concentration of cyanogenetic glucosides (after this: glucosides) varies considerably according to species within the same family and also to individuals within the same species. The concentration depends on the stage of development of the tissue, or of the whole plant, and varies greatly according to environmental conditions.

The object of the research was at first to study the influence of some environmental factors on the toxicity of the tuberous roots. For a better insight in the cyanogenetic character we thought it necessary to also study other parts of the plant, notably the leaves.

Methods of determining the glucoside concentration in different parts of the cassava plant are described (Chapter 3). Some results of the relating studies are:

- the amount of tuberous root to be grated may be reduced to a half or even a quarter by cutting the roots longitudinally;
- samples of peeled and grated tuberous roots can be stored in closed bottles at 2 °C for one week without important loss of HCN output;

- storage at -15°C of various portions of plant material, whether whole or chopped, hardly reduces the HCN output for at least two months;
- a favourable combination of maceration time and temperature for samples of peeled and grated tuberous roots is 16 – 20 hours at $35 - 40^{\circ}\text{C}$;
- homogenization in a mixer of leaves, stem bark and bark of tuberous roots causes a rapid breakdown of all of the glucoside; prolonged maceration is not necessary and even reduces HCN output of leaf homogenates;
- addition of diluted acid solution, buffer solution (pH 5.5–6.0) or extra enzyme during maceration of samples of peeled and grated tuberous roots does not increase HCN output;
- glucoside concentration determined from liberated HCN is usually underestimated, due to partial blocking of the HCN.

Distribution of the glucoside in the plant, especially in the tuberous roots was studied (Chapter 4).

In the leaves glucoside content decreases with age, more so in leaf stalks than in leaf blades. In older leaves the concentration in leaf blades is higher, and in expanding leaves lower than in leaf stalks.

In the bark of the leafless part of the stem, glucoside concentration increases markedly from the top downward. In the bark of the original cutting, concentration is less than in the bark of the lower end of the stem. In the bark of tuberous roots, concentration equals or exceeds that in the bark of the lower end of the stem.

Glucoside concentration may vary greatly between the tuberous roots of one plant. Correlation between glucoside concentration and tuber size is not evident. Generally there is a variation in the pattern of concentration along the tuberous root; but in almost every case the highest concentration is found at the proximal end of the roots. In a transverse direction there is an increase from the centre outwards.

Concentration in the bark of tuberous roots is much higher than in the inner part and this difference is more obvious in less toxic clones than in very toxic ones. Concentration in leaves and bark of tuberous roots of less toxic clones is only a little lower than that in the same organs of very toxic clones. Thus as to toxicity, less toxic and very toxic clones differ mainly for the glucoside concentration of the inner part of tuberous roots. It is suggested that the ability to produce glucoside is, on average, about the same for less toxic as for very toxic clones, but that less toxic clones can easier metabolize the glucoside than the very toxic ones. This conversion is thought to take place mainly in the cambial zone of the tuberous roots.

Research on the effect of manuring with nitrogen, phosphate, potassium calcium, magnesium and farmyard manure (Chapter 5) showed that nitrogen has an increasing and potassium and farmyard manure a decreasing effect on the glucoside content of leaves and roots. The influence of potassium and farmyard manure was found to be more important in the roots than in the leaves. On the

whole the effect of phosphate, calcium and magnesium was not important.

The supposition that glucoside concentration is positively correlated with the availability of valine and isoleucine in the plant may explain the influence of nitrogen and potassium, because manuring with nitrogen has been shown to increase, and with potassium to decrease, the amino acid concentration in the leaves of various plant species.

Fertilizer trials in the field with mature plants and in plastic pots or bags with young plants gave similar results and therefore indicate that experiments may be simplified by using young plants.

There was no indication that glucoside content of tuberous roots changed because of the dry season in Adiopodoumé, Bouaké and Man; there may be an increase in Ferkéssédougou.

However, experiments with young plants in bags showed clearly an increasing effect of drought on glucoside in leaves and roots (Fig. 6).

It is concluded that drought increases glucoside content, but in the field only after a very long dry period, because plants can adapt to short droughts by abscission of some leaves.

Glucoside concentration of peeled tuberous roots was studied during growth for three years in a field recently cleared of forest (Chapter 7). In the first year there was a considerable increase in glucoside concentration; during the second and the third year no further increase was observed. The increase in the first year is thought to be due to a decrease in soil fertility, especially for organic matter.

Experiments in four regions of the Ivory Coast indicated that glucoside content of peeled tuberous roots can rise remarkably in the beginning of the rainy season (figs 7–9). This increase may be mainly due to increased demand of the plant for nutrient elements, especially potassium and nitrogen, and to a change in the availability of the elements (increased nitrification after first rains; afterwards leaching due to heavy rains).

The toxicity of the roots proved to vary considerably between the fields in the four regions. The way clones reacted to the environmental conditions was far from identical.

No indications were found that the glucoside concentration of the tuberous roots is directly related to plant age, contrary to assertions of other authors. It is supposed that fluctuations in glucoside content during growth are mainly due to changes in ecological conditions.

Shading young plants was found to increase glucoside concentration of leaves and to decrease that of roots (Fig. 11).

Glucoside concentration in the leaves, on a dry matter basis, increases during the night and decreases during the day (figs 12–15), probably corresponding

with the daily fluctuation of dry weight itself. Regular diurnal fluctuation of glucoside concentration expressed on basis of fresh weight of leaves is less important; quite often there is a slight increase in the morning, probably due to a rapid decrease of moisture content. Thus, a diurnal fluctuation of the absolute amount of glucoside seems unlikely.

Planting cuttings upside down did not influence glucoside concentration of the tuberous roots of the resulting plants. Sometimes glucoside concentration of young plants was influenced by this type of planting (tables 36 and 37).

A search for correlations between glucoside concentration and other characteristics of plants within clones often revealed a correlation with average root weight ($r = +0.35$; 48 degrees of freedom).

A comparison of characteristics of 67 clones gave more results but often the coefficients were low (Table 39). Glucoside concentration of leaves was found to correlate with: glucoside of peeled tuberous roots ($r = +0.55$), dry matter content of roots ($r = -0.34$), number of roots per plant ($r = +0.22$). Glucoside concentration of peeled tuberous roots was found to correlate with: glucoside of leaves, dry matter content of leaves ($r = -0.33$) and of tuberous roots ($r = -0.40$), average root weight ($r = +0.26$), and amount of leaf ($r = +0.20$), stem ($r = +0.24$) and tuberous root ($r = +0.20$) per plant.

Ringling of stems (Chapter 10) caused a considerable increase of glucoside in the bark above the incision, especially during the first days. Such an increase was not observed when leaves were eliminated. Stem ringling, leaf elimination and stem cutting caused a decrease of toxicity of tuberous roots.

The ringling experiments indicate that the glucoside or products that cause its formation (amino acids) are synthesized in the leaves and transported, at least partially, to the tuberous roots.

A method to determine the activity of the enzyme linamarase in different parts of the plant is described and the distribution of this enzyme in the plants has been examined (Chapter 11). The activity was found to be highest in the very young expanding leaves, and lowest in the inner part of tuberous roots. In very young leaves enzyme activity may be as much as 100 times as high as that in peeled roots.

In the bark of tuberous roots activity is about 20 times as high as in the inner part. In the leaves activity decreases with age, more so in the leaf blades than in the leaf stalks. In the bark of the leafless part of the stem, activity is much lower than in the leaves and there is a marked decrease from the top downwards.

Enzyme activity in the tuberous roots of very toxic and less toxic clones is hardly different, either in the bark or in the inner part.

The danger of poisoning due to consumption of cassava products is discussed (Chapter 12). For various methods of preparation of cassava roots and leaves,

the chapter indicates how far they result in a decrease in toxicity. Results of our research are added.

After boiling poisonous tuberous roots, 90% of the glucoside was found to be still present but the enzyme was destroyed. Supposedly the danger of poisoning due to eating them is reduced but not eliminated by boiling.

Addition of glucose before maceration of homogenates of peeled tuberous roots hardly reduces HCN output.

Boiling is a very suitable method of eliminating glucoside from leaves, if these are previously crushed or chopped.

Addition of juice prepared from leaves or bark of tuberous roots, caused a considerable acceleration of the hydrolysis of the glucoside present in grated peeled tuberous roots, due to the high enzyme activity of these juices.

After crushing unpeeled tuberous roots, all glucoside present is hydrolysed within one hour, after which HCN can be driven off.

SAMENVATTING

Cassavewortels kunnen zo veel blauwzuur (HCN) vrijgeven, dat consumptie zonder voorbehandeling zeer gevaarlijk kan zijn. Hoewel bereidingsmethoden bekend zijn die het gif verwijderen, komen nog steeds vergiftigingsgevallen voor, die soms een dodelijke afloop hebben. Helaas hebben deze bereidingsmethoden dikwijls een aanzienlijke vermindering van de voedingswaarde tot gevolg. Een gedegen kennis van het giftigheidskarakter van de plant is van groot belang voor de bereiding van cassaveproducten voor menselijke en voor dierlijke consumptie. Het in het verleden verrichte onderzoek omtrent de giftigheid van cassave bevat nog veel lacunes, terwijl de verkregen resultaten vaak tegenstrijdig zijn.

Cyanogenese komt voor bij een groot aantal families van de hogere planten maar is ook bij lagere organismen waargenomen. Behalve cassave zijn o.a. de volgende cultuurgewassen cyanogeen: sorghum, vlas, rubber, witte klaver, *Phaseolus lunatus*, amandel en verschillende andere *Prunus*-soorten.

Het HCN komt vrij via enzymatische splitsing van cyanogene glucosiden. Deze splitsing heeft plaats zodra het glucoside en het enzym met elkaar in contact komen, bv. door beschadiging van de weefsels. Volgens de huidige opvattingen omtrent de cyanogenese kunnen de opbouw en de afbraak van de cyanogene glucosiden in de plant naast elkaar plaatsvinden, terwijl tevens aangenomen wordt dat er een verband bestaat tussen cyanogenese en de stikstof-stofwisseling. Door onderzoek van de laatste jaren is komen vast te staan dat de cyanogene glucosiden in de plant gevormd worden via aminozuren met vergelijkbare structuur. Aldus worden de in cassave voorkomende cyanogene glucosiden linamarine en lotaustraline (verhouding ca. 20:1) gevormd via resp. valine en isoleucine.

Het gehalte aan cyanogene glucosiden (hierna glucosidegehalte genoemd) loopt sterk uiteen tussen de soorten van een familie en tussen de planten van dezelfde soort. Daarnaast is het glucosidegehalte afhankelijk van het groeistadium van de organen van de plant, of van de plant zelf, terwijl bovendien de ecologische omstandigheden van grote invloed kunnen zijn.

Ons onderzoek beperkte zich aanvankelijk tot de invloed van enkele milieufactoren op de giftigheid van cassavewortels. Om een beter inzicht te krijgen in de achtergronden van de blauwzuurvorming (cyanogenese) werden later ook andere delen van de plant, met name de bladeren, in het onderzoek betrokken.

Voor verschillende onderdelen van de cassaveplant wordt een methode beschreven ter bepaling van het glucosidegehalte. Uit het onderzoek dat tot deze methoden geleid heeft is onder meer het volgende naar voren gekomen:

– de hoeveelheid te raspen wortels kan worden gereduceerd tot de helft of tot

- een vierde door de wortels in longitudinale richting door te snijden;
- monsters van geraspte geschilde wortels kunnen in gesloten flesjes gedurende een week bij 2°C worden geconserveerd zonder dat een belangrijke vermindering van de HCN-opbrengst optreedt;
 - conservering van verschillende al dan niet fijngesneden plantedelen gedurende twee maanden bij -15°C leidt niet tot belangrijke vermindering van de HCN-opbrengst;
 - een gunstige combinatie van maceratieuur en -temperatuur voor monsters van geraspte geschilde wortels is: 16 – 20 uur, bij 35 – 40°C;
 - al het glucoside van bladeren, stengelschors en wortelschors, wordt in zeer korte tijd gesplitst als gevolg van fijnmalen in een mixer; langdurige maceratie is overbodig en leidt bij bladeren tot vermindering van de HCN-opbrengst;
 - toevoegen van verdund zuur, bufferoplossing (pH 5,5–6,0), of extra enzym tijdens de maceratie van geraspte geschilde wortels, leidt niet tot verhoging van de HCN-opbrengst;
 - bepaling van het glucosidegehalte via dosering van het vrijgemaakte HCN zal doorgaans leiden tot te lage waarden, omdat een deel van het HCN wordt gebonden.

De verdeling van het glucoside in de plant, in het bijzonder in de wortel, werd onderzocht.

In de bladeren neemt het glucosidegehalte af met de leeftijd, in de bladsteel sterker dan in de bladschijf. Bij oudere bladeren is het gehalte in de bladschijf hoger, bij nog niet volwassen bladeren lager dan in de bladsteel.

In de schil van het bladerloze deel van de stengel neemt het gehalte van boven naar beneden sterk toe, in de schil van de oorspronkelijke stek is het lager dan in die van het benedeneind van de stengel. In de schil van de wortels is het gehalte ongeveer gelijk aan of hoger dan dat in de schil onderaan de stengel.

Het glucosidegehalte van de wortels van dezelfde plant kan zeer uiteenlopen. Er is geen duidelijke aanwijzing dat er binnen de plant verband bestaat tussen de grootte van de wortel en het glucosidegehalte. Er is in het algemeen een verloop van het gehalte volgens de lengterichting van de wortel; de richting van dit verloop is zeer variabel, maar vrijwel steeds is het gehalte het hoogst dicht bij de aanhechting van de wortel aan de stek. In de dwarsrichting is er een toename van binnen naar buiten.

Het gehalte in de schil van de wortel is veel hoger dan in het centrale deel; dit verschil is bij de giftige klonen geringer dan bij de niet giftige klonen. Het bleek echter dat het glucosidegehalte van de bladeren en de wortelschil van klonen die volgens het gehalte van de geschilde wortels 'niet giftig' worden genoemd, slechts betrekkelijk weinig lager is dan dat van bladeren en wortelschil van klonen die op analoge wijze 'zeer giftig' worden genoemd. Wat betreft giftigheid onderscheiden giftige en niet-giftige klonen zich dus voornamelijk met betrekking tot het glucosidegehalte van de geschilde wortel. Als hypothese wordt gesteld dat alle klonen het glucoside in ongeveer gelijke mate vormen, maar dat de niet giftige klonen beter in staat zijn het glucoside om te zetten dan de giftige. Deze

omzetting zou voornamelijk in de cambiale zone van de wortels plaatsvinden.

Onderzoek naar de invloed van bemesting met N, P, K, Ca en Mg, en met stalmest toonde duidelijk aan dat een stikstofgift het glucosidegehalte van de bladeren en de wortels verhoogt en een gift van kali of stalmest een verlagende werking heeft. De invloed van kali en stalmest kwam bij de wortels duidelijker tot uiting dan bij de bladeren. Over het geheel gezien werd geen of slechts zeer geringe invloed van fosfaat, calcium en magnesium waargenomen.

De veronderstelling dat het glucosidegehalte hoger is naarmate meer valine en isoleucine in de plant beschikbaar is kan de invloed van stikstof en van kali verklaren. Immers, voor verschillende planten is aangetoond dat stikstofbemesting het gehalte aan vrije aminozuren in het blad verhoogt terwijl kalibemesting dat gehalte juist verlaagt.

Enkele bemestingsproeven werden zowel uitgevoerd met volwassen planten op het veld als met jonge plantjes zonder verdikte wortels, opgekweekt in potten of zakjes. De strekking van de resultaten was dezelfde, hetgeen betekent dat men het onderzoek kan vereenvoudigen en de proefmogelijkheden vergroten door te werken met jonge plantjes in potten.

Er werden geen aanwijzingen verkregen dat het glucosidegehalte van verdikte wortels verandert als gevolg van de droge tijd in Adiopodoumé, Bouaké en Man; misschien treedt een verhoging op in Ferkéssédougou.

Proeven in plastic zakjes toonden echter duidelijk aan dat het gehalte van bladeren en onverdikte wortels stijgt onder invloed van droogte.

Mede op grond van literatuurgegevens wordt geconcludeerd dat ook te velde een stijging van het gifgehalte optreedt als gevolg van droogte. Dit is echter slechts bij een zeer lange droge tijd het geval; bij een korte droge periode passen de planten zich aan door bladeren af te stoten.

Gedurende 3 jaren werd het verloop van het gifgehalte van wortels met de tijd nagegaan op juist ontgonnen bosgrond. Gedurende het eerste jaar trad een aanzienlijke stijging op; in het tweede en derde jaar werd geen verdere stijging waargenomen. De stijging gedurende het eerste jaar wordt toegeschreven aan de verarming van de grond, speciaal aan organische stof.

Bij proeven op 4 verschillende plaatsen in Ivoorkust is gebleken dat het gifgehalte van de wortels zeer sterk kan stijgen in het begin van de regentijd. Deze stijging wordt vooral toegeschreven aan een toename van de behoefte van de plant aan de voedingselementen en aan de verandering van de beschikbaarheid van deze elementen in de bodem, waarbij speciaal wordt gedacht aan stikstof en kalium (verhoogde nitrificatie na de eerste regens; uitspoeling bij het doorzetten van de regens).

De giftigheid van de wortels bleek in sterke mate afhankelijk van de plaats van verbouw; bovendien bleken de onderzochte klonen geenszins op dezelfde wijze te reageren op de wisselende cultuuromstandigheden.

Wij hebben, in tegenstelling tot beweringen van andere schrijvers, geen enkele

aanwijzing gevonden dat de giftigheid van de wortels direct samenhangt met de leeftijd van de plant. Wij veronderstellen dat de waargenomen fluctuaties in de loop van de tijd in eerste instantie moeten worden toegeschreven aan veranderingen van de ecologische omstandigheden.

Bij jonge plantjes bleek het glucosidegehalte van de bladeren toe en van de wortels af te nemen onder invloed van schaduw.

Het glucoside gehalte van de bladeren vertoont, uitgedrukt t.o.v. de droge stof, een stijging gedurende de nacht en een daling gedurende de dag, zeer waarschijnlijk corresponderend met de dagelijkse schommeling van de hoeveelheid droge stof zelf. Uitgedrukt t.o.v. het vers gewicht vertoont het in veel mindere mate een regelmatige dagelijkse schommeling; dikwijls is een verhoging waar te nemen in de ochtend, waarschijnlijk vanwege de snelle daling van het vochtgehalte.

Een dagelijkse schommeling van de hoeveelheid glucoside in de bladeren is dus onwaarschijnlijk.

Wij hebben geen invloed waargenomen van het omgekeerd planten van de stekken op het glucosidegehalte van de wortels van volwassen planten. Bij jonge plantjes is in enkele gevallen een duidelijke invloed van het omgekeerd planten waar te nemen.

Bij het zoeken naar correlaties tussen het glucosidegehalte en andere kenmerken van planten binnen de kloon werd in een aantal gevallen een correlatie gevonden met het gemiddeld gewicht per wortel ($r = +0,35$; 48 vrijheidsgraden).

Vergelijking van kenmerken van 67 klonen leverde meer resultaat op, hoewel de correlatiecoëfficiënten soms nogal laag bleken te zijn. Het glucosidegehalte van het blad bleek gecorreleerd te zijn met het glucosidegehalte van de wortels ($r = +0,55$), het drogestofgehalte van de wortels ($r = -0,34$) en het aantal wortels per plant ($r = +0,22$). Het glucosidegehalte van de wortels bleek, behalve met dat van de bladeren, gecorreleerd te zijn met: het drogestofgehalte van de bladeren ($r = -0,33$) en van de wortels ($r = -0,40$), het gemiddeld gewicht per wortel ($r = +0,26$), en het vers gewicht van bladeren ($r = +0,20$), stengels ($r = +0,24$) en wortels ($r = +0,20$).

Het ringen van de stengel leidde tot een sterke verhoging van het glucosidegehalte in de schil boven de ring, vooral gedurende de eerste dagen. Deze ophoping trad niet op als de bladeren werden weggenomen. Ringen, ontbladeren en kappen van de stengels leidde tot een vermindering van de giftigheid van de wortels.

De ringproeven geven een duidelijke aanwijzing dat het glucoside, of stoffen die zijn vorming in de hand werken (aminozuren), in het blad worden gevormd en, althans gedeeltelijk, via de schil naar de wortels worden vervoerd.

Een methode werd uitgewerkt voor de bepaling van de activiteit van het enzym

linamarase in verschillende delen van de plant, waarna de verdeling van dit enzym in de plant werd nagegaan. De activiteit bleek het hoogst in de nog niet volwassen bladeren nabij het groeipunt, het laagst in het centrale deel van de wortels; in het jonge blad is de activiteit wel tot $100 \times$ zo hoog als in de geschilde wortels. In de wortelschil is de activiteit ongeveer $20 \times$ hoger dan in het deel binnen de schil. In het blad vindt een afname plaats met de leeftijd, in de blad-schijf sterker dan in de bladsteel. In de stengelschors is de activiteit veel lager dan in het blad en er is een sterke afname van boven naar beneden.

De enzymactiviteit in de schil en in het centrale deel van de wortels van weinig giftige klonen bleek nauwelijks te verschillen van die in zeer giftige klonen.

Het vergiftigingsgevaar van consumptie van cassaveproducten wordt besproken. Van verschillende bereidingsmethoden van cassavewortels en bladeren wordt aangegeven in hoeverre zij een vermindering van de giftigheid met zich meebrengen. Resultaten van eigen onderzoek worden toegevoegd.

Bij het koken van zeer giftige wortels bleek 90% van het glucoside in de wortels achter te blijven, maar het enzym wordt afgebroken. Wij vermoeden dat koken het vergiftigingsgevaar bij consumptie van de wortels wel vermindert, maar de wortels niet in alle gevallen onschadelijk maakt.

Toevoegen van glucose aan het begin van de maceratie van geschilde geraspte wortels vermindert de HCN-opbrengst nauwelijks.

Koken is een zeer geschikte methode om het glucoside uit het blad te verwijderen als van te voren de bladeren worden gemalen of fijngesneden.

Toevoeging van sap, bereid uit bladeren of wortelschil, bleek de hydrolyse van het glucoside in het geraspte materiaal van geschilde wortels aanzienlijk te versnellen, vanwege de hoge enzymactiviteit van dit sap.

Door ongeschilde wortels fijn te malen wordt binnen een uur al het glucoside gesplitst, waarna het vrijgekomen HCN kan worden verwijderd.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à M. le Professeur J. D. FERWERDA, pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'offrant la possibilité de préparer cette thèse, pour les facilités qu'il m'a accordées, et pour les conseils qui m'ont été très utiles.

C'est M. G. G. BOLHUIS qui a proposé le sujet de cette étude. Sa longue expérience en Indonésie en est la cause. Je lui exprime ma gratitude pour l'attention avec laquelle il a suivi le progrès de mes recherches et pour ses conseils.

Le vif intérêt pour mon travail qu'a manifesté M. le Professeur J. VAN DIE, ainsi que ses conseils, m'ont été d'un grand soutien. Je lui en suis extrêmement reconnaissant.

Que le CONSEIL D'ADMINISTRATION DE L'UNIVERSITÉ AGRONOMIQUE À WAGENINGEN trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance pour avoir bien voulu soutenir mon détachement au Centre Néerlandais, en Côte d'Ivoire.

J'exprime ma reconnaissance respectueuse à la Direction Générale de l'OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER (O.R.S.T.O.M.), et plus spécialement au Directeur Général, M. le Professeur G. CAMUS, qui a eu la bienveillance de m'accorder l'hospitalité au Centre d'Adiopodoumé en Côte d'Ivoire.

Je suis très reconnaissant à la Direction du Centre d'Adiopodoumé de l'O.R.S.T.O.M., à MM. M. LUC, A. BOUCHARDEAU et R. MAIGNIEN, ainsi qu'aux responsables des divers laboratoires et du Service d'Expérimentation Biologique, pour leur accueil et les grandes facilités qu'ils m'ont accordées.

Je m'estime heureux d'avoir eu l'occasion de travailler au laboratoire de Physiologie Végétale de l'O.R.S.T.O.M. à Adiopodoumé, au milieu de chercheurs hautement qualifiés, et dans une ambiance très sympathique. Mes bien vifs remerciements d'adressent surtout à MM. G. G. VIEIRA DA SILVA, S. PUJARNISCLE et P. HANOWER.

Les Directeurs des Stations d'Expérimentation Agricole de Bouaké, Fer-késsédougou et Man ont bien voulu mettre à ma disposition un terrain d'expérimentation. Je leur en suis très reconnaissant.

Pendant leur stage en Côte d'Ivoire, MM. J. J. ASJÉE et W. C. H. VAN HOOFF m'ont été d'un précieux secours. Je les en remercie vivement.

Je suis particulièrement heureux de rendre hommage au personnel africain qui m'a assisté au laboratoire et au champ. Son aide efficace et dévoué a été indispensable pour l'exécution de ce travail. Je tiens à remercier plus spécialement MM. ADOU MOBIO ESAIE et BOULA-ABA SAVADOGO.

Mes remerciements s'adressent également à M. M. KEULS, pour ses conseils et pour sa collaboration à l'analyse statistique des résultats.

J'exprime ma gratitude à Mme J. A. FRAHM-LELIVELD, pour sa contribution à la mise au point du texte final.

Je suis très reconnaissant à M. G. GORZÈGNO et à Mme E. M. BROUNS-MURRAY,

qui ont respectivement corrigé les textes français et anglais.

Le dessin des figures a été fait par M. R. BOEKELMAN. Pour la dactylographie l'assistance de Mlle E. J. VAN DIJK, de Mme C. E. JONGMANS-BOEKELMAN et de Mlle M. HARDEMAN m'a été indispensable. Je remercie tous ces collaborateurs.

Que tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail mais que je n'ai pas mentionné ci-dessus soient convaincus de ma respectueuse gratitude.

BIBLIOGRAPHIE

- ABROL, Y. P. (1967). Studies on the biosynthesis of amygdalin, the cyanogenic glycoside of bitter almonds (*Prunus amygdalus* Stokes). *Indian J. Biochem.* **4**: 54-55.
- ABROL, Y. P. et E. E. CONN (1964). Cyanogenic glucosides in *Lotus arabicus* L. *Pl. Physiol.* **39**: xix.
- ABROL, Y. P. et E. E. CONN (1966). Studies on cyanide metabolism in *Lotus arabicus* L. and *Lotus tenuis* L. *Phytochemistry* **5**: 237-242.
- ADRIAENS, L. (1946). Contribution à l'étude de la toxicité du manioc au Congo Belge. *Mém. Inst. r. colon. belge. Sect. Sci. nat. méd.*-8°. T. XIII, fasc. 4. 140 pp.
- ADRIAENS, L. (1955). Recherches sur la composition en acides aminés des protéines d'aliments végétaux du Congo Belge et du Ruanda-Urundi. *Mém. Acad. r. Sci. colon. Cl. Sci. nat. méd.*-8°. T. III, fasc. 3. 102 pp.
- ANONYMUS (1948). Décret N° 48-282 du 16 février 1948, concernant le conditionnement des maniocs séchés. *Agron. trop.* Nogen 3: 332-335.
- ANONYMUS (1969). A.S.E.C.N.A. Abidjan. Côte d'Ivoire. Tableaux climatologiques.
- ASJÉE, J. J. (1971). Rapport de stage à l'O.R.S.T.O.M., Centre d'Adiopodoumé. Université Agronomique, Wageningen. Pays-Bas. Section de Chimie agricole (en préparation).
- AUBREVILLE, A. (1949). Climats, Forêts et Désertification de l'Afrique tropicale. Société d'Éditions Géographiques, Maritimes et Coloniales. Paris.
- AULD, S. J. M. (1911). The formation of prussic acid from linseed cake and other feeding stuffs *Jl S.-east. agric. coll.* Wye **20**: 289-326.
- BARRIOS, E. A. et R. BRESSANI (1967). Composición química de la raíz y de la hoja de algunas variedades de yuca, *Manihot*. *Turrialba* **17**: 314-320.
- BEN-YEHOSHUA, S. et E. E. CONN (1964). Biosynthesis of prunasin, the cyanogenic glucoside of peach. *Pl. Physiol.* **39**: 331-333.
- BIRCH, H. F. (1960). Soil drying and soil fertility. *Trop. Agric. Trin.* **37**: 3-10.
- BISSETT, F. H., R. C. CLAPP, R. A. COBURN, M. G. ETLINGER et L. LONG, Jr. (1969). Cyanogenesis in manioc: concerning lotaustralin. *Phytochemistry* **8**: 2235-2247.
- BLUMENTHAL-GOLDSCHMIT, S., G. W. BUTLER et E. E. CONN (1963). Incorporation of hydrocyanic acid labelled with carbon-14 into asparagine in seedlings. *Nature, Lond.* **197**: 718-719.
- BOLHUIS, G. G. (1939). Omgekeerd geplante stekken van cassave. *Landbouw, Buitenz.* **15**: 141-151.
- BOLHUIS, G. G. (1949). Enkele voorlopige resultaten van een behandeling van cassave-stekken met colchicine. *Meded. alg. Proefstn Landb., Buitenz.* N° 93.
- BOLHUIS, G. G. (1952). L'emploi de la réaction par la couleur de Guignard dans la sélection du manioc. *Revue int. Bot. appl. Agric. trop.* **32**: 559-564.
- BOLHUIS, G. G. (1954). The toxicity of cassava roots. *Neth. J. agric. Sci.* **2**: 176-185.
- BOORSMA, W. G. (1905). Vergiftige cassave. *Teysmannia* **17**: 483-489.
- BRIESE, R. R. et J. F. COUCH (1938). Preservation of cyanogenetic plants for chemical analysis. *J. agric. Res.* **57**: 81-108.
- BRIESE, R. R. et J. F. COUCH (1941). Mercuric chloride as a preservative of cyanogenetic plants for chemical analysis. *J. agric. Res.* **62**: 493-507.
- BUTLER, G. W. (1965). The distribution of the cyanoglucosides linamarin and lotaustralin in higher plants. *Phytochemistry* **4**: 127-131.
- BUTLER, G. W. et B. G. BUTLER (1960). Biosynthesis of linamarin and lotaustralin in white clover. *Nature, Lond.* **187**: 780-781.
- BUTLER, G. W. et E. E. CONN (1962). Biosynthesis of the cyanoglucosides linamarin and lotaustralin in flax seedlings. *Pl. Physiol.* **37**: lvi-lvii.
- BUTLER, G. W. et E. E. CONN (1964). Biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin I. Labeling studies *in vivo* with *Linum usitatissimum*. *J. biol. Chem.* **239**: 1674-1679.

- CARMODY (1900). Prussic acid in sweet cassava. *Lancet*. Sept. 8: 736-737.
- CERIGHELLI, R. (1955). *Cultures tropicales*. I. Plantes vivrières. Manioc: 289-378. J.-B. Baillière & Fils. Paris.
- CHARAVANAPAVAN, C. (1944). Studies in manioc and lima-beans with special reference to their utilization as harmless food. *Trop. Agric. Mag. Ceylon agric. Soc.* 100: 164-168.
- CHARLOT, G. (1964). Colorimetric determination of elements. Principles and methods. p. 214.
- CIFFERI, R. (1938). Saggio di classificazione delle razze di manioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Relaz. Monogr. agr.-colon.* Firenze. 44: 1-58.
- CLAPP, R. C., F. H. BISSETT, R. A. COBURN et L. LONG, Jr. (1966). Cyanogenesis in manioc: Linamarin and isolinamarin. *Phytochemistry* 5: 1323-1326.
- CLUSIUS, C. (1605). *Exoticorum: libri decem.* Raphelengii Fol. 339. *Simplic. Medic. Hist. Caput 53.*
- COCHRAN, W. G. et G. M. COX (1964). *Experimental designs.* John Wiley & Sons Inc., New York, Chapman & Hall Ltd, London. 611 pp.
- COLLENS, A. E. (1915). Bitter and sweet cassava - Hydrocyanic acid contents. *Bull. Dep. Agric. Trin. Tobago* 14: 54-56.
- CONN, E. E. et T. AKAZAWA (1958). Biosynthesis of p-hydroxybenzaldehyde. *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* 17: 205.
- CONN, E. E. et G. W. BUTLER (1969). The biosynthesis of cyanogenic glycosides and other simple nitrogen compounds. In: J. B. Harborne and T. Swain. *Perspectives in Phytochemistry*: 47-74. Academic Press, London-New York.
- COOP, I. E. (1940). Cyanogenesis in white clover (*Trifolium repens* L.) III. A study of linamarase, the enzyme which hydrolyses lotaustralin. *N.Z. JI Sci. Technol.* 22: 71B-83B.
- CORREIA, F. A. (1947). Ácido cianídrico em algumas variedades de mandioca. *Bragantia* 7: 15-22.
- COURS, G. (1951). Le manioc à Madagascar. *Mém. Inst. scient. Madagascar. Série B, T. III*: 204-398.
- VON CRANTZ, H. J. N. (1766). *Institutiones rei herberiae juxta nutum naturae digestae exhibitae.* Viennae. (Cité par Rogers, 1965).
- CUNNINGHAM, R. K. (1963). The effect of clearing a tropical forest soil. *J. Soil. Sci.* 14: 334-345.
- CURTIS, O. F. (1944). The food content of forage crops as influenced by the time of day at which they are cut. *J. Am. Soc. Agron.* 36: 401-416.
- DARJANTO, R. M. (1952). *Ratjun asam hydrocyan.* Pusat Djawatan Pertanian Rakjat Bagian Publikasi & Propaganda. Djakarta. 8 pp.
- DENIGÈS, G. (1893). Méthode générale pour le dosage volumétrique de l'argent sous une forme quelconque. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* 117: 1078-1081.
- DIDIER DE ST AMAND, J. (1960). Étude de la teneur en hétéroside cyanogénétique des variétés de manioc cultivées sur les Hauts-Plateaux de Madagascar. *Rapport O.R.S.T.O.M. Paris.* 59 pp.
- DILLEMANN, G. (1953). Recherches biochimique sur la transmission des hétérosides cyanogénétiques par hybridation inter-spécifique dans le genre *Linaria*. Thèse. *Revue gén. Bot.* 60: 338-399; 401-462.
- DILLEMANN, G. (1958). Composés cyanogénétiques. In: W. Ruhland. *Handbuch der Pflanzenphysiologie.* Bd VIII: 1050-1075. Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- DUNSTAN, W. R. et T. A. HENRY (1903). Cyanogenesis in plants. III. On phaseolunatin, the cyanogenetic glucoside of *Phaseolus lunatus*. *Proc. R. Soc. London* 72: 285-294.
- DUNSTAN, W. R., T. A. HENRY et S. J. M. AULD (1906). Cyanogenesis in plants. V. The occurrence of phaseolunatin in cassava (*Manihot aipi* and *Manihot utilissima*). *Proc. R. Soc. London* B78: 152-158.
- EYJÓLFSSON, R. (1970). Isolation and structure determination of triglocholin, a new cyanogenic glucoside from *Triglochin maritimum*. *Phytochemistry* 9: 845-851.
- ELDIN, M. et A. DAUDET (1967). Notice des cartes climatologiques de Côte d'Ivoire. Étude de robosement et de protection des sols. O.R.S.T.O.M. Centre d'Adiopodoumé. 18 pp.
- FISCHER, H. (1958). Tagesperiodische Auswanderung der Kohlenhydrate aus dem Blatt. In: W. Ruhland. *Handbuch der Pflanzenphysiologie.* Bd VI: 952-962. Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- FRANCIS, E. (1877). On prussic acid from cassava. *Analyst, Lond.* 2: 4-7.

- GANDER, J. E. (1958). In vivo biosynthesis of glycosidic cyanide in sorghum. Fedn Proc. Fedn Am. Soc. exp. Biol. **17**: 226.
- GIETEMA-GROENENDIJK, E. (1970). Bereiding van cassave. Agromisa. Wageningen. 108 pp.
- GODEFROY, J., E. ROOSE et M. MULLER (1970). Estimation des pertes par lixiviation des éléments fertilisants dans un sol de bananeraie de basse Côte d'Ivoire. Fruits **25**: 403-423.
- VAN DE GOOR, G. A. W. (1941). Gegevens over de betekenis van groenbemesting bij sawahrijst. Vergelijking met kunstmeststoffen. Landbouw, Buitenz. **17**: 871-872.
- GREENSTREET, V. R. et J. LAMBOURNE (1933). Tapioca in Malaya. Dept. of Agric., Str. Sett. and Fed. Malay States. Gen. Series No 13. Kyle, Palmer & Co. Ltd., Kuala Lumpur. 78 pp.
- GUIGNARD, L. (1906). Le haricot à acide cyanhydrique, *Phaseolus lunatus* L. C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris **142**: 545-553.
- HART, R. D. et W. B. CRANKSHAW (1969). The influence of environmental factors on the concentration of hydrocyanic acid in *Manihot esculenta*. Proc. Indiana Acad. Sci. **79**: 137.
- HEGNAUER, R. (1962, 1963, 1964, 1966, 1969). Chemotaxonomie der Pflanzen. Bd 1-5. Birkhäuser Verlag. Basel und Stuttgart.
- HELAL, M. et K. MENGEL (1968). Der Einfluss einer variierten N- und K-Ernährung auf den Gehalt an löslichen Aminoverbindungen und auf die Ertragsbildung bei Sommerweizen. Z. Pfl. Ernähr. Bodenk. **120**: 89-98.
- HENRY, O. et A. F. BOUTRON-CHARLARD (1836). Recherches sur le principe vénéneux du manioc amer. Mém. Acad. Méd. Paris **5**: 212-220. (Cité par Dillemann, 1958).
- HOGG, P. G. et H. L. AHLGREN (1942). Environmental, breeding, and inheritance studies of hydrocyanic acid in *Sorghum vulgare* var. sudanense. J. agric. Res. **67**: 195-210.
- VAN HOOFF, W. C. H. (1970). Rapport de stage à l'O.R.S.T.O.M., Centre d'Adiopodoumé. Université Agronomique, Wageningen. Pays-Bas. Section de Phytotechnie tropicale. 28 pp.
- HORWITZ, W. (1965). Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.) 10th Ed. Benjamin Franklin Station. Washington. p. 341.
- INDIRA, P. et S. K. SINHA (1969). Colorimetric method for determination of HCN in tubers and leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Indian J. agric. Sci. **39**: 1021-1023.
- JOACHIM, A. W. R. et D. G. PANDITTESEKERE (1944). Investigations of the hydrocyanic acid content of manioc (*Manihot utilisima*). Trop. Agric. Mag. Ceylon agric. Soc. **100**: 150-163.
- JONES, W. O. (1969). Manioc in Africa. First publ. 1959. Repr. 1969. Stanford Univ. Press. California. 315 pp.
- JORISSEN, A. et E. HAIRS (1887). Sur un nouveau glucoside azoté retiré du *Linum usitatissimum*. Bull. Acad. r. Belg. Cl. Sci. (3) **14**: 923-927.
- JORISSEN, A. et E. HAIRS (1891). La linamarine. Nouveau glucoside fournissant de l'acide cyanhydrique par dédoublement et retiré du *Linum usitatissimum*. Bull. Acad. r. Belg. Cl. Sci. (3) **21**: 529-539.
- KOCH, L. (1933). Cassaveselectie. Proefschrift. Wageningen. Veenman & Zonen. 86 pp.
- KOENS, A. J. (1948). Cassave. In: C. J. J. van Hall en C. van de Koppel. De Landbouw in de Indische Archipel IIIA: 166-200. Van Hoeve, 's-Gravenhage.
- KOLTHOFF, I. M. et V. A. STENGER (1947). Volumetric analysis. Vol. II. Titration methods: 282-283. Interscience Publishers. New York-London.
- LÉEMANN, A. C. (1935). Hydrocyanic acid in grasses. Onderstepoort J. vet. Sci. Anim. Ind. **5**: 97-136.
- LIEBIG, J. (1851). Verfahren zur Bestimmung des Blausäuregehaltes der medicinischen Blausäure, des Bittermandel und Kirschchlorbeerwassers. Annln Chem. Pharm. **77**: 102-107.
- MENGEL, K. et M. HELAL (1968). Der Einfluss einer variierten N- und K-Ernährung auf den Gehalt an löslichen Aminoverbindungen in der oberirdischen Pflanzenmasse von Hafer. Z. Pfl. Ernähr. Bodenk. **120**: 12-20.
- MENTZER, C., J. FAVRE BONVIN et M. MASSIAS (1963). Biogénèse du glucoside cyanogénétique chez *Prunus laurocerasus*. Bull. Soc. Chim. Biol. **45**: 749-760.
- MONTALDO, A. (1967). Bibliografía de raíces y tubérculos tropicales. Revta Fac. Agron. Univ. cent. Venez. Alcance No 13. Univ. central de Venezuela. Maracay. 595 pp.
- MONTGOMERY, R. D. (1965). The medical significance of cyanogen in plant foodstuffs. Am. J. Clin. Nutr. **17**: 103-113.

- MONTGOMERY, R. D. (1969). Cyanogens. In: I.E. Liener: Toxic constituents of plant food-stuffs. Food Sci. and Technol. Monograph 6: 143-157.
- MONTOYA, L. A., E. H. CASSERES, G. HERNÁNDEZ, R. V. MOSQUEDA, S. BRAMBILA et I. TEJEDA (1969). Ensayo preliminar sobre problemas en la clasificación de las variedades de yuca (*Manihot utilissima*). Agricultura téc. Méx. 2: 457-463.
- MOORE, C. C. (1906). Cassava: its content of hydrocyanic acid and starch and other properties. Bull. Bur. Chem. U.S. Dep. Agric. No 106. (Cité par Pynaert, 1951).
- MULDER, E. G. (1956). Stikstof in de plant. Meded. Dir. Tuinb. 19: 673-690.
- NARTEY, F. (1968). Studies on cassava, *Manihot utilissima* Pohl. I. Cyanogenesis: the biosynthesis of linamarin and lotaustralin in etiolated seedlings. Phytochemistry 7: 1307-1312.
- NARTEY, F. (1969). Studies on cassava, *Manihot utilissima*. II. Biosynthesis of asparagine-¹⁴C from ¹⁴C-labelled hydrogen cyanide and its relations with cyanogenesis. Physiologia Pl. 22: 1085-1096.
- NIJHOLT, J. A. (1932). Over vergiftiging door het eten van cassavewortels en daaruit bereide producten. Landbouw, Buitenz. 7: 895-871.
- NORMANHA, E. S. (1965). Communication personnelle. Instituto Agronômico. Campinas. Brasil.
- NORMANHA, E. S. (1969). Tôda mandioca tem veneno. Cooperotica 26 (234) : 24-25.
- NYE, P. H. et D. J. GREENLAND (1960). The soil under shifting cultivation. Commonw. Agric. Bureau. Farnham Royal. Bucks. England. Techn. Commun. No. 51. 156 pp.
- OKE, O. L. (1966). Chemical studies on some Nigerian foodstuffs: Kpokpogari (processed cassava). Trop. Sci. 8: 23-27.
- OKE, O. L. (1969). The role of hydrocyanic acid in nutrition. Wld Rev. Nutr. Diet. 11: 170-198.
- OZBUN, J. L. (1965). Effect of light and potassium nutrition on photosynthesis and respiration. Diss. Abstr. 26: 611.
- PATEL, C. J. et M. J. WRIGHT (1958). The effect of certain nutrients upon the hydrocyanic acid content of sudangrass grown in nutrient solution. Agron. J. 50: 645-647.
- PECHNIK, E. et L. R. GUIMARAES (1963). Cassava (*Manihot* sp.) leaves in human nutrition. 1. Hydrocyanic acid content. Nutr. Abstr. Rev. 33: 41.
- PECKOLT, T. (1886). Pharm. Rdsch., Prag. 4: 227 (Cité par Dunstan et al., 1906).
- PEREIRA, A. S. et M. GOMES PINTO (1962). Determinação da toxicidade da mandioca pelo paladar das raízes 'in natura'. Bragantia 21: 145-150.
- PEREIRA, A. S., J. P. NERY et A. CONAGIN (1960). Teor de ácido cianídrico na polpa das raízes dos aipins. Bragantia 19: 247-259.
- PERRAUD, A. (1967). Notice explicative de l'esquisse pédologique de la Côte d'Ivoire au 1/500.000^e. Étude de reboisement et de protection des sols. O.R.S.T.O.M. Centre d'Adiopodoumé. 93 pp.
- POHL, J. E. (1827). Plantarum Brasiliensis, icones et descriptiones 1:32. (Cité par Rogers, 1963).
- POLONOVSKI, M. et A. LESPAGNOL (1941). Chimie organique biologique. Hétérosides: 157-202. Masson, Paris.
- PULSS, G. (1962). Untersuchungen zur Isolierung und Bestimmung von Blausäure in pflanzlichem Material. Z. analyt. Chem. 190: 402-409.
- PYNAERT, L. (1951). L'acide cyanhydrique du manioc. Le manioc: 110-119. Direction de l'Agric. Bruxelles.
- DE RASSENFOSSE, A. et G. GUÉBEN (1936). Des alchimistes aux briseurs d'atomes. G. Thone. Liège. (Cité par Adriaens, 1946).
- RAYMOND, W. D., W. JOJO et Z. NICODEMUS (1941). The nutritive value of some Tanganyika foods: II. Cassava. E. Afr. agric. J. 6: 154-159.
- RAZAFIMAHERY, R. (1954). Glucosides cyanogénétiques, poids du Cap, manioc et 'bononoka'. Bull. Acad. malgache 31: 71-77.
- ROBIQUET, P. J. et A. F. BOUTRON-CHARLARD (1830). Nouvelles expériences sur les amandes amères et sur l'huile volatile qu'elles fournissent. Anns Chim. Phys. 44: 352-382.
- ROGERS, D. J. (1963). Studies of *Manihot esculenta* Crantz and related species. Bull. Torrey bot. Club 90: 43-54.

- ROGERS, D. J. (1965). Some botanical and ethnological considerations of *Manihot esculenta*. Econ. Bot. **19**: 369-377.
- ROSENTHALER, L. (1922). Zur Prüfung der Treubschen Hypothese I. Biochem. Z. **134**: 215-224.
- ROSENTHALER, L. (1927). Zur Prüfung der Treubschen Hypothese. II. Biochem. Z. **190**: 168-180.
- SCHULEK, E. (1923). Über die jodometrische Bestimmung geringer Mengen Cyanide und Thiocyanate. Z. analyt. Chem. **62**: 337-342.
- SINHA, S. K. et T. V. R. NAIR (1968). Studies on the variability of cyanogenic glucoside content in cassava tubers. Indian J. agric. Sci. **38**: 958-963.
- STEKELBURG, N. J. (1931). Zur physiologischen Bedeutung der Blausäure-glucoside im Pflanzenstoffwechsel. Proefschrift. Amsterdam. Recl Trav. bot. néerl. **28**: 297-399.
- STEVENS, D. L. et G. A. STROBEL (1968). Origin of cyanide in cultures of a psychrophilic basidiomycete. J. Bact. **95**: 1094-1102.
- TANTISEWIE, B., H. W. L. RUIGROK et R. HEGNAUER (1969). Die Verbreitung der Blausäure bei den Cormophyten. 5. Mitteilung: über cyanogene Verbindungen bei den Parietales und bei einigen weiteren Sippen. Pharm. Weekbl. Ned. **104**: 1341-1355.
- TERRA, G. J. A. (1964). The significance of leaf vegetables, especially of cassava, in tropical nutrition. Trop. geogr. Med. **16**: 97-108.
- TREUB, M. (1896). Sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le *Pangium edule* Reinw. I. Anns Jard. bot. Buitenz. **13**: 1-89.
- TREUB, M. (1907). Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyanhydrique dans les plantes vertes. II. Anns Jard. bot. Buitenz. **6**: 80-106.
- TREUB, M. (1910). Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyanhydrique dans les plantes vertes. III. Anns Jard. bot. Buitenz. **23**: 85-118.
- TRIONE, E. J. (1960). The HCN content of flax in relation to flax wilt resistance. Phytopathology **50**: 482-486.
- TSCHIRSCH, B. (1963). Über den Stoffwechsel der Blausäure. Flora, Jena **153**: 115-121.
- TSCHIRSCH, B. (1964a). Über den Stoffwechsel der Blausäure. II. Zum Mechanismus der Blausäure-Assimilation. Flora, Jena **154**: 445-471.
- TSCHIRSCH, B. (1964b). Metabolism of hydrocyanic acid. III. Assimilation of H¹⁴CN by *Lathyrus odoratus* L., *Vicia sativa* L., and *Ricinus communis* L. Phytochemistry **3**: 365-367.
- TSCHIRSCH, B. (1964c). Zur cyanidassimilation der höheren Pflanzen. Pharmazie **19**: 672-676.
- TSCHIRSCH, B. (1967). Blausäure und Blausäureglykoside. Eine Übersicht. Pharmazie **22**: 76-82.
- TURNOCK, B. J. W. (1937). An investigation of the poisonous constituents of sweet cassava (*Manihot utilissima*) and the occurrence of hydrocyanic acid in foods prepared from cassava. J. trop. Med. Hyg. **40**: 65-66.
- VAN VEEN, A. G. (1938). Over cassave-bladeren, een hoogwaardige bladgroente. Geneesk. Tijdschr. Ned.-Indië **78**: 2548-2552.
- VOISIN, J. C. (1953). Recherche et dosage de l'acide cyanhydrique chez les plantes à glucosides cyanogénétiques et plus particulièrement chez *Manihot utilissima* Pohl. Rapport de Stage. O.R.S.T.O.M. Centre d'Adiopodoumé. Côte d'Ivoire.
- VOISIN, J. C. (1954). Teneurs en acide cyanhydrique des maniocs de Côte d'Ivoire. Revue gén. Bot. **61**: 386-388.
- DE WAAL, D. (1942). Het cyanophore karakter van witte klaver (*Trifolium repens* L.). Proefschrift. Wageningen. Veenman & Zonen. 135 pp.
- WIENK, J. F. (1971). Communication personnelle. CELOS, Paramaribo. Surinam.
- WILLAMAN, J. J. et R. M. WEST (1915). Notes on the hydrocyanic acid content of sorghum. J. agric. Res. **4**: 179-185.
- WÖHLER, F. et J. LIEBIG (1837). Notiz über die Bildung des Bittermandelöls. Annln Pharm. **21**: 96; **22**: 1-24.
- WOOD, T. (1965). The cyanogenic glucoside content of cassava and cassava products. J. Sci. Fd Agric. **16**: 300-305.
- WOOD, T. (1966). The isolation, properties, and enzymic breakdown of linamarin from cassava. J. Sci. Fd Agric. **17**: 85-90.