



germination

PRÉSERVER L'AGRO-BIODIVERSITÉ DANS L'OCÉAN INDIEN

Protocole de détermination de la teneur en cyanure des feuilles fraîches de manioc (*Manihot esculenta* L.)



Lionel Scherschel (agronome VSC, UMR PVBMT)

Copil du projet Germination III
3-5 juin 2025

France/Cirad

Interreg
Océan Indien



« Ce projet est co-financé par l'Union européenne et la Région Réunion.
L'Europe s'engage à La Réunion avec INTERREG »

Matériel requis

- **Le kit E test de cyanure de Bradbury et al., (1999)**, contenant les éléments suivants :

1. Le Protocole E ;
2. Une balance en plastique avec un poids de 100 mg collé dans une cuillère, pour peser 100 mg de feuilles broyées de manioc ;
3. Trente petits flacons en plastique à fond plat avec couvercles à vis ;
4. Deux pipettes graduées en plastique de 1 ml ;
5. Cent papiers tampons ;
6. Cent feuilles de papier picrate jaune collées sur des bandes de plastique transparentes ;
7. Un nuancier avec dix nuances de couleurs correspondant à 0 – 800 ppm de cyanure total ;
8. Dix papiers standards roses contenant de la linamarine avec l'indication de la concentration en cyanure sur l'étiquette ;
9. Dix disques de papier tampon/enzyme (linamarase). Ces papiers présentent une petite tache noire afin d'éviter de les confondre avec les papiers tampons.

- **Des feuilles de manioc fraîchement récoltées**
- **Une paire de ciseaux**
- **Un mortier et un pilon**
- **Des étiquettes de notation**
- **Une glacière et des blocs de glace**

Pour accéder au kit E :

- Site web d'information : https://biology-assets.anu.edu.au/hosted_sites/CCDN/five.html
- Mail de contact pour commander un kit : konzo@anu.edu.au
- Tarif : gratuit pour les travailleurs des pays en développement, facturé 700 dollars australiens pour les travailleurs des pays développés.

Principe de la méthode au papier picrate

Les feuilles de manioc contiennent des glycosides cyanogènes responsables de leur amertume et de leur toxicité potentielle. Lors du broyage d'un échantillon de feuilles, la rupture des tissus cellulaires entraîne l'hydrolyse des glycosides cyanogènes par les enzymes endogènes. Cette hydrolyse libère du cyanure d'hydrogène qui réagit avec le papier picrate, ce qui fait assombrir son pigment de couleur. La variation de couleur du papier picrate permet de mesurer la quantité de cyanure libérée, par comparaison avec un nuancier composé de couleurs associées à des teneurs potentielles de cyanure.

La méthode au papier picrate permet d'évaluer la teneur potentielle en cyanure des feuilles de manioc en fonction de leur poids frais. Les résultats sont exprimés en ppm (partie par million) équivalant à l'unité mg d'HCN/kg de poids frais.

1) Prélever au champ la troisième feuille la plus jeune (celle située à la troisième position, en partant du haut de la plante) de 3 ou 4 plantes de la même variété (figure 1). L'objectif de cet échantillonnage est de réduire la variabilité de la teneur en cyanure entre les feuilles d'une même plante et entre les plantes d'une même variété. Répéter le même échantillonnage sur chaque variété à évaluer. Les feuilles doivent être prélevées avec leurs pétioles afin d'éviter d'endommager le limbe, ce qui pourrait entraîner une libération prématurée de cyanure. Il est conseillé de placer et de conserver temporairement les feuilles prélevées dans une glacière jusqu'à ce que toutes les plantes aient été échantillonnées, afin d'éviter une dessiccation des feuilles et donc une surévaluation de la teneur en cyanure.

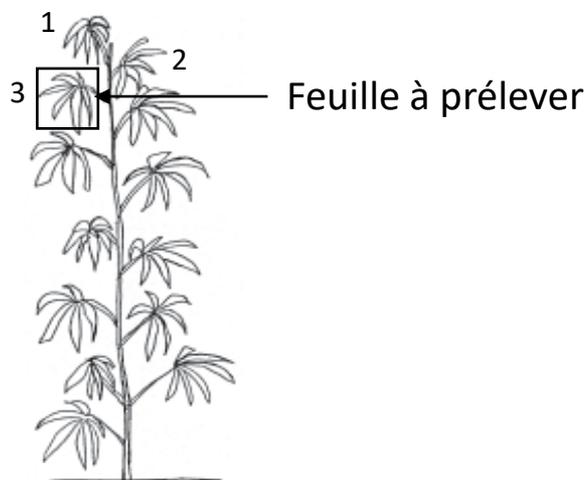
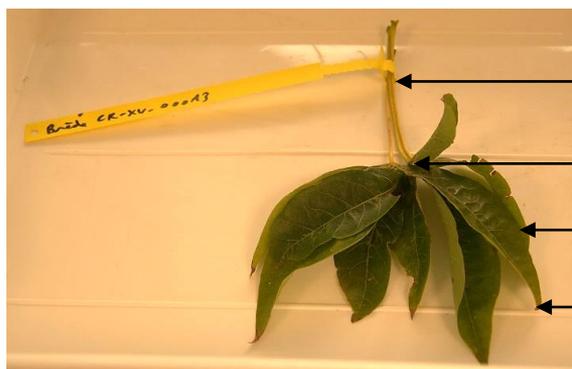


Figure 1 : localisation des 3 feuilles les plus jeunes d'une plante de manioc, avec un focus sur la troisième feuille. Modifié de Hidayat et al., (2002).

2) Détacher le pétiole du limbe des feuilles. Prélever un morceau de la partie centrale de quelques feuilles (au moins une feuille par plante échantillonnée) (figure 2), puis rassembler les morceaux de feuilles et les broyer à l'aide d'un mortier (figure 3). Mélanger les morceaux de feuilles broyées et prélever 100 mg à l'aide de la balance en plastique fournie dans le kit ou à l'aide d'une balance électronique de précision (figure 4).



- ← Pétiole
- ← Extrémité pédonculaire de la feuille
- ← Partie centrale de la feuille
- ← Pointe de la feuille

Figure 2 : échantillon de feuille de manioc.

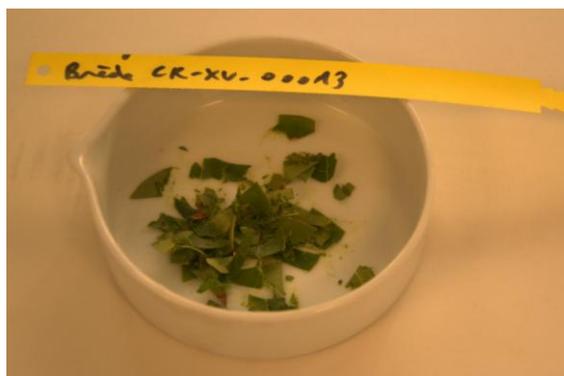


Figure 3 : échantillon de feuilles broyées de manioc.



Figure 4 : pesée de 100 mg de feuilles broyées de manioc.

3) Placer un disque de papier tampon dans l'un des petits flacons en plastique à fond plat fournis dans le kit E, déposer les 100 mg de feuilles broyées, ajouter 1 ml d'eau à l'aide d'une pipette, insérer le papier picrate fixé sur une bande plastique et fermer le flacon avec le couvercle à vis (figure 5). **Le papier picrate ne doit pas entrer en contact avec le liquide contenu dans le flacon (figure 6).** Le flacon doit être préalablement annoté avec le nom (et/ou le code) de la variété évaluée (figure 7). Le tampon utilisé (tampon phosphate) permet de maintenir le pH entre 6 et 8, pour que la réaction enzymatique de dégradation des glycosides cyanogènes soit optimale.

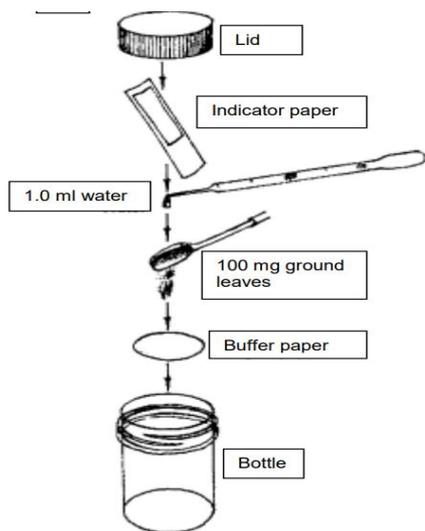


Figure 5 : les étapes schématisées du test au papier picrate pour la détermination de la teneur en cyanure des échantillons de feuilles de manioc.
D'après Bradbury et al., (1999).

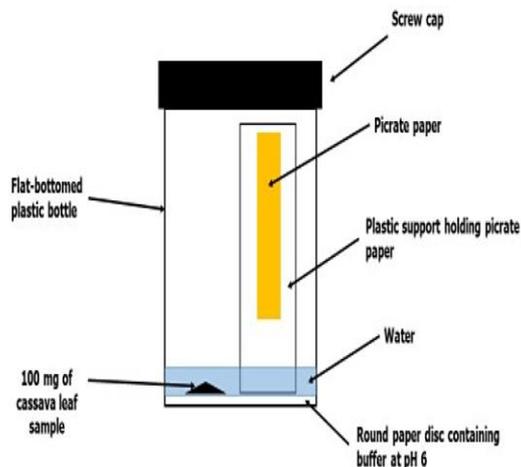


Figure 6 : sens de placement du papier picrate dans le flacon en plastique à fond plat.
D'après Imakumbili (2019).

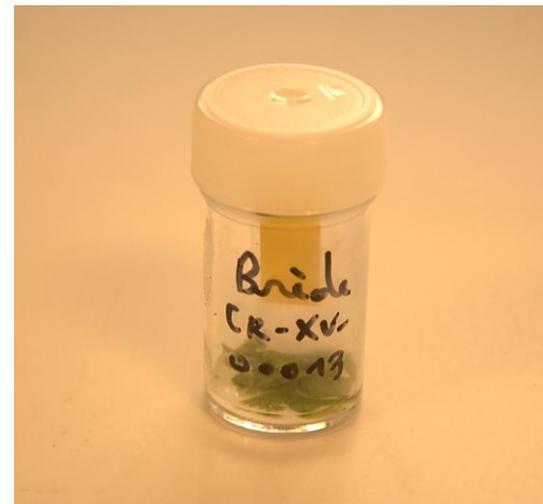


Figure 7 : flacon en plastique à fond plat contenant les morceaux de feuilles broyées, le papier tampon et le papier picrate.

4) Effectuer un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série d'expériences (une série d'expériences peut comprendre une ou plusieurs variétés évaluées).

- a) Pour le contrôle négatif, préparer un autre échantillon comme sur la figure 5 (voir page précédente), mais sans intégrer d'échantillon de feuilles de manioc.
- b) Pour le contrôle positif, suivre la figure 8. Placer un disque de papier tampon/enzyme dans le flacon. Ajouter un disque de papier standard rose, puis 1,0 ml d'eau à l'aide d'une pipette, ainsi que le papier picrate indicateur jaune. Le papier standard rose contient de la linamarine (glycoside cyanogène) dont la concentration en cyanure est connue (environ 50 ppm).

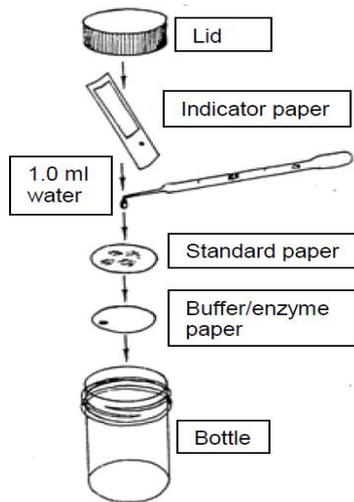


Figure 8 : préparation du contrôle positif du test au papier picrate pour la détermination de la teneur en cyanure des échantillons de feuilles de manioc. D'après Bradbury et al., (1999).

5) Conserver les petits flacons en plastique à fond plat à température ambiante pendant 16 à 24 heures. La conservation doit être réalisée à l'abri de la lumière, par exemple, dans un placard (figure 9).

La durée de conservation correspond au temps nécessaire, à température ambiante, pour que l'hydrolyse enzymatique dégrade complètement les glycosides cyanogènes en cyanure, mesurable par le papier picrate.



Figure 9 : conservation des flacons en plastique à fond plat contenant les échantillons de feuilles broyées de manioc.

6) Ouvrir les flacons en plastique à fond plat et faire correspondre la couleur des papiers picrates avec le nuancier de couleurs fourni.

7) Lire sur le nuancier la teneur totale en cyanure (en ppm) des échantillons de feuilles (figure 10). Vérifier que le témoin négatif donne une couleur équivalente à 0 ppm de cyanure et que le témoin positif donne une couleur équivalente à environ 50 ppm. Sinon refaire le test.

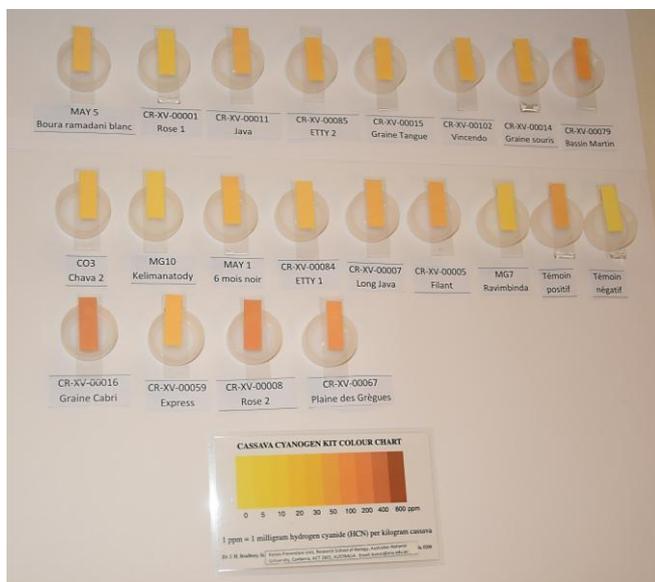


Figure 10 : lecture au papier picrate d'échantillons de feuilles de manioc.

8) Catégoriser la variété suivant le résultat obtenu :

- si la teneur en cyanure est inférieure à 50 ppm, les feuilles sont considérées comme douces, elles peuvent être consommées sans préparation préalable (Bradbury et Denton, 2014)
- si la teneur en cyanure est supérieure à 50 ppm, les feuilles sont considérées comme amères, elles doivent être pilées/broyées puis bouillies dans de l'eau pendant au moins 15 minutes pour réduire la teneur en cyanure et les consommer sans danger (Bradbury et Denton, 2014)

Si vous disposez d'un spectrophotomètre

- 9) Retirer soigneusement la feuille de plastique qui sert de support au papier picrate.
- 10) Placer le papier picrate dans un tube à essai ou dans un bécher de 25 à 50 ml, puis y ajouter 5 ml d'eau mesurés avec précision à l'aide d'une pipette. Laisser le tube à essai ou le bécher à température ambiante pendant environ 30 minutes en remuant doucement de temps en temps (figure 11).



Figure 11 : préparation des solutions pour l'utilisation du spectrophotomètre (élution de la couleur des papiers picrates dans l'eau).

Si vous disposez d'un spectrophotomètre

11) Prélever 1 ml de solution à l'aide d'une pipette et le transférer dans une cuve spectrophotométrique (figure 12).

12) Mesurer l'absorbance de la solution à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (figure 13).

13) Calculer la teneur en cyanure (en ppm) à l'aide de l'équation de Bradbury et al., (1999) :
Teneur totale en cyanure (en ppm) = 396 x (absorbance de l'échantillon – absorbance du témoin négatif)

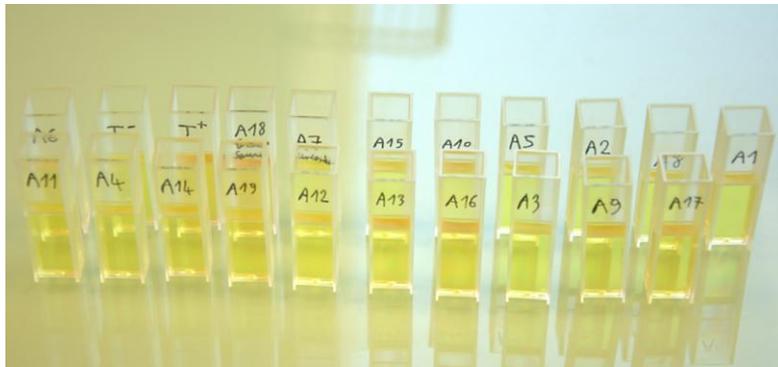


Figure 12 : exemples de cuves spectrophotométriques contenant des solutions issues de l'élution des papiers picrates dans l'eau.



Figure 13 : spectrophotomètre.

Exemple d'application

1) Lecture au papier picrate



Figure 14 : lecture au papier picrate d'échantillons de feuilles de manioc.

Les variétés Rose 2 CR-XV-00008 et Graine Cabri CR-XV-00016 ont une teneur en cyanure des feuilles égale à 100 ppm (figure 14). Elles semblent donc amères. Les variétés Bassin-Martin CR-XV-00079 et Plaine des Grègues CR-XV-00067 ont une teneur en cyanure des feuilles au moins égale à 50 ppm (figure 14). Elles pourraient être amères. Les autres variétés ont une teneur en cyanure de leurs feuilles inférieure à 50 ppm. Les feuilles de ces variétés semblent douces.

Interprétation des couleurs des papiers picrates (comparaison de la couleur des papiers picrates à celle du nuancier de couleurs) :

CR-XV-00067 Plaine des Grègues : 50 ppm, CR-XV-00008 Rose 2 : 100 ppm, CR-XV-00059 Express : 20 ppm, CR-XV-00016 Graine Cabri : 100 ppm, Témoin négatif : 0 ppm, Témoin positif : 50 ppm, MG7 Ravimbinda : 5 ppm, CR-XV-00005 Filant : 30 ppm, CR-XV-00007 Long Java : 30 ppm, CR-XV-00084 ETTY 1 : 20 ppm, MAY 1 6 mois noir : 20 ppm, MG10 Kelimanatody : 5 ppm, CO3 Chava 2 : 10 ppm, CR-XV-00079 Bassin-Martin : 50 ppm, CR-XV-00014 Graine Souris : 30 ppm, CR-XV-00102 Vincenzo : 20 ppm, CR-XV-00015 Graine Tangué : 20 ppm, CR-XV-00085 ETTY 2 : 20 ppm, CR-XV-00011 Java : 30 ppm, CR-XV-00001 Rose 1 : 5 ppm, MAY 5 Boura ramadani blanc : 10 ppm.

Exemple d'application

2) Lecture au spectrophotomètre

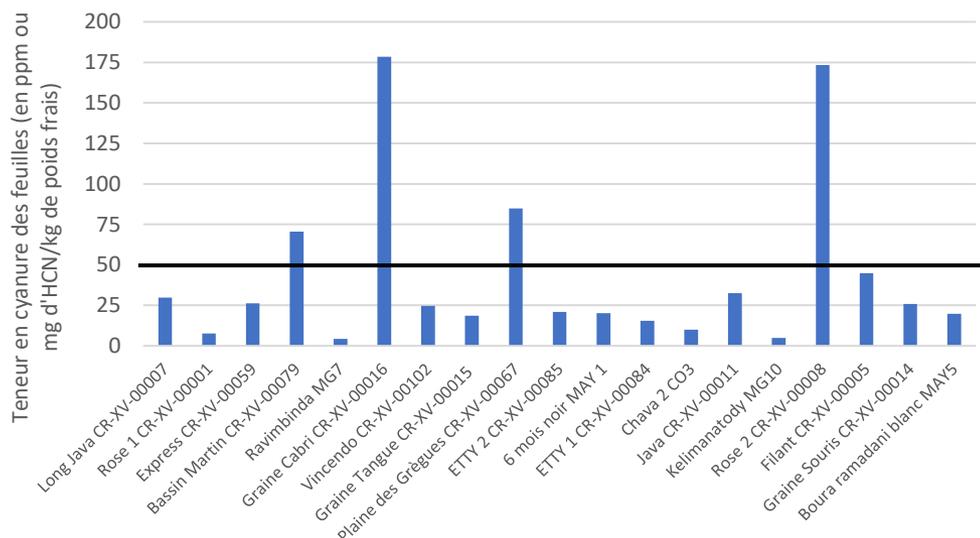


Figure 15 : teneur en cyanure d'échantillons de feuilles de manioc mesurée au spectrophotomètre.

Les variétés Bassin-Martin CR-XV-00079, Graine Cabri CR-XV-00016, Plaine des Grègues CR-XV-00067 et Rose 2 CR-XV-00008 ont une teneur en cyanure de leurs feuilles supérieure à 50 ppm (figure 15). Ce résultat est en accord avec la lecture au papier picrate (figure 14). Les feuilles de ces variétés peuvent donc être considérées comme amères.

Les autres variétés ont une teneur en cyanure de leurs feuilles inférieure à 50 ppm (figure 15). Ce résultat est en accord avec la lecture au papier picrate (figure 14). Les feuilles de ces variétés peuvent donc être considérées comme douces.

Bibliographie

Bradbury, J.H., Denton I.C., 2014. Mild method for removal of cyanogens from cassava leaves with retention of vitamins and protein. *Food Chemistry*, 158(1), 417-420

Bradbury, M.G., Egan, S.V., Bradbury J.H., 1999. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), 593-601

Hidayat, A., Zuraida, N., Hanarida, I., 2002. The cyanogenic potential of roots and leaves of ninety nine cassava cultivars. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 3(1), 25-32

Imakumbili, M.L., 2019. Détermination des niveaux de cyanure d'hydrogène total dans les racines de manioc fraîches à l'aide de la méthode du papier picrate. Consulté le: 8 mai 2025. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.protocols.io/view/determination-of-total-hydrogen-cyanide-levels-in-8epv563w5g1b/v3>