

2014-2015

Thèse

pour le

Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

LE POINT SUR LES EDULCORANTS A BASE DE STEVIA

Morin Cécile |

Née le 19 mai 1984 à Château-Gontier (53)

Sous la direction de Mme
Derbré Séverine |

Membres du jury |

Pr Richomme Pascal | Président

Mme Derbré Séverine | Directeur

Mme Josse M. Françoise | Membre

Soutenue publiquement le :
23 mars 2015

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Morin Cécile
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **23/02/2015**

Née le 19 mai 1984 à Château-Gontier (53)

Année Universitaire 2014-2015

Liste des enseignants

Département Pharmacie

PROFESSEURS

	<i>Disciplines</i>
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie - Biopharmacie
DUVAL Olivier	Chimie Thérapeutique
ÉVEILLARD Matthieu	Bactériologie - Virologie
FAURE Sébastien	Pharmacologie
JARDEL Alain	Physiologie
LAGARCE Frédéric	Pharmacotechnie-Biopharmacie
LARCHER Gérald	Biochimie
MARCHAIS Véronique	Bactériologie - Virologie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale – Chimie analytique
RICHOMME Pascal	Pharmacognosie
SAULNIER Patrick	Biophysique pharmaceutique et biostatistiques
SERAPHIN Denis	Chimie Organique
VENIER Marie-Claire	Pharmacotechnie - Biopharmacie

PAST

	<i>Disciplines</i>
BRUNA Étienne	Industrie

MAITRES DE CONFERENCES

	<i>Disciplines</i>
ANNAIX Véronique	Biochimie Générale et Clinique
BAGLIN Isabelle	Pharmaco - Chimie
BASTIAT Guillaume	Biophysique – biostatistiques -Rhéologie
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie et Pharmacocinétique
CLERE Nicolas	Physiologie - Pharmacologie
DERBRÉ Séverine	Pharmacognosie-
FLEURY Maxime	Immunologie
GUILLET David	Chimie Analytique

MAITRES DE CONFERENCES***Disciplines***

HELESBEUX Jean-Jacques

Chimie Organique

LANDREAU Anne

Botanique

MALLET Marie-Sabine

Chimie Analytique et Bromatologie

MAROT Agnès

Parasitologie et Mycologie médicale

PECH Brigitte

Pharmacotechnie

RIOU Jérémie

Biostatistiques

ROGER Émilie

Pharmacotechnie

SCHINKOVITZ Andréas

Pharmacognosie

TRICAUD Anne

Biologie Cellulaire

A.H.U.***Disciplines***

BRIS Céline

Biochimie

SPIESSER-ROBELET Laurence

Pharmacie clinique et Éducation Thérapeutique

***PRCE (Professeurs certifiés affectés
dans l'enseignement supérieur)******Disciplines***

BRUNOIS-DEBU Isabelle

Anglais

***ATER (Assistants Enseignement
Supérieur et Recherche).******Disciplines***

BOISARD Séverine

Chimie analytique

DESHAYES Caroline

Bactériologie

RODIER Marion

Pharmacologie

VERRIER Julie

Parasitologie et mycologie médicale

Remerciements

J'exprime mes profonds remerciements à Mme Derbré, Directrice de thèse,

D'avoir accepté cette « mission »

Et pour votre enseignement au cours de mes études

Je tiens aussi à remercier Pr Richomme, Président du jury,

D'avoir accepté de présider ce jury

Je tiens également à remercier Mme Josse, maître de stage durant mes études,

D'avoir accepté de faire partie de ce jury, c'est pour moi une façon de vous remercier

pour les stages effectués à la pharmacie

Je tiens particulièrement aussi à remercier mes parents qui m'ont permis d'être là où je suis,

Vincent, Olivia et Nathan ainsi que mes grands-parents,

Et aussi, les cousins, cousines, oncles et tantes pour les bons moments passés et à passer en famille

Je tiens également à remercier Mr Duval, pour sa patience,

Et tout le reste de l'équipe

Et pour finir, un petit mot pour les amis,

Pour ceux qui me connaissent depuis longtemps, pour l'équipe du théâtre, pour ceux de la fac,

sans qui toutes ces années n'auraient pas été celles qu'elles ont été

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

APG : Angiosperm Phylogeny Group

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CPS : Copalyl diPhosphate Synthase

DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence de la Consommation et de la Répression des Fraudes

DJA : Dose Journalière Admissible

DL 50 : Dose Létale qui cause la mort de la moitié des animaux testés

EFSA : European Food Safety Authority

FAO : Food and Agricultural Organization

FDA : Food and Drug Administration

GGDP : Géranylgéranyl DiPhosphate

GRAS : Generally Recognized As Safe

HMG-CoA : 5-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A

HTA : Hypertension Artérielle

JECFA : Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives

KAH : Acide Kaurénoïque 13-Hydroxylase

KO : Kaurène Oxydase

KS : Kaurène Synthase

MEP : Methylerythritol 4-Phosphate

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level

OH : Hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Sommaire p.1

1. Introduction	p.3
2. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	p.7
2.1. Généralités	p.7
2.1.1. Classification	p.7
2.1.2. Botanique	p.9
2.1.3. Origine, climat et culture	p.11
2.1.4. Utilisations traditionnelles	p.13
2.2. Étude phytochimique des feuilles de <i>Stevia rebaudiana</i>	p.13
2.2.1. Les diterpènes glycosylés	p.14
2.2.1.1. Structures	p.14
2.2.1.2. Localisation dans la plante	p.15
2.2.1.3. Biogenèse des dérivés diterpéniques	p.16
2.2.2. Autres métabolites secondaires	p.19
2.3. Études pharmacologiques et cliniques d'extraits de feuille de stevia	p.19
2.3.1. Activité hypoglycémiante	p.19
2.3.2. Activité hypotensive	p.20
2.3.3. Activité anti-infectieuse	p.22
2.3.4. Activité contraceptive	p.22
2.3.5. Activités anti-oxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse	p.23
2.3.6. Résumé des études pharmacologiques et cliniques menées sur des extraits de feuille de stevia	p.24
2.4. Étude toxicologique des extraits de feuille de stevia	p.24
3. Rebaudioside A/ Extraits enrichis en rebaudioside A	p.26
3.1. Obtention du rebaudioside A	p.26
3.1.1. Extraction	p.26
3.1.2. Purification	p.27
3.2. Propriétés physiques du rebaudioside A	p.29
3.3. Étude pharmacocinétique du rebaudioside A	p.30
3.3.1. Absorption	p.30
3.3.2. Distribution	p.31

3.3.3. Métabolisation	p.32
3.3.4. Élimination	p.32
3.4. Études pharmacologiques sur le steviol et sur le rebaudioside A	p.34
3.4.1. Étude pharmacologique sur le steviol	p.34
3.4.1.1. Activité sur la glycémie	p.34
3.4.1.2. Activité sur la tension artérielle	p.34
3.4.2. Étude pharmacologique sur le rebaudioside A	p.35
3.4.2.1. Activité sur la glycémie	p.35
3.4.2.2. Activité sur la tension artérielle	p.35
3.4.2.3. Activités anti-inflammatoire et antitumorale	p.36
3.5. Étude clinique sur le rebaudioside A	p.36
3.5.1. Activité sur la glycémie	p.36
3.5.2. Activité sur la tension artérielle	p.37
3.6. Études toxicologiques sur le rebaudioside A et sur le steviol	p.37
3.6.1. Toxicité sub-chronique du rebaudioside A	p.37
3.6.2. Toxicité génétique du rebaudioside A	p.38
3.6.3. Toxicité sur la reproduction et la tératogenèse du rebaudioside A	p.39
3.6.4. Toxicité aiguë du steviol	p.40
3.6.5. Toxicité génétique du steviol	p.41
3.6.6. Toxicité sur la reproduction et la tératogenèse du steviol	p.42
3.7. Résumé des études pharmacocinétiques, pharmacologiques, cliniques et toxicologiques menées sur le rebaudioside A	p.42
4. Réglementation	p.43
5. Conclusion : conduite à tenir face à une demande spontanée sur l'utilisation des feuilles de Stevia et du rebaudioside A comme édulcorant	p.45
Table des illustrations	p.49
Annexes	p.50
Bibliographie	p.58

1. Introduction

Des plants de stevia et des denrées alimentaires à base de *Stevia rebaudiana* sont commercialisés dans les pharmacies, les magasins diététiques, la grande distribution ainsi que sur les sites internet. La plupart du temps, ils vantent le pouvoir sucrant et l'origine naturelle de cette plante à faible calorie. Le pouvoir sucrant de la stevia est dû aux glycosides de steviol contenus dans les feuilles de la plante. Parmi ceux-ci sont autorisés deux métabolites secondaires : le stevioside ainsi que le rebaudioside A. Ce dernier est retrouvé, à l'état purifié, dans les édulcorants et les compléments alimentaires commercialisés en pharmacie via les grossistes répartiteurs en France (Tableau 1). En conséquence, les patients des pharmacies d'officine sont susceptibles de consommer des feuilles de stevia, des denrées ou compléments alimentaires en contenant.

Face à la montée croissante des inquiétudes concernant l'aspartame [1], la question d'une possible toxicité aiguë ou chronique de la stevia peut se poser.

Cette thèse a pour objectif d'éclairer le conseil d'édulcorants à base de stevia dans le cadre de l'exercice officinal. Ainsi, après un rappel des données botaniques, phytochimiques, pharmacologiques, cliniques et toxicologiques sur les feuilles de stevia dans une première partie, nous détaillerons dans une deuxième partie les données disponibles sur le rebaudioside A. Cela nous permettra de présenter la réglementation adoptée par les pays occidentaux dans une troisième partie. Enfin, nous concluerons sur les attitudes à adopter lors de questions sur la possible consommation de feuilles ou d'extraits de feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni et préciserons à qui peuvent être délivrés en toute sécurité les édulcorants à base de rebaudioside A disponibles en pharmacie.

Tableau 1: Liste des spécialités à base de rebaudioside A délivrés par les grossistes répartiteurs (Source Alliance Healthcare).

Nom commercial	Fabricant	Utilisation décrite par le fabricant	Composition et posologie
Poudre			
Bouillet® édulcorant végétal poudre 45g	Diététique et santé	Édulcorant de table végétal pour aider à limiter la consommation en sucres de façon naturelle et légère.	Édulcorant: Rebaudioside A extrait de feuilles de <i>Stevia rebaudiana</i> et maltodextrine. Une cuillère à café d'édulcorant Bouillet est égale à une cuillère à café de sucre.
Pure Via™ édulcorant poudre 40 sticks	Merisant France	Pour remplacer le sucre pour les personnes en surpoids, les diabétiques et les malades atteints de phénylcétonurie.	Pour un stick de 1,5g: Rebaudioside A extrait de <i>Stevia rebaudiana</i> (1,35%), érythritol, cellulose en poudre, arômes naturels.
Steviamed® cristallisé 100 g	Jecare France	Pour aider à limiter la consommation en sucres de façon naturelle et légère dans les laitages, les desserts, les fruits, les céréales.	12,5% d'extrait de stevia titré en Rebaudioside A à 98%, érythritol, extrait de réglisse. Une mesure de steviamed® cristallisé correspond à 5 mesures de sucre.
Steviamed® poudre 30 g	Jecare France	Pour aider à limiter la consommation en sucres de façon naturelle et légère dans tous types de préparations culinaires.	100% d'extrait de <i>Stevia rebaudiana</i> titré en Rebaudioside A à 98%. Une mesure de steviamed® poudre correspond à 5 mesures de sucre.
Sylvia® édulcorant 120g	Les 3 Chênes	Pour remplacer le sucre dans toutes ses utilisations.	Cevia (actif breveté): extrait de <i>Stevia rebaudiana</i> soit Rebaudioside A pur à 97%, maltodextrine de blé non OGM. 5g d'édulcorant correspondent à environ 45g de sucre cristallisé.

Nom commercial	Fabricant	Utilisation décrite par le fabricant	Composition et posologie
----------------	-----------	--------------------------------------	--------------------------

Comprimés

Canderel green® 100 comprimés	Merisant France	Édulcorant d'origine naturelle, sucre de table permettant d'équilibrer l'alimentation des diabétiques et des régimes hypocaloriques.	Pour un comprimé de 85mg: édulcorant: Rebaudioside A, extrait de <i>Stevia rebaudiana</i> , lactose, support: carboxyméthyl cellulose réticulée, maltodextrine, antiagglomérants: sels de calcium d'acides gras, dioxyde de silicium.
Kara Stevia® 100 comprimés	Hermes edulcorants	Édulcorant de table pour aider à équilibrer l'alimentation des diabétiques et lors de régimes hypocaloriques.	Pour un comprimé de 62mg: Rebaudioside A extrait de <i>Stevia rebaudiana</i> , érythritol, sorbitol, bicarbonate de sodium, citrate monosodique, L-leucine 1 comprimé correspond approximativement à 4g de sucre (un morceau ou une cuillère à café).
Steviamed® 150 comprimés	Jecare France	Édulcorant de table pour aider à équilibrer l'alimentation des diabétiques et lors de régimes hypocaloriques.	Extrait de stevia soit 21mg (35%) de Rebaudioside A 98%, bicarbonate de sodium, acide tartrique. 1 à 2 comprimés dans une tasse de boisson chaude ou froide.

Nom commercial	Fabricant	Utilisation décrite par le fabricant	Composition et posologie
----------------	-----------	--------------------------------------	--------------------------

Morceaux

Pure Via™ édulcorant 65 morceaux	Merisant France	Pour remplacer le sucre pour les personnes en surpoids, les diabétiques et les malades atteints de phenylcétonurie.	Un morceau de Purevia™ est équivalent à la saveur sucrée d'un morceau de sucre. Pour un morceau de 2g: Rebaudioside A extrait de <i>Stevia rebaudiana</i> (1,01%), érythritol, cellulose en poudre et arômes naturels.
-------------------------------------	-----------------	---	--

Paillettes cristallisées

Sylvia slim® édulcorant 90g	Les 3 Chênes	Édulcorant de table pour mincir. Idéal pour les diabétiques.	Inuline de chicorée (fibres prébiotiques), 1,5% d'extrait de <i>Stevia rebaudiana</i> titré en Rebaudioside A pur à 97%. Une cuillère à café de Sylviaslim® pour édulcorer des yaourts, fromages blancs, cafés, thés, incorporée à une bouteille d'eau minérale.
--------------------------------	--------------	--	--

Tous les produits disponibles à base de stevia *via* les grossistes-répartiteurs renferment des extraits de feuilles de stevia enrichis en rebaudioside A comme molécule principale.

2. *Stevia rebaudiana* Bertoni

2.1. Généralités

2.1.1. Classification [2-6]

Stevia rebaudiana est répertoriée dans la dernière classification botanique des angiospermes établie par l'Angiosperm Phylogeny Group (APG). L'APG III est la dernière version et date de 2009.

Cette plante appartient aux eucaryotes et fait partie du règne des *Plantae*.

- Clade des Angiospermes: ce sont des plantes à fleurs où les ovules sont contenus dans un ovaire clos.
- Clade des Eudicotylédones: ce sont des plantes qui contiennent deux feuilles embryons constitutives de la graine. Au stade de la plantule, deux cotylédons apparaissent. Les cotylédons sont les réserves de nourriture de l'embryon dans la graine.
- Clade des Eudicotylédones supérieures.
- Clade des Asterideae.
- Clade des Euasterideae II ou Campanulideae.
- Ordre des Astérales: ces plantes utilisent l'inuline qui est un oligosaccharide utilisé comme stockage de substances nutritives. Les étamines sont agrégées densément. La pollinisation est secondaire.

- Famille des Astéracées, anciennement appelées Composées: cette famille est la plus importante des angiospermes avec plus de vingt trois mille espèces différentes. Elle se caractérise par le regroupement des fleurs en capitule. Serrées les unes contre les autres sans pédoncule sur le réceptacle, les fleurs ont une taille réduite et peuvent être ligulées ou tubulées. Elles sont placées à l'extrémité d'un rameau ou d'une tige. Un involucre de bractées entoure le capitule. Ce dernier est en forme d'étoile. Cette famille produit des fruits appelés akènes, souvent couronnés par des aigrettes de soies. Leur pappus permet la dispersion des graines par le vent.

- Sous-famille des Asteroideae.

- Tribu des Eupatorieae: elle est déterminée par des anthères, parties terminales des étamines, basifixes, c'est à dire fixées au filet de l'étamine par leur base [7].

- Genre *Stevia*: ce genre regroupe plus de cent cinquante espèces d'herbes aromatiques ou d'arbrisseaux originaires d'Amérique du Sud. Les membres du genre *Stevia* sont caractérisés par les critères suivants:
 - Plante annuelle ou pluriannuelle sous forme d'herbes ou d'arbrisseaux avec des feuilles simples, opposées, rarement alternes, le plus souvent pétiolées, à nervures pennées ou réticulées.
 - Capitule en corymbe, en panicule ou en grappe, à l'extrémité des branches ou des tiges.
 - Involucre cylindrique ou en forme d'entonnoir.
 - Akènes cylindriques à fusiformes ou prismatiques à 5 côtes ou nervures, avec des faces concaves.

Les espèces sont ensuite classées selon leur type de pappus, leur inflorescence et leur habitat. *Stevia rebaudiana* Bertoni est encore appelée *Eupatorium rebaudianum* Bertoni.

Ses noms vernaculaires font référence à son goût sucré et à sa douceur. Suite à la conquête du Paraguay par les Espagnols, ces derniers l'appelèrent « yerba dulce ». Les Anglais l'appellent aussi « honey grass », « sweet plant », « sweet herb », « sugar leaf plant ». En France, nous l'appelons « l'herbe sucrée du Paraguay ».

2.1.2. Botanique [5-6, 8]

Stevia rebaudiana est une plante herbacée tropicale pluriannuelle mesurant de 40 à 80 cm à maturité dans la nature et pouvant atteindre le mètre en culture. On peut aussi la trouver sous forme de petits buissons ou d'arbustes [7]. Vivace à l'abri des fortes gelées, la stevia est caduque sous nos latitudes.

Les racines sont filiformes, cylindriques, superficielles et très peu ramifiées. Les tiges dressées et très ramifiées portent des feuilles alternées et allongées en forme de fer de lance et légèrement dentées sur leur pourtour voire crénelées et généralement trinervées. Elles s'insèrent sur la tige par un court pétiole. Elles mesurent entre 3 et 5 cm de long et ont une largeur d'environ 1 à 2 cm.

Leur couleur est d'un vert vif. Une fois broyées, elles dégagent une odeur assez forte et deviennent légèrement collantes. Si on les mâche, on ressent soit une douceur soit une amertume, cela dépend de l'espèce. *Stevia rebaudiana* est la plus connue pour sa douceur.



Photo 1 : Plant de *Stevia rebaudiana* [9]



Photo 2 : *Stevia rebaudiana* [10]

La tige principale et les ramifications ainsi que l'ensemble des feuilles sont recouverts d'un très léger duvet blanc. Les petites fleurs blanches ou violet-rose selon les espèces, sont en forme de tubes et sont regroupées en capitules de tailles réduites, moins de 15 mm de longueur et très peu parfumées. Les fleurs apparaissent vers la fin de l'été comme il est fréquent dans la famille. L'inflorescence est de type indéfini de 2 à 7 cymes.

Les semences tombent facilement et donnent une nouvelle plante lorsque le sol est humide. Les petites graines noires des fruits de la stevia ne survivent pas plus de trois mois, tandis que les graines de couleur claire sont stériles car elles ne sont pas très riches en nutriments et s'appauvrissent rapidement, ne permettant pas le développement du futur embryon.

2.1.3. Origine, climat et culture [5-6, 11-13]

La stevia a été rapportée au 16^e siècle sur notre continent. Il a fallu attendre 1899 et les travaux de Moisés Santiago Bertoni afin que les européens commencent à s'y intéresser. C'est en 1904 qu'il reçoit un spécimen entier de la plante et qu'il peut alors en réaliser une étude complète qui lui permet de la classer dans le genre stevia. Bertoni dédie cette nouvelle espèce à Ovidio Rebaudi, chimiste paraguayen qui avait été le premier à entreprendre une étude détaillée de la composition des feuilles. Le nom complet de la plante devient alors *Stevia rebaudiana* Bertoni.

La stevia est native de la vallée du Rio Monday dans le nord-est du Paraguay, sur les hauts plateaux du Paraguay plus précisément de la région allant de l'Amambay jusque dans les prairies de San Pedro. Cette plante buissonnante s'épanouit entre 500 et 1500 mètres d'altitude, sous une latitude de 22 à 25°S. De nombreuses espèces de stevia sont localisées du nord du Chili, au sud du Brésil ainsi que de la Bolivie jusqu'au centre de l'Argentine autour du tropique du Capricorne qui possède une latitude de 23°S.

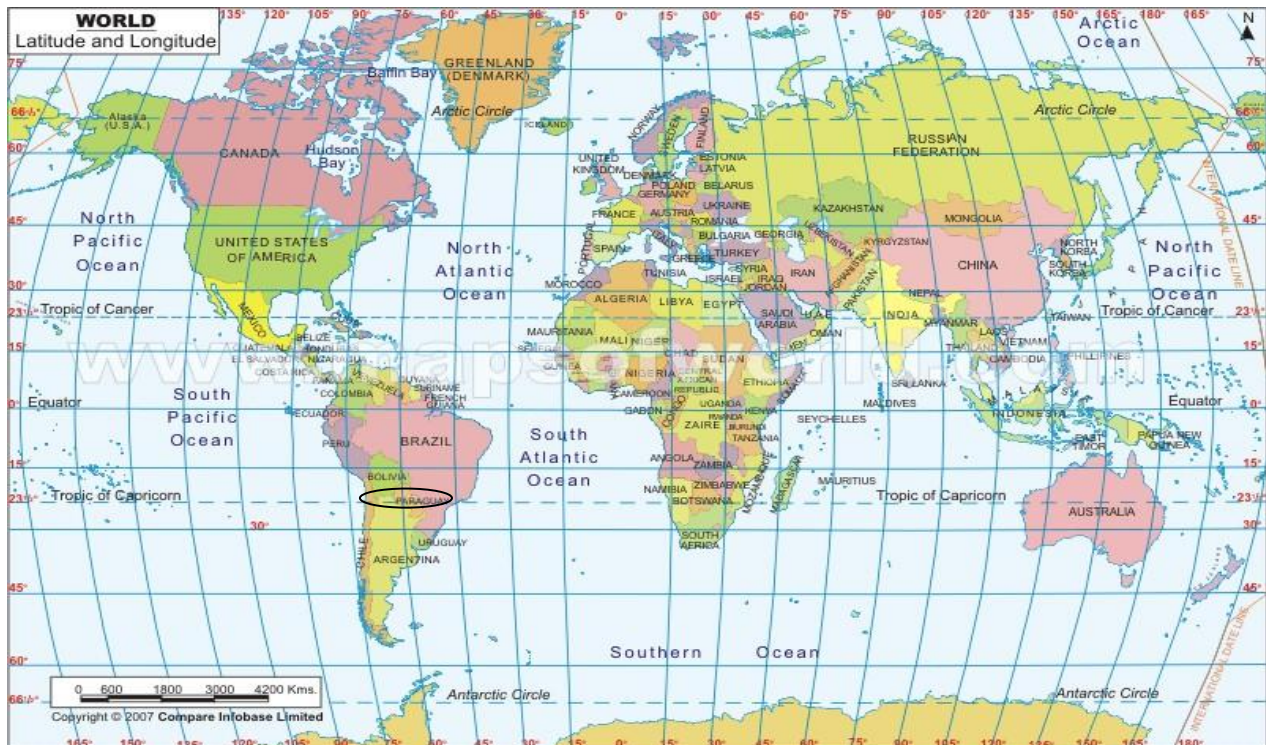


Figure 1: Carte situant la zone géographique d'où est originaire *Stevia rebaudiana* [14]

On trouve cette plante à l'état sauvage, sous un climat plutôt aride sur les plaines herbeuses peu pentues, dans les vallées formées par des rivières, à la lisière des forêts peu denses. La stevia pousse en plein soleil sur des sols pauvres à l'état naturel, mais peut aussi se développer dans des sols sablonneux.

Cette plante n'aime pas être envahie par d'autres végétaux comme les mauvaises herbes. Elle est pluriannuelle si les conditions hivernales sont douces, elle requiert une température minimale de 5 degrés pour obtenir une pousse l'année suivante. Il n'est pas nécessaire d'arroser l'hiver. La durée de vie d'un plant est d'environ de 6 saisons.

Concernant la reproduction, plusieurs modes de multiplication sont possibles. Les cultures peuvent se faire à partir de semis, par clonage ou par bouturage. Les bouturages successifs permettent d'augmenter la durée de vie d'un plant, la germination des graines étant faible.

Après avoir atteint une taille d'environ 5-6 cm, deux modes de culture sont possibles, en pot ou en pleine terre. Les feuilles peuvent être coupées toute l'année, pour les consommer fraîches. C'est à la fin de l'été juste avant la floraison qu'elles ont le plus fort pouvoir sucrant. À ce moment, elles sont les plus riches en glycosides de steviol. Il est préférable de couper par temps sec pour éviter la contamination par des éléments fongiques plus fréquents par temps humide.

Concernant la culture commerciale, la première cueillette se fait au bout de 4-5 mois de culture, les récoltes suivantes ont lieu tous les trois mois pendant environ trois ans, durée de vie pendant laquelle les rendements restent encore intéressants. La récolte s'effectue soit en cueillant uniquement les feuilles par petite quantité mais de façon régulière, soit en coupant la plante entière à dix ou quinze centimètres de la base pour s'assurer qu'elle puisse repartir ensuite. Une fois coupées, les feuilles et éventuellement les tiges sont séchées soit à l'ombre, soit dans des séchoirs industriels qui permettent de régler la température à un niveau constant. La conservation des feuilles séchées est presque illimitée. Elles sont ensuite réduites en poudre très fine. Grâce à ses faibles exigences, la stevia est particulièrement bien adaptée à la culture biologique, en ces temps de développement durable.

Les pays producteurs de stevia sont de plus en plus nombreux. Les principaux sont le Brésil, le Paraguay, l'Uruguay, la Chine, la Corée, la Thaïlande, Taïwan, Israël et le Japon.

2.1.4. Utilisations traditionnelles [5-7]

Les feuilles de stevia sont utilisées pour édulcorer les boissons depuis la nuit des temps par les Indiens Guaranis notamment leur maté qu'ils boivent en grande quantité. Les feuilles de stevia n'apportent pas de calorie.

Des extraits de feuilles de *Stevia rebaudiana* aurait été utilisées en médecine traditionnelle pendant des années pour traiter le diabète du fait de son action hypoglycémiante [15].

En 1941, la stevia commence à être connue en Grande Bretagne où la plante est proposée pour remplacer le sucre devenu très rare durant la seconde guerre mondiale. Mais elle n'a pas grand succès en raison de son goût de réglisse.

Étant donné la publicité faite sur cette plante et ses extraits édulcorants ainsi que la possibilité pour le grand public d'acquérir des plants de stevia par le biais d'internet pour leur consommation, il est nécessaire d'étudier certaines caractéristiques des feuilles de stevia. Ainsi nous étudierons leur composition et ferons le bilan des études pharmacologiques, cliniques et toxicologiques menées sur ces dernières.

2.2. Étude phytochimique des feuilles de *Stevia rebaudiana*

Les feuilles de stevia contiennent des protéines végétales (polypeptides), des lipides et des mono- et polysaccharides, dont des fibres, qui correspondent aux métabolites primaires. Des vitamines et des minéraux, dont des oligo-éléments, seraient également présents [6] [16].

Les métabolites secondaires isolés dans les feuilles de stevia correspondent à des flavonoïdes et des diterpènes, ainsi que des triterpènes, comprenant des stérols [7]. Les dérivés diterpéniques sont les plus nombreux et sont sous forme glycosylée [13].

2.2.1. Les diterpènes glycosylés

2.2.1.1. Structures

Les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni contiennent un mélange d'hétérosides dont la génine est le steviol [8]. Le steviol est l'acide ent-13-hydroxykaur-16-ène-19-oïque [12] [17] (Figure 2). On a isolé plus de trente hétérosides des feuilles de *Stevia rebaudiana* dans des proportions différentes [16]. Les glycosides de steviol les plus connus et les plus étudiés sont le stevioside et le rebaudioside A de part leur haute concentration dans les feuilles de la plante [16]. Ensuite viennent les rebaudiosides B, C, D, E, F et le dulcoside A [13]. Les autres glycosides de steviol (Figure 3) ont été découverts récemment [16]. Tous présentent la même génine (steviol) et diffèrent par les groupements en R et R₁, correspondant à une ou deux parties osidiques [17]. Il est à noter qu'une des parties sucrées R₁ est fixée à la génine par une liaison éther alors que la seconde R est liée par une fonction ester. L'hétéroside majoritaire est le stevioside dont le radical R est un beta-D-glucose et le radical R₁, un dimère de beta-D-glucose. Le radical R du rebaudioside A est aussi un beta-D-glucose tandis que le radical R₁ possède trois molécules beta-D-glucose.

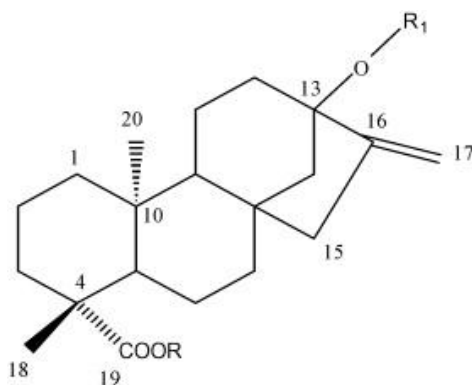


Figure 2: Structure du steviol [18]

Nom	Radical R	Radical R ₁
steviolmonoside	H	Glcβ1-
rubusoside	Glcβ1-	Glcβ1-
steviolbioside	H	Glcβ1-2Glcβ1-
dulcoside A	Glcβ1-	Rhaα1-2Glcβ1-
(1c)	Glcβ1-	6-deoxyGlcβ1-2Glcβ1-
stevioside	Glcβ1-	Glcβ1-2Glcβ1-
rebaudioside G	Glcβ1-	Glcβ1-3Glcβ1-
rebaudioside B	H	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
dulcoside B	H	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside A	Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
(1b)	Glcβ1-	Glcβ1-6Glcβ1-2Glcβ1-
(2b)	Glcβ1-	Glcβ1-2(Fruβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside C	Glcβ1-	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
(2c)	Glcβ1-	6-DeoxyGlcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
(1f)	Glcβ1-	Glcα1-3Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
(2f)	Glcβ1-	Glcα1-4Glcβ1-3(Glcβ1-2)Glcβ1-
rebaudioside L	Glcβ1-	Glcβ1-6Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside H	Glcβ1-	Glcβ1-3Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside F	Glcβ1-	Xylβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside E	Glcβ1-2Glcβ1-	Glcβ1-2Glcβ1-
(1a)	Xylβ1-6Glcβ1-	Glcβ1-2Glcβ1-
rebaudioside D	Glcβ1-2Glcβ1	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside I	Glcβ1-3Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside K	Glcβ1-2Glcβ1-	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
(1d)	Rhaα1-2Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside J	Rhaα1-2Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside N	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside M	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
rebaudioside O	Glcβ1-3Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-

Figure 3: Tableau des principaux glycosides de steviol [16]

Les teneurs en hétérosides de steviol varient selon l'origine de la plante et son mode de culture [13] [16]. Dans le cas d'un plant de stevia sauvage, les proportions des 4 principaux glycosides trouvés dans les feuilles par rapport au poids sec de la plante sont de 0,2 à 0,7% de dulcoside A, 1 à 2% de rebaudioside C, 1 à 4% de rebaudioside A et de 2 à 10% de stevioside [6-7] [17].

2.2.1.2. Localisation dans la plante

On trouve plus de stevioside et de rebaudioside A dans les feuilles que dans les fleurs [19]. Les racines de la plante ne contiennent que peu de stevioside et pas de rebaudioside A [20]. En fait, le stevioside et le rebaudioside A sont principalement concentrés dans les feuilles situées au sommet de la plante. Les grandes feuilles contiennent plus de glycosides de steviol que les jeunes feuilles [6].

La quantité des trois principaux glycosides de steviol, le stevioside et les rebaudiosides A et C, augmente régulièrement au cours du développement de la plante dans les feuilles et les tiges de stevia, et ceci jusqu'à la formation des bourgeons et la floraison [6].

Ces glycosides de steviol sont synthétisés dans les chloroplastes des feuilles, ensuite ils sont transportés par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et s'accumulent dans les vacuoles (Figure 4). Ils peuvent représenter jusqu'à 10 à 20% du poids sec de la feuille [6] [13] [16].

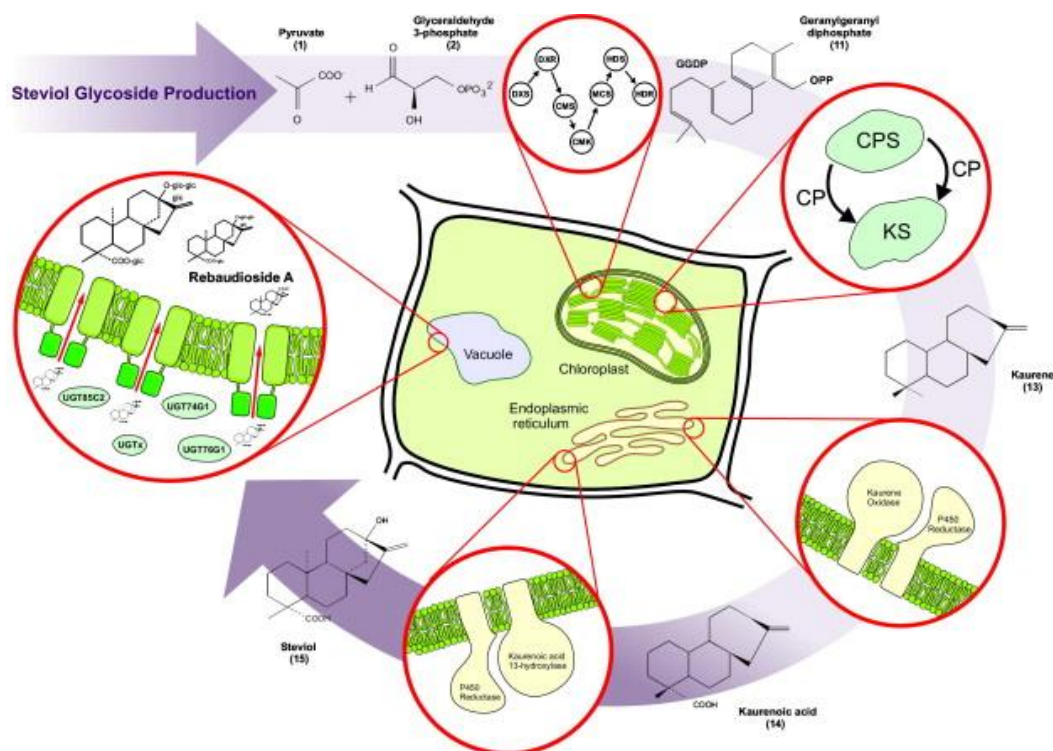


Figure 4: Localisation de la biosynthèse des glycosides de steviol [21]

2.2.1.3. Biogenèse des dérivés diterpéniques

Les hétérosides de stevia sont des diterpènes tétracycliques dérivés du même précurseur kaurénoïque que l'acide gibbéréllique qui est une hormone végétale [17] [20]. Ils sont le résultat de différentes glycosylations par le biais de

différentes glycosyltransférases à partir du steviol [21] [22]. C'est le degré de glycosylation du steviol qui donne les différents glycosides présents dans les tissus des feuilles de *Stevia rebaudiana*.

On distingue trois grandes étapes dans la biosynthèse des glycosides de steviol (Figure 5):

- La voie du méthylerythritol 4-phosphate (MEP) ou voie du mévalonate (biogenèse de la génine) [17]
- L'étape des terpènes cyclases (biogenèse de la génine) [20]
- Les glycosylations (biogenèse des hétérosides) [23]

1) La voie du MEP débute avec la formation du 1-deoxyxylulose-5-phosphate (3) à partir d'une molécule de pyruvate (1) et d'une molécule de glyceraldehyde-3-phosphate (2). Dans les chloroplastes des feuilles de stevia, une grande activité de HMG-CoA réductase, qui est l'enzyme clef de la synthèse du mévalonate [17], a été découverte et il a été conclu que le squelette ent-kaurène était formé par cette voie. Le 1-deoxyxylulose-5-phosphate (3) est un précurseur du diméthylallyldiphosphate (9) et de l'isopentenyl diphosphate (10). Ces derniers permettent la formation du géranylgeranyl diphosphate (GGDP) (11). Tous les diterpènes sont dérivés du GGDP (11).

2) Grâce à l'action de deux terpènes cyclases, la copalyl diphosphate synthase (CPS) et la kaurène synthase (KS), on obtient le squelette kaurène (13), qui est transformé en acide kaurénoïque (14) par oxydation grâce à la kaurène oxydase (KO). L'acide kaurénoïque (14) possède un squelette cyclopentanohydrophenanthrène [17] et est le précurseur du steviol (15) [20]. Le steviol (15) est produit par une hydroxylation de l'acide kaurénoïque (14) en C-13, par l'acide kaurénoïque 13-hydroxylase (KAH), alors que l'hydroxylation se fait en C-7 concernant la formation de l'acide gibbérellique [17] [20].

3) Le steviol (15) est rapidement glycosylé en C-13 et en C-19 [23] grâce à trois glycosyltransférases qui ont été étudiées et clonées [24]. Le groupe 13-hydroxyle est glycosylé en premier pour produire du steviol-13-O-glucopyranoside qui permet la formation de steviolbioside (17). Ensuite, le groupement carboxylique est glycosylé en C-19 pour obtenir du stevioside (18). La glycosylation du stevioside (18) forme à son tour du rebaudioside A (19) [23].

Voie du mévalonate (MEP):

Synthèse des terpènes

Étape des terpènes

cyclases

Étape des

glycosylations

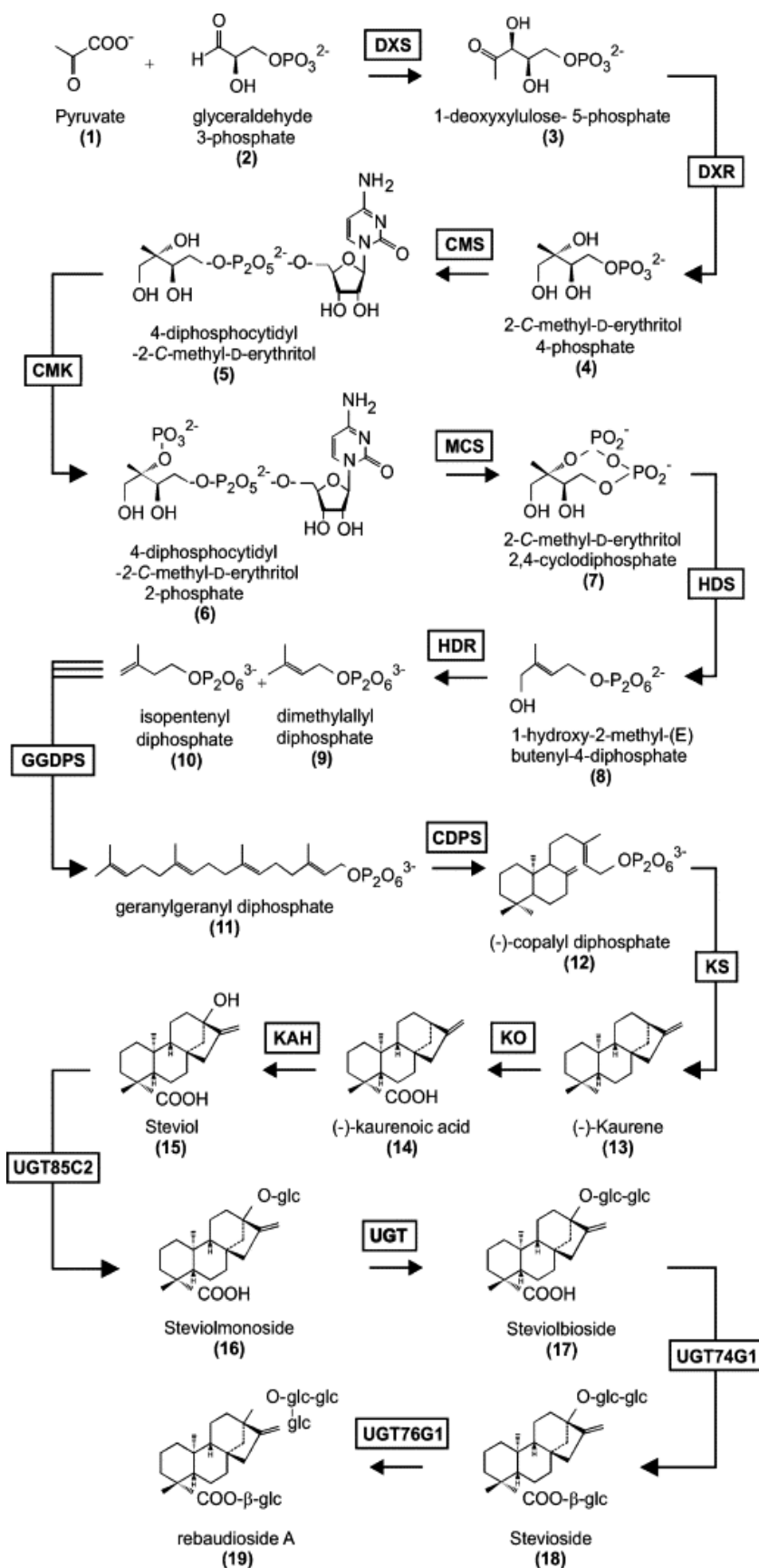


Figure 5: Voie de synthèse des glycosides de steviol [21]

2.2.2. Autres métabolites secondaires [16]

Des diterpènes non-glucosidiques, de type labdane, ont été retrouvés dans la composition des feuilles de stevia. Leur squelette est bicyclique contrairement au squelette du steviol qui est tétracyclique. Des polyphénols sont également présents, comprenant essentiellement des composés phénoliques ainsi que des flavonoïdes. De plus, il a été isolé des phytostérols et des triterpènes ainsi que des éléments volatiles, tels que des hydrocarbures dont des alcools aliphatiques.

Le pouvoir sucrant de la plante est dû aux glycosides de steviol contenus dans ses feuilles. Nous allons maintenant voir les études menées pour prouver d'éventuelles activités pharmacologiques ou thérapeutiques en dehors des propriétés édulcorantes.

2.3. Études pharmacologiques et cliniques d'extraits de feuille de stevia

Les feuilles de stevia sont utilisées pour édulcorer la nourriture depuis la nuit des temps par les Indiens Guaranis et pourraient être une alternative à la fabrication d'édulcorants synthétiques [6]. La consommation de feuilles de stevia pourrait limiter la formation des caries du fait d'être non calorique [6].

Des études ont également été menées pour démontrer d'éventuelles activités hypoglycémiantes, hypotensives, antimicrobienne et contraceptive.

2.3.1. Activité hypoglycémiant

Sachant que le diabète entraîne, à long terme, des complications micro-vasculaires (rétinopathie, néphropathie...) et macro-vasculaires (angine de poitrine, hypertension artérielle, artériopathie oblitérante chronique des membres inférieurs) [25] [26], l'intérêt de rechercher des produits hypoglycémiantes efficaces, pourraient apparaître comme très prometteurs dans ce domaine.

Le diabète est défini par une glycémie à jeun $\geq 1,26$ g/L (7,0 mmol/L) à deux reprises et /ou une glycémie ≥ 2 g/L, 2 heures après charge orale de 75 g de glucose [25] [26].

À l'état normal, la glycémie fluctue tout au long du nycthémère dans des limites étroites. Chez un sujet non diabétique, elle est de l'ordre de 0,7 à 0,8 g/L et ne dépasse pas 1 g/L à jeun. En période postprandiale, elle reste habituellement inférieure à 1,40 g/L [25] [26].

Des études pharmacologiques sur des rats diabétiques montrent que des extraits aqueux, méthanoliques et à base d'éther de feuilles de stevia sont hypoglycémisants [27]. Il en est de même concernant des extraits benzo-acétoniques à fortes doses (200 et 400 mg/kg/10 jours) [28]. Les feuilles de stevia et les polyphénols extraits de ces dernières, augmentent le taux d'insuline dans le sang et auraient un rôle protecteur au niveau des cellules du foie et des reins des rats diabétiques [29]. Il serait également possible que des extraits aqueux de feuilles de stevia, en améliorant la respiration mitochondriale et en inhibant la voie de la gluconéogenèse, puissent entraîner une hypoglycémie [30].

Dans une étude clinique menée sur des volontaires humains sains [31], les chercheurs montrent que le taux de glucose plasmatique après un traitement par un extrait aqueux de stevia est significativement abaissé. Ces auteurs ont réalisé des tests de tolérance au glucose chez des sujets adultes avant et après l'ingestion, soit d'extraits aqueux de feuilles de *Stevia rebaudiana* (20g/jour, en prises de 5g à intervalles réguliers de 6 heures) durant une période de 3 jours, soit de 250 mg d'une solution d'arabinose. Ils ont pu ainsi montrer que la glycémie, mesurée après le traitement à base de stevia, était significativement plus basse dans le groupe de personnes ayant ingéré l'extrait que dans le groupe témoin et ceci à chaque moment du test.

Aucun résultat concernant des études cliniques chez l'Homme diabétique n'a été trouvé.

2.3.2. Activité hypotensive

L'hypertension artérielle (HTA) n'est pas une maladie à proprement parler mais elle constitue l'un des plus importants facteurs de risque de lésions des artères coronariennes, d'accident vasculaire cérébral, d'insuffisance cardiaque, de néphropathies et de diverses maladies vasculaires périphériques [32].

95% des HTA sont considérées comme essentielles, c'est à dire sans qu'aucune étiologie précise ne puisse être retrouvée. La durée de traitement de l'HTA est indéfinie. Une bonne observance thérapeutique est l'un des facteurs déterminants du contrôle optimal des chiffres tensionnels. Quatre mesures hygiéno-diététiques ont démontré, avec un niveau de preuve variablement élevé, leur efficacité sur la réduction des chiffres de pression artérielle: il s'agit du régime peu salé, de la réduction pondérale, de la diminution de la consommation d'alcool et de la pratique sportive [32].

Chez l'adulte ne prenant aucun médicament antihypertenseur et ne présentant aucune maladie aiguë, l'hypertension artérielle est définie par une valeur de pression artérielle supérieure ou égale à 140 mmHg pour la pression artérielle systolique et/ou supérieure ou égale à 90 mmHg pour la pression artérielle diastolique. La définition de l'HTA est considérée comme indépendante de l'âge. Mais bien qu'arbitraire, cette définition peut avoir de grandes conséquences pratiques, beaucoup plus en termes socio-économiques qu'en termes de santé: plus la pression artérielle dite « normale » est basse et plus le nombre de sujets à traiter augmente d'où l'éventuel intérêt des extraits de feuilles de stevia dans ce domaine.

Des études ont été menées sur des rats normotendus ayant ingéré des extraits aqueux de stevia [33] ainsi que sur des rats normo- et hypertendus [34] ayant ingéré des extraits bruts (nature de l'extrait non renseigné) de stevia à des doses supérieures à celles utilisées en tant qu'édulcorant. Il a été observé une réduction de la pression artérielle par vasodilatation systémique et rénale, qui induit une hypotension due à une diurèse, une natriurie [33] tout en conservant un taux de filtration glomérulaire constant chez les rats normotendus, un taux élevé chez les rats hypertendus et avec une augmentation du flux plasmatique [34].

Une étude clinique menée sur des humains normotendus pendant 30 jours, consommant des extraits aqueux de stevia, a montré une faible diminution de la pression artérielle et un effet bradycardisant [35]. Cette étude rappelle que les diterpènes ont un potentiel thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires chroniques, y compris l'hypertension artérielle [35].

Aucun résultat concernant des études cliniques chez l'Homme hypertendu n'a été trouvé.

2.3.3. Activité anti-infectieuse

- Activité antibactérienne

L'extrait par l'eau chaude de *Stevia rebaudiana* Bertoni aurait un effet bactéricide spécifique contre des *Escherichia coli* entérohémorragiques et contre d'autres bactéries pathogènes d'origine alimentaire [36]. L'extrait n'est actif qu'en milieu acide et n'a d'action ni sur les bifidobactéries (*Bifidobacterium longum* et *adolescentis*) ni sur les lactobacilles (*Lactobacillus acidophilus* et *casei*). D'autres études ont été menées concernant des extraits de *Stevia rebaudiana* par différents solvants (acétate d'éthyle, acétone, chloroforme, hexane et eau) et ont aussi montré une potentielle activité antibactérienne [37] [38] [39].

- Activité antivirale

Stevia rebaudiana Bertoni aurait une activité contre les rotavirus [40], qui sont les principaux responsables des gastro-entérites déshydratantes chez les enfants. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que l'extrait par l'eau chaude de *Stevia rebaudiana* Bertoni avait une activité anti-rotavirus *in vitro* et qu'il inhiberait la réplication du rotavirus en empêchant la liaison du virus à la cellule.

2.3.4. Activité contraceptive

Différentes études ont été menées sur des rates et des rats. *Planas et Kue* [41] ont voulu vérifier le pouvoir contraceptif de l'extrait de *Stevia rebaudiana* Bertoni qui aurait paraît-il été utilisé par les tribus indiennes du Matto Grosso comme contraceptif oral. Dans ces tribus, les femmes buaient quotidiennement une décoction (extrait aqueux) de feuilles et de tiges séchées dans le but de contrôler leur fertilité. Ils ont donc étudié expérimentalement l'activité d'une décoction de cette plante sur différentes générations de rats albinos. Ils ont conclu de cette étude qu'une décoction de feuilles et de tiges de *Stevia rebaudiana* pouvait réduire d'environ 65% la fertilité chez les rates adultes en période de procréation. De plus, la

décoction continuait à diminuer la fertilité pendant au moins 50 à 60 jours après l'arrêt de l'administration, sans affecter l'appétit et la santé des animaux adultes.

Pour Mélis [42], l'extrait aqueux de stevia pourrait diminuer la fertilité des rats mâles après un traitement pendant 60 jours, sans entraîner de troubles d'après les analyses histologiques et morphologiques comparées et réalisées sur les testicules, la vésicule séminale, la prostate et le canal de l'épididyme d'animaux traités et d'animaux témoins. D'autres analyses ont par ailleurs révélé une diminution significative du taux de testostérone dans le plasma des animaux traités. Ces résultats pourraient indiquer une activité anti-androgénique des extraits de stevia.

Mais les résultats sont négatifs selon une autre étude [43] qui conclut que l'extrait aqueux de *Stevia rebaudiana* n'agit pas sur la fertilité des rats.

2.3.5. Activités anti-oxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse

Les extraits aqueux et éthanoliques de *Stevia rebaudiana* pourraient avoir un potentiel significatif en tant qu'actifs anti-oxydants naturels [44] [45]. Dans les études menées, les extraits aqueux et éthanolique ont inhibé les radicaux hydroxyles, l'oxyde nitrique ainsi que les anions superoxydes. Plusieurs tests, évaluant la capacité anti-oxydante d'un produit, ont montré que les extraits aqueux de feuilles de stevia sont doués d'une capacité anti-oxydante. Celle-ci est due aux composés phénoliques et aux flavonoïdes contenus dans les feuilles [16]. Par ailleurs, nous avons déjà vu que les extraits aqueux à base de stevia avaient un rôle bénéfique dans la réduction du stress oxydatif des cellules dans une étude menée chez des diabétiques [29].

L'oxygène est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres. Le stress oxydatif résulte d'une situation où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Il est potentiellement impliqué dans le développement d'inflammation et de lésions cancéreuses [46]. Les glycosides diterpéniques de type ent-kaurène de *Stevia rebaudiana* ont prouvé qu'ils pouvaient inhiber une inflammation induite [47]. Des extraits par l'acétone et par l'acétate d'éthyle de feuilles de stevia auraient une activité cytotoxique envers des cellules cancéreuses [37].

2.3.6. Résumé des études pharmacologiques et cliniques menées sur des extraits de feuille de stevia

Les différentes études veulent attribuer des propriétés pharmacologiques aux extraits de feuilles de stevia, mais celles-ci ne sont pas assez nombreuses, significatives et ne précisent pas toujours la nature de l'extrait ainsi que les quantités ingérées et la durée de l'étude. Il apparaît que la consommation régulière d'extraits aqueux de feuilles de stevia diminuerait la glycémie chez les Rats diabétiques comme chez l'Homme en bonne santé. Les extraits aqueux à base de stevia auraient une activité hypotensive chez le Rat normo-et hypertendu ainsi que chez l'Homme sain. Les résultats sont controversés selon les différentes études menées sur les rats concernant l'action contraceptive des feuilles de stevia. Une consommation quotidienne à long terme pourrait diminuer la fertilité de l'être humain.

Après ce point sur les propriétés pharmacologiques des feuilles de stevia, nous allons détailler les études toxicologiques menées sur ces dernières.

2.4. Étude toxicologique des extraits de feuilles de stevia

Depuis des siècles, les feuilles de stevia et leurs extraits bruts sont utilisés comme édulcorant par les Indiens Guaranis du Paraguay sans que des effets néfastes aient été observés suite à cette consommation [48]. Mais les autorités américaines, la Food and Drug Administration (FDA), excluent du commerce les feuilles ainsi que les extraits de feuilles de *Stevia rebaudiana* qui ne sont pas purifiés ou partiellement purifiés [49].

Les études toxicologiques en général portent sur la toxicité aiguë, c'est-à-dire à court terme après une dose unique, la toxicité sub-chronique à moyen terme, et la toxicité chronique, à long terme après une administration répétée, ainsi que sur la reproduction, c'est-à-dire l'absence d'effets toxiques durant la gestation, sur le fœtus ainsi que les générations suivantes. Il est aussi nécessaire de démontrer l'absence de toxicité génétique qui pourrait entraîner des mécanismes de

mutagenèse ou de cancérogenèse. Plusieurs tests existent pour prouver une toxicité génétique mais une seule étude a été menée sur les extraits de stevia, elle concerne le *cornet assay*.

Le *cornet assay* consiste à analyser l' Acide Désoxyribonucléique (ADN) des noyaux cellulaires par une électrophorèse sur gel afin d'évaluer les dommages causés par le produit testé. Si le produit testé n'altère pas l'ADN des cellules, l'ADN reste intact et « entier » et par conséquent ne peut pas migrer dans le gel d'électrophorèse. On obtient alors une « tâche » au niveau du puits de dépôt. *A contrario*, si le produit testé altère l'ADN, ce dernier va migrer dans le gel en fonction de la taille des fragments. On observe alors une « traîne », plus l'ADN est fragmenté et endommagé, plus la traîne sera longue et homogène [50].

L'essai effectué avec un extrait de stevia s'est révélé négatif [51].

Pour conclure, *Stevia rebaudiana* est une plante reconnue surtout pour ses propriétés édulcorante et hypoglycémiantes même si certains chercheurs ont démontré que cette plante pourrait avoir d'autres activités. Par ailleurs, une seule étude montre son innocuité.

En France et plus largement en Europe mais également aux États-Unis, l'utilisation alimentaire des glycosides de steviol, comprenant le stevioside et le rebaudioside A, est autorisée et réglementée [11, 48, 52-53]. Le stevioside est le glycoside de steviol le plus important en quantité. Le rebaudioside A est le plus sucrant des diterpènes glycosylés et le plus utilisé dans les spécialités pharmaceutiques par rapport au stevioside. C'est pourquoi nous allons voir l'obtention du rebaudioside A à partir des feuilles de stevia, ses propriétés physiques, sa pharmacocinétique, ses propriétés pharmacologiques et toxicologiques.

3. Rebaudioside A/ Extraits enrichis en rebaudioside A

Le rebaudioside A est formé d'une génine de steviol glycosylée par quatre molécules de glucose (Figure 6) [17]. La formule chimique du rebaudioside A est la suivante: $C_{44}H_{70}O_{23}$ [23] [52].

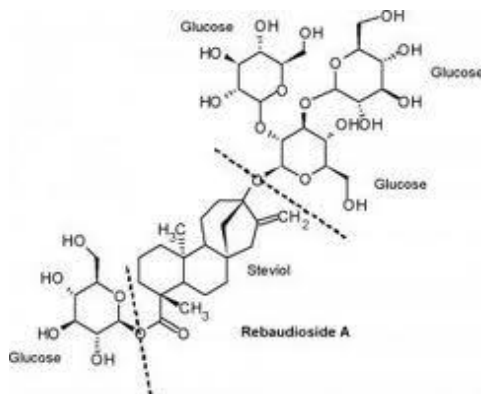


Figure 6: Structure du rebaudioside A [17]

3.1. Obtention du rebaudioside A

3.1.1. Extraction

L'extraction se fait à partir d'un composé solide, la plante. Il s'agit d'obtenir un extrait enrichi en glycosides de steviol avec une pureté supérieure ou égale à 95%.

Dans un premier temps, lors d'une extraction solide-liquide, il est nécessaire d'effectuer une étape de broyage des feuilles séchées [54]. Ceci favorise l'action du solvant en augmentant la surface de contact.

Dans un second temps, l'extraction à proprement parler s'effectue avec un extracteur contenant de l'eau ou un solvant dans lequel le composé recherché est soluble. Un solvant dissout plus facilement un composé qui comporte des groupements fonctionnels identiques ou proches. L'eau et l'éthanol sont des solvants souvent utilisés et peuvent se mélanger,

ils permettent d'obtenir des extraits aqueux, éthanoliques ou hydro-éthanoliques. Ils comportent un groupement hydroxyle « OH » qui leur confère un caractère hydrophile important. En fonction de la thermolabilité du composé, la température du solvant doit être contrôlée [55].

Dans la demande d'autorisation de mise sur le marché par Greensweet d'un édulcorant à base de stevia, l'extraction est réalisée par une infusion dans l'eau des feuilles à 60°C pendant 30 à 45 minutes [56]. Cette technique d'extraction par l'eau chaude est approuvée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) [57].

De nouvelles méthodes [16] utilisent l'extraction par de l'eau pressurisée à haute température (eau subcritique) ainsi que par une technique par micro-ondes assistée. Ces techniques permettent d'obtenir des extraits aqueux et montrent une efficacité comparable voire augmentée. L'extraction assistée par sonication augmente le rendement à une température plus basse avec un temps d'extraction plus court comparé aux méthodes conventionnelles vues précédemment. Les glycosides de steviol ont aussi été extraits par des fluides supercritiques [58].

Après l'étape de l'extraction vient ensuite l'étape de purification ou enrichissement de l'extrait.

3.1.2. Purification

Concernant la demande d'autorisation de mise sur le marché d'édulcorant par Greensweet [56], celui-ci l'a réalisée en plusieurs étapes (Figure 7). Tout d'abord, une clarification de l'extrait est réalisée par précipitation de ce dernier avec de l'hydroxyde de calcium après avoir été filtré. La phase liquide est neutralisée par de l'acide citrique. L'extrait est de nouveau filtré, puis le produit fini subit une décoloration par adsorption de pigments sur une résine échangeuse d'ions. Ensuite, le produit obtenu est placé sur une seconde résine échangeuse d'ions qui va retenir spécifiquement les glycosides de steviol. Cette dernière fraction est concentrée et séchée par atomisation ou lyophilisation. L'adsorption sur résines présente plusieurs avantages dont la simplicité du procédé, le faible coût de l'opération, la quantité faible de solvant utilisé, une séparation sélective et un produit enrichi de qualité [59] [60].

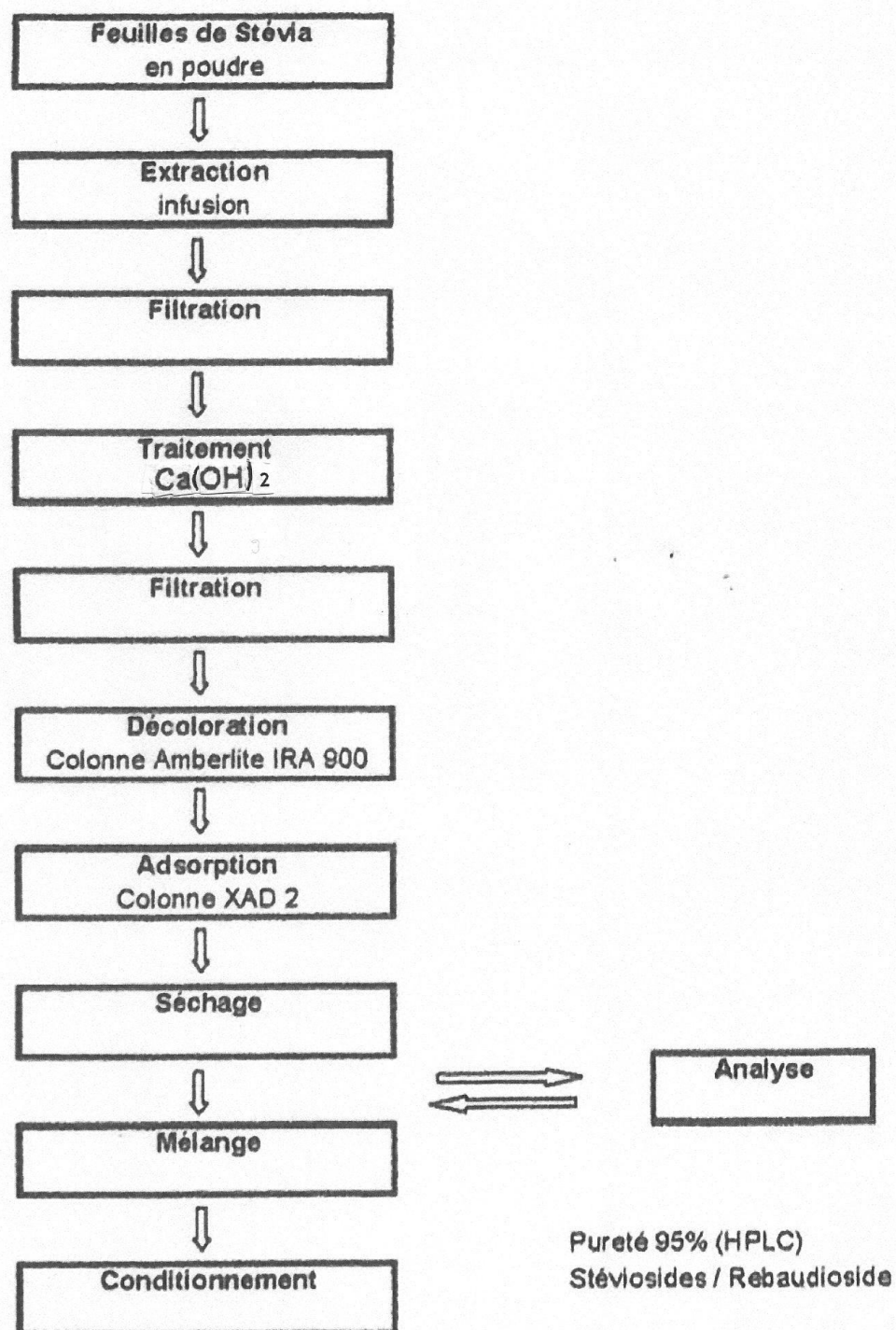


Figure 7: Schéma d'extraction et de purification du rébaudioside A [56]

3.2. Propriétés physiques du rebaudioside A

Caractères organoleptiques	Le rebaudioside A est une poudre blanche cristalline, parfois légèrement jaunâtre, inodore, de poids moléculaire de 967,00 g/mol au goût sucré [5] [54]
Solubilité	Soluble dans l'eau à 25°C [52], on peut dissoudre 33 grammes de rebaudioside A dans 100 grammes d'eau. Cette solubilité est beaucoup plus faible dans l'éthanol dans les mêmes conditions de température, la solubilité du rebaudioside A chute à 1,69 grammes dans 100 grammes d'éthanol. La solubilité augmente avec augmentation de la température quelque soit le solvant utilisé [61]
Point de fusion	Compris entre 242 et 244°C [62]
Stabilité	Variable en fonction de la température, du temps et du pH [54]

Tableau 2: Récapitulatif des propriétés physiques du rebaudioside A

À température ambiante, le rebaudioside A est particulièrement stable dans la gamme de pH de 2 à 10. À 37°C en milieu acide après plus de trois mois, il ne montre pas de dégradation. À 60°C pendant une période de trois mois dans différentes conditions de pH, l'analyse du rebaudioside A réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie liquide haute performance (CLHP) selon la périodicité suivante 1h, 3h, 6h, 24h, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 2 mois et 3 mois, a montré qu'une dégradation se produit au bout de 1 à 2 mois. Le rebaudioside A est transformé en rebaudioside B, du fait de l'hydrolyse préférentielle du groupement glucose en position 19. Cette dégradation est plus efficace aux pH extrêmes, pH <3 et pH >9 [54].

3.3. Étude pharmacocinétique du rebaudioside A

3.3.1. Absorption

Le rebaudioside A n'est pas absorbé au niveau intestinal [63]. Après une administration orale de rebaudioside A, ce dernier n'est pas détecté dans la circulation sanguine [64]. Cette absorption quasi nulle peut être expliquée par le poids moléculaire du rebaudioside A, $PM=967,00$ g/mol, ainsi que par son caractère très hydrophile qui l'empêche de passer la muqueuse gastro-intestinale [17]. Le rebaudioside A « arrivent » donc au niveau intestinal sans avoir subi une quelconque dégradation ou modification.

Une étude [64] a été réalisée afin de « quantifier » le transport intestinal du rebaudioside A à travers la monocouche de cellules « Caco-2 », lignée cellulaire humaine d'origine intestinale formant un épithélium mimant la barrière intestinale. Le passage via cette couche unicellulaire est extrêmement lent: $0,11 \times 10^{-6}$ cm/s.

Cependant, l'administration orale de rebaudioside A (5,0 mg/kg) radio-marqué au carbone 14, a permis d'affirmer qu'il a été hydrolysé en steviol (génine) afin de pouvoir passer la muqueuse gastro-intestinale [70].

L'hydrolyse du rebaudioside A a lieu au niveau intestinal et est réalisée par la flore microbienne [63]. En effet, on observe une hydrolyse totale du rebaudioside A en steviol après 6 jours d'incubation dans une suspension fécale cellulaire de rat [66].

Si on réalise la même expérience avec une suspension fécale acellulaire de rat, c'est-à-dire une suspension dépourvue des bactéries de la flore intestinale, on remarque que seulement 2% du rebaudioside A a été converti en steviol, au bout de 7 jours d'incubation [66]. Il en est de même chez l'Homme, après 72h d'incubation de rebaudioside A avec un extrait de microflore intestinale humaine [67] [68], on ne détecte pas d'autres produits que le steviol, d'où la conclusion que ce dernier est le produit final de dégradation de la flore intestinale humaine.

Le groupe de bactéries *Bacteroidaceae* des fèces humaines est responsable de l'hydrolyse du rebaudioside A car elles possèdent une activité beta-glucosidase importante [68]. Les bactéries fécales humaines s'avèrent ensuite incapables de dégrader le steviol. Le rebaudioside A n'influence pas de manière significative la composition de la culture fécale. Le genre *Bacteroides* est le mieux à même d'hydrolyser le rebaudioside A en steviol car parallèlement, il a été démontré que les *Bifidobacteriae*, les *Clostridiae*, les *Coliformes*, les *Enterococci* et les *Lactobacilli* métabolisaient peu le rebaudioside A [68]. Cette hypothèse a été confirmée par une autre étude similaire [63].

La pharmacocinétique du steviol a été étudiée sur une anse isolée d'intestin de rat, ils ont constaté une absorption rapide de celui-ci, avec un indice de transport dépassant de 70% la valeur de référence de l'acide salicylique [69].

L'absorption du steviol s'effectuerait par diffusion passive, laquelle est directement proportionnelle au gradient de concentration, à la solubilité et au poids moléculaire de l'élément et/ou par des transporteurs, et plus précisément par un transporteur analogue à celui des acides monocarboxyliques, ceci pourrait aussi expliquer le passage d'une faible quantité de steviol dans le sens de la sécrétion [64] [69]. Le steviol n'aurait pas de site préférentiel d'absorption, il pourrait être absorbé soit au niveau du duodénum soit au niveau de l'iléum [69].

En conclusion, au niveau de l'intestin, le rebaudioside A n'est pas absorbé, il est métabolisé en steviol par la microflore bactérienne du colon. Le steviol est quant à lui absorbé au niveau intestinal et pris en charge par le système de la veine porte [69]. C'est pourquoi, nous étudierons donc la distribution, la métabolisation et l'élimination du steviol.

3.3.2. Distribution

La distribution du steviol dans des organes vitaux, tels que le cerveau et le coeur, serait considérée comme défavorable car le steviol pourrait induire des effets indésirables dans ces organes.

L'étude de la distribution du steviol est importante pour une utilisation de celui-ci à des fins thérapeutiques afin de connaître son ou ses organes cibles, cela permet de prédire son ou ses effets systémiques ainsi que des données toxicologiques [70]. Mais aucune des données bibliographiques étudiées ne le précise.

3.3.3. Métabolisation

La présence de steviol libre a été mise en évidence dans des échantillons de plasma prélevés dans la veine porte de rats ayant ingéré du steviol. Il est immédiatement pris en charge par le foie qui procède à sa glucuroconjugaison [64].

Le steviol mis en incubation en présence de microsomes humains donne, après des réactions d'oxydation, des métabolites du steviol: le monohydroxy-steviol et le dihydroxy-steviol. Ces derniers s'éliminent par la bile [69].

En conclusion, le steviol doit être glucuroconjugué dans le foie pour être éliminé par la bile.

3.3.4. Élimination

La première partie du métabolisme est similaire chez l'Homme et chez le Rat, cela concerne l'hydrolyse des glycosides de steviol par la microflore intestinale, l'absorption au niveau intestinal et la glucuroconjugaison hépatique. La principale différence entre le métabolisme humain et celui du rat est l'excrétion (Figure 8).

Ainsi, chez le Rat, le glucuronide de steviol est pris en charge par les voies biliaires et directement évacué dans le tube digestif [65]. Ceci est prouvé par une étude menée sur un groupe de rats ayant subi une « canulation » des voies biliaires afin de recueillir la bile. Cette étude a permis l'analyse de la composition de cette dernière et a mis en évidence un produit majoritaire: le glucuronide de steviol [65]. L'étude des fèces montre que le glucuronide de steviol est présent dans de faibles proportions alors que le steviol est majoritaire, cela implique une « déconjugaison » du glucuronide de steviol. Le steviol libéré est alors éliminé en masse dans les fèces, mais une partie est réabsorbée pour subir à nouveau la métabolisation hépatique [65] [70].

Chez l'Homme [71], le steviol après avoir été conjugué en glucuronide de steviol au niveau hépatique est relargué dans la circulation sanguine et filtré par le rein. Le glucuronide de steviol est détecté de façon « massive » dans les urines, ce qui laisse supposer qu'il n'est pas accumulé dans l'organisme et est totalement excrété. Le steviol à l'état libre est présent à l'état de « traces » dans les fèces [71].

Cette différence d'élimination entre l'Homme et le Rat, par hypothèse, peut être expliquée par la différence de filtration glomérulaire entre l'Homme et le Rat dû au poids moléculaire du glucuronide de steviol.

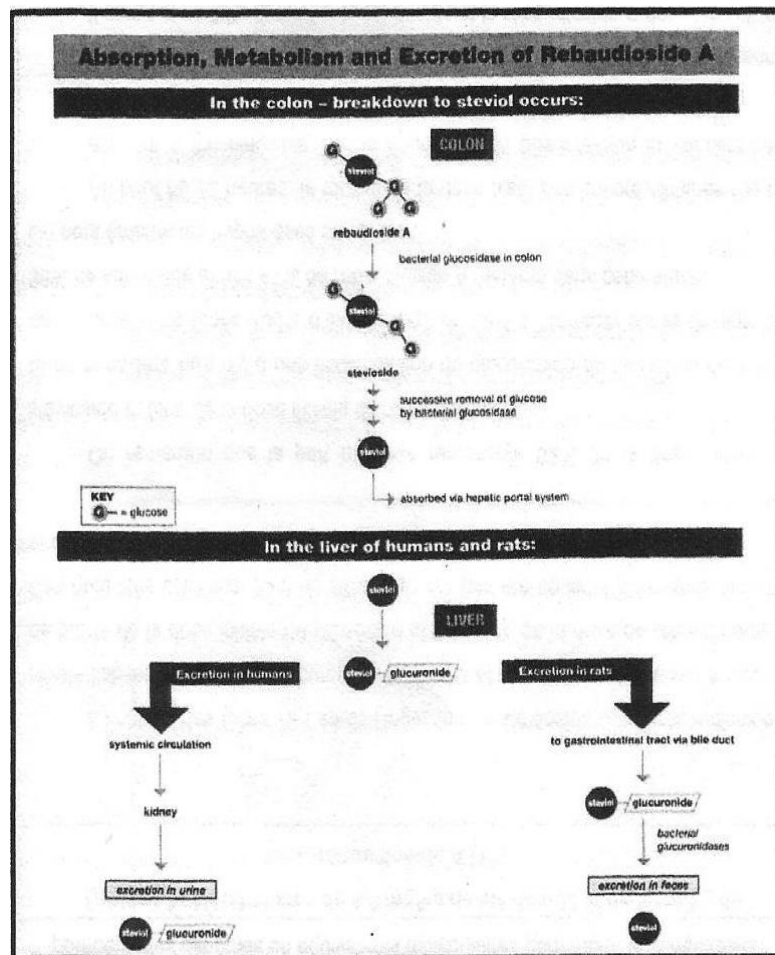


Figure 8: Métabolisme du rebaudioside A chez l'Homme et chez le Rat [72]

Après avoir développé le déroulement du métabolisme du rebaudioside A au sein de notre corps, nous allons maintenant voir les études pharmacologiques et cliniques menées sur le steviol ainsi que sur le rebaudioside A.

3.4. Études pharmacologiques sur le steviol et sur le rebaudioside A

3.4.1. Étude pharmacologique sur le steviol

3.4.1.1. Activité sur la glycémie

L'absorption du glucose peut être inhibée par le steviol au niveau du jéjunum de hamster, cela dépend de sa concentration et du temps de contact [73]. Concernant l'étude, 1 millimole a inhibé 43% de la réabsorption du glucose, cela correspond à 0,8 g de steviol sachant que sa masse molaire est de 804,8 g/mol [64]. Le steviol diminuerait l'accumulation de glucose au niveau des cellules intestinales en modifiant la morphologie des cellules responsables de l'absorption au niveau de la membrane en brosse [73]. De plus, le steviol injecté en intraveineuse à la dose de 1 et 3 mg/kg/h inhibe la réabsorption du glucose au niveau des tubules rénaux chez le rat [74] [75] en modifiant le taux de certains cations nécessaires au transport du glucose [74]. Le steviol à une concentration de 1 $\mu\text{mol/L}$ aurait un rôle insulinothérapeutique en présence d'au moins 16,7 mmol/L de glucose [70].

Il est difficile de conclure sur l'effet du steviol sur la glycémie car nous ne sommes pas en mesure de savoir la quantité de steviol libre dans notre corps après une ingestion de rebaudioside A.

3.4.1.2. Activité sur la tension artérielle

Le steviol administré par infusion à une concentration de 0.5, 1 et 3 mg/kg/h pourrait affecter le transport de l'eau et du sel au sein des tubules rénaux de rats [76] causant une diurèse, une natriurèse ainsi qu'une kaliurèse pouvant modifier les chiffres tensionnels [74]. Tandis qu'une injection intraveineuse de 0.5, 1 et 3 mg/kg/h de steviol ne montre aucun changement significatif de la pression artérielle ainsi que du taux de filtration glomérulaire [76].

L'étude a été réalisée avec une forte dose de steviol, ce qui ne correspond pas à une consommation « normale » d'édulcorant à base de rebaudioside A.

Le steviol n'a pas d'activité pharmacologique utilisée aux doses usuelles (DJA : 4 mg/kg de poids corporel [77]). Pour finir sur les études pharmacologiques concernant le steviol, des chercheurs ont montré que le steviol pourrait avoir un rôle anti-inflammatoire sur des cellules intestinales [78] et immunomodulateur sur des cellules cancéreuses de colon [79].

3.4.2. Étude pharmacologique sur le rebaudioside A

3.4.2.1. Activité sur la glycémie

Deux études pharmacologiques avec supplémentation orale en rebaudioside A chez des rats diabétiques donnent des résultats diamétralement opposés. Certains n'observent aucun effet du rebaudioside A (0,025g/kg de poids corporel par jour) sur la glycémie [15], tandis que certains [80] réussissent à démontrer que le traitement diminue le taux de glucose dans le sang et a un effet protecteur sur leur pancréas, sans nous donner les valeurs de la supplémentation orale.

Le rebaudioside A [81] posséderait des effets analogues à l'insuline à hautes doses, dépendant du calcium extracellulaire, cette étude a été menée sur des îlots de Langerhans isolés de souris. Le rebaudioside A aurait l'avantage de créer moins d'hypoglycémie par rapport à un traitement avec des sulfonylurées [82].

Comme il a été démontré précédemment, le rebaudioside A pourrait avoir un rôle hypoglycémiant chez le Rat. Donc il pourrait y avoir un risque d'hypoglycémie chez des consommateurs potentiels de rebaudioside A pour le contrôle de leur glycémie, notamment chez les diabétiques. La recherche aurait-elle aussi un intérêt concernant le traitement des hypertendus?

3.4.2.2. Activité sur la tension artérielle

Le rebaudioside A n'a pas montré d'effet hypotenseur sur des rats mâles ayant une supplémentation journalière de rebaudioside A (0,025 g/kg de poids corporel par jour) durant huit semaines [15].

Le rebaudioside A n'entraîne aucune diminution de pression artérielle systolique et diastolique chez le Rat. Cela contredit les études menées sur les diterpènes qui auraient un effet sur les maladies cardiovasculaires dont l'HTA [35].

3.4.2.3. Activités anti-inflammatoire et antitumorale

Le mélange de quatre dérivés du steviol (stevioside, rebaudiosides A et C, dulcoside A) a montré une forte activité inhibitrice vis-à-vis d'une inflammation induite, chez la souris, et par ailleurs, le mélange a aussi inhibé la formation des tumeurs cutanées induites [36].

Il a aussi été démontré que le rebaudioside A a une activité similaire à l'hydrocortisone [17].

Peu d'études pharmacologiques ont été menées sur le steviol et le rebaudioside A. Aucune étude clinique n'a été trouvée concernant le steviol. Nous allons maintenant voir les quelques études cliniques menées sur le rebaudioside A.

3.5. Étude clinique sur le rebaudioside A

3.5.1. Activité sur la glycémie

Une étude clinique portant sur une consommation chronique de 1000 mg de rebaudioside A pendant seize semaines chez l'Homme a permis de conclure qu'il n'influçait pas la glycémie chez des patients diabétiques des deux sexes [83]. Cependant, nous ne savons pas si la consommation est quotidienne, hebdomadaire ou si elle porte sur la durée entière de l'étude. La même conclusion a été faite concernant une autre étude comparant des patients sains et des diabétiques ayant ingéré une seule dose de rebaudioside A (500 mg, 750 mg ou 1000 mg) [84].

3.5.2. Activité sur la tension artérielle

Le rebaudioside A n'a pas démontré d'effet hypotenseur selon une étude clinique menée sur l'Homme sain ayant ingéré 1000 mg par jour de rebaudioside A pendant un mois [85]. Ni chez des patients diabétiques ayant ingéré une dose unique (500 mg, 750 mg ou 1000 mg) [84]. Le rebaudioside A n'entraîne aucune diminution de la pression artérielle systolique et diastolique chez l'Homme [84-86], il n'entraîne pas non plus une diminution du rythme cardiaque [85] et n'a pas d'effet protecteur sur les risques cardiovasculaires [86].

Le rebaudioside A étant destiné à l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, la question de la toxicité est importante. Cette dernière a été longtemps l'obstacle à l'autorisation de la mise sur le marché du rebaudioside A. Des avis défavorables ont été émis par la commission européenne concernant la mise sur le marché de la stevia en tant qu'édulcorant [7], l'innocuité de la plante et de ses dérivés n'ayant pas été prouvée. Dès lors, les essais tentant de prouver l'absence d'effets toxiques des hétérosides de la stevia se sont multipliés. C'est pourquoi nous allons voir les études toxicologiques menées sur le rebaudioside A et sur son produit de dégradation : le steviol.

3.6. Études toxicologiques sur le rebaudioside A et sur le steviol

Le rebaudioside A a été testé concernant la toxicité sub-chronique et la toxicité génétique avec différents tests.

3.6.1. Toxicité sub-chronique du rebaudioside A

La toxicité sub-chronique permet de fixer des limites concernant les valeurs admissibles.

La toxicité sub-chronique du rebaudioside A a été étudiée chez des lignées de rats « Wistar » pendant quatre et treize semaines [87]. Ces rats ingéraient du rebaudioside A à différentes concentrations allant de 0 à 100 000 ppm. La dose sans effet toxique observable (NOAEL : No Observed Adverse Effect Level), incluant une évaluation histopathologique des testicules a été déterminée à 100 000 ppm. Dans la deuxième étude, les rats ingéraient du rebaudioside A à des concentrations allant de 0 à 50 000 ppm. La première observation est une baisse significative du poids des animaux traités par rapport à celui des animaux non traités. Ces résultats sont à mettre en rapport avec le fait que le rebaudioside A modifie la palatabilité des aliments de par son pouvoir édulcorant. La perte de poids ne s'explique pas par des effets toxiques mais par la faible densité calorique de leur nourriture. La dose sans effet toxique observable a été fixée à 50 000 ppm, qui équivaut à 4161 et 4645 mg/kg de poids corporel par jour respectivement chez les mâles et les femelles.

Une autre étude [88] a été menée sur des rats pendant 90 jours dans le but d'évaluer la toxicité du rebaudioside A à des concentrations de 500, 1 000 et 2 000 mg/kg/jour. Les bilans hématologiques, biochimiques et urinaires n'ont révélé aucune toxicité ainsi que les bilans histopathologiques des organes. Il a seulement été noté une moindre prise de poids concernant les mâles consommant 2 000 mg/kg/jour de rebaudioside A.

3.6.2. Toxicité génétique du rebaudioside A

Quatre tests ont été effectués sur le rebaudioside A: l'« Ames test », un test sur l'incidence des aberrations chromosomiques, un test sur des cellules de lymphomes de souris ainsi que le test du micronucléus.

L'« Ames test » ou test de mutation reverse est effectué in vitro et consiste à mettre en présence une souche de *Salmonella typhimurium* auxotrophe pour l'histidine avec l'agent susceptible d'être mutagène. Une souche est dite auxotrophe lorsqu'elle présente une mutation qui rend impossible la synthèse d'un métabolite essentiel. L'apparition d'une prototrophie pour l'histidine montre que l'agent testé est capable d'induire une réversion de la souche. L'ajout d'un extrait de foie de rat (S9 mix) permet de mimer le métabolisme, c'est un activateur métabolique. En parallèle, la souche est traitée par un produit mutagène connu, comme le phénobarbital, afin d'effectuer une comparaison, c'est le contrôle positif [89].

Concernant le rebaudioside A [90], l'« Ames test » effectué avec des souches de *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* est négatif en présence ou absence du S9 mix.

Le rebaudioside A a aussi été testé sur l'incidence des aberrations chromosomiques dans des cellules de poumons de hamster. Il en résulte que le rebaudioside A n'augmente pas de manière significative, avec ou sans S9 mix, l'incidence des aberrations chromosomiques [90].

Le test sur des cellules de lymphome de souris consiste à mettre en présence l'agent suspecté d'être génotoxique avec une culture de cellules de lymphome de souris. Un produit génotoxique induit une mutation dans le locus d'une tyrosine kinase. Cette mutation se traduit par une résistance des cellules aux effets cytotoxiques des analogues de la pyrimidine. C'est en fait l'équivalent du test « d'Ames » adapté aux cellules eucaryotes [91]. Ce test s'est révélé négatif concernant le rebaudioside A [90].

Certains produits génotoxiques interfèrent dans l'érythropoïèse, notamment durant la phase de maturation des hématies au sein de la moelle osseuse. Cette interférence se traduit par une augmentation des hématies à micronucléus qui sont des hématies immatures n'ayant pas expulsé correctement leur noyau. Le test du micronucléus est un test *in vivo*. Les produits sont injectés à des souris. Leur moelle osseuse est ensuite examinée et les cellules immatures sont comptées. Un contrôle négatif permet de comparer les résultats obtenus et un contrôle positif permet de s'assurer du bon déroulement du protocole [91]. Le test du micronucléus s'est révélé négatif [90].

3.6.3. Toxicité sur la reproduction et la tératogenèse du rebaudioside A

L'étude a été réalisée sur deux générations de rats [92]. Les animaux de la F0 (parents) reçoivent *per os* différents dosages de rebaudioside A, 0, 7 500, 12 500 et 25 000 ppm, avant l'accouplement. Les femelles sont traitées pendant toute la durée de la gestation et de l'allaitement. En plus des paramètres (gain de poids, prise alimentaire), on observe la régularité du cycle ovarien, la durée de la gestation, la taille et la survie de la portée chez les femelles de la F0 et de la F1. Chez les mâles de la F0 et de la F1, on réalise des spermogrammes afin d'évaluer leur fertilité. Enfin, la deuxième génération est aussi observée et pesée. Elle est ensuite sacrifiée dans le but de peser certains organes.

Aucun effet indésirable significatif concernant les poids corporels des animaux n'est observé. Cependant, il est noté un gain de poids plus faible dans certains groupes traités à des moments différents. Cet effet est attribué à la faible densité

calorique des repas. En effet, cette croissance plus faible intervient au moment où les animaux sont sevrés de l'allaitement maternel.

Aucune différence n'est détectée entre les groupes témoins concernant la fertilité, la durée de la gestation et le cycle ovarien des femelles de la F0 et de la F1. Quant aux poids des organes, on remarque que certains animaux traités de la F1 et de la F2 présentent une rate plus petite que celles des animaux non traités.

Cependant, les analyses hématologiques ne montrent pas d'anomalies tout comme l'examen histopathologique des autres organes du système immunitaire. Enfin, la consommation de rebaudioside A n'affecte pas la capacité des femelles de la F0 et de la F1 à procréer et mener à bien la gestation ainsi que la lactation.

De même, le traitement n'influe pas sur la taille de la portée, le sex-ratio et la survie pré et post-natale de la première et deuxième génération. Les auteurs concluent que le rebaudioside A n'altère pas les fonctions de la reproduction et ne possède pas d'effets tératogènes.

Il est à noter qu'aucune étude concernant la toxicité chronique n'a été menée chez l'Homme. Nous ne pouvons pas conclure quant à une administration orale de rebaudioside A sur le long terme.

Il existe une étude concernant la toxicité aiguë du steviol et plusieurs études concernant la toxicité génétique de ce dernier.

3.6.4. Toxicité aiguë du steviol

La toxicité aiguë du steviol a été testée sur trois espèces animales mâles et femelles différentes (rat, souris, hamster) [93]. Les hamsters sont plus sensibles au steviol que les rats et les souris. La dose létale (DL50) concernant les hamsters est de 5,2 et 6,10 g/kg de poids corporel respectivement chez les mâles et les femelles. La mort serait due à une insuffisance rénale aiguë. Chez le Rat et la Souris, la DL 50 est de 15 g/kg de poids corporel dans les deux sexes.

3.6.5. Toxicité génétique du steviol

Les résultats des tests concernant la toxicité du steviol ont été regroupés dans le tableau 3.

La toxicité du steviol a été testée *via* le *cornet assay* [50]. Le test *in vitro* s'est révélé négatif avec ou sans activateur métabolique (S9 mix). Le test *in vivo* a consisté à sacrifier des souris après une administration orale de 250, 500, 1000 et 2000 mg/kg de steviol au bout de 3 et 24 heures. L'examen de l'estomac, du colon, du foie, des reins et des testicules n'a montré aucun endommagement de l'ADN. Les tests se sont aussi révélés négatifs concernant l' *Ames test* [91] avec ou sans activateur métabolique, le *rec assay* [91] utilisant la bactérie *Bacillus subtilis* avec ou sans activateur métabolique, ainsi que le test du micronucléus [91].

Par contre, plusieurs tests *in vitro* se sont révélés positifs : celui des aberrations chromosomiques [91] le test de mutation sur des cellules de mammifères [91] ainsi que l' *Umu test* [91]. L'expression de l'opéron (ADN spécifique) Umu est responsable de mutagenèse. On mesure l'activité de cet opéron grâce à une enzyme, la bêta-galactosidase [91].

Nom du test	Steviol	Rebaudioside A
Cornet assay	Négatif	-
Ames test	Négatif	Négatif
Umu test	Légèrement positif	-
Aberrations chromosomiques	Positif à forte dose sue des cellules de hamster	Négatif
Rec assay	Négatif	-
Mutation génétique sur des cellules de mammifères	Positif	Négatif
Test du micronuleus	Négatif	Négatif

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des tests génétiques effectués sur le steviol et le rebaudioside A

Pour conclure, le steviol apparaît positif sur certains test, cela peut être du à des métabolites ou à des impuretés [91], de fortes concentrations [94], le mécanisme n'a pas été déterminé [94]. Il est à noter qu'aucune étude sur le long terme n'a été menée.

3.6.6. Toxicité sur la reproduction et la tératogénèse du steviol

Le steviol aux doses de 0,75 et 1,0 g/kg de poids corporel par jour avalé par des femelles hamsters gestantes s'est révélé toxique pour les fœtus [95]. Par contre, une dose journalière de 0,25 g/kg de poids corporel n'entraîne aucun effet secondaire ni pour la mère ni pour le fœtus [95]. Par mesure de précaution, même si le hamster n'est pas le meilleur modèle pour comparer avec l'Homme, il serait préférable de ne pas utiliser d'édulcorant à base de rebaudioside A durant la grossesse.

3.7. Résumé des études pharmacocinétiques, pharmacologiques, cliniques et toxicologiques menées sur le rebaudioside A

L'analyse des études pharmacocinétiques précédemment rapportées permet d'affirmer qu'aucune enzyme digestive appartenant naturellement au tractus gastro-intestinal des animaux ou de l'Homme n'est capable de dégrader le rebaudioside A en steviol. Ce n'est que grâce aux bactéries du genre *Bacteroides* présentes dans le colon de l'Homme que le rebaudioside A peut être dégradé en steviol, qui est lui-même absorbé et pris en charge par le système de la veine porte. C'est pourquoi, on ne détecte peu ou pas de steviol libre dans le plasma après administration *per os*. Le steviol est immédiatement pris en charge par le foie qui procède à sa glucuroconjugaison permettant son élimination dans les urines chez l'Homme.

Le rebaudioside A pourrait être hypoglycémiant chez le Rat à fortes doses mais ne montre aucun changement significatif sur les chiffres de la pression artérielle.

Le rebaudioside A n'est ni hypoglycémiant, ni hypotenseur chez des diabétiques ainsi que des patients sains.

Les tests de mutagenèse et de tératogénèse démontrent l'absence de lésions induites par le rebaudioside A.

Ces différentes études ont permis aux autorités sanitaires de conclure à l'innocuité du rebaudioside A. C'est pourquoi, nous allons voir la réglementation dans les pays occidentaux.

4. Réglementation

En 1994, aux États-Unis, la Food and Drug Administration (FDA), qui a pour mission de prendre les décisions concernant la mise sur le marché des additifs alimentaires dont les édulcorants, a autorisé la commercialisation d'extraits de stevia en tant que complément alimentaire. Cependant, la plante n'avait pas encore le statut d'édulcorant [11].

Dans le même temps, en Europe, en 1999, l'European Food Safety Authority (EFSA) qui procède à des évaluations de sécurité des nouveaux additifs alimentaires avant qu'ils ne puissent être autorisés pour une utilisation dans l'union européenne, émet un avis défavorable sur la mise sur le marché de la stevia et de ses dérivés comme « aliment ou ingrédient alimentaire » [7]. Par la suite de multiples requêtes ont été déposées demandant à la commission européenne une réévaluation.

Plus tard, en 2004, lors du 63ème meeting tenu par le Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives (JECFA), comité mixte constitué d'experts issus de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), celui-ci émet des recommandations et des avis sur la sécurité des additifs alimentaires et réétudie la question concernant *Stevia rebaudiana* [48]. Au vu des nouvelles données, le comité décide d'attribuer aux glycosides de steviol, une dose journalière admissible (DJA) provisoire de 2mg/kg de poids corporel, exprimés en équivalent de steviol. Cette valeur est fixée grâce aux études de toxicité chronique menées sur des rats.

Cependant, afin de pouvoir fixer une dose journalière admissible définitive, il faut prouver l'absence d'effets pharmacologiques à des doses représentatives d'une éventuelle « exposition alimentaire », complétée par des études chez l'Homme.

Pendant ce temps, en France, en août 2006 [54], l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), est saisie par la Direction Générale de la Concurrence de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), concernant une demande d'avis quant à une autorisation provisoire, pour une durée de deux ans, d'emploi du steviol, un métabolite secondaire de *Stevia rebaudiana*, en tant qu'édulcorant en alimentation humaine. Considérant qu'il manque des

preuves concernant l'absence d'effets pharmacologiques du stevioside, l'AFSSA rend un avis défavorable estimant que la preuve de l'innocuité pour le consommateur de l'emploi des glycosides de steviol en tant qu'édulcorant n'a pas été apportée.

Lors du 68ème meeting du JECFA en 2007 [48], le comité a décidé de doubler la DJA temporaire à la vue des résultats des études toxicologiques et cliniques en cours, et en particulier les études relatives aux effets pharmacologiques. La DJA adoptée est de 4 mg/kg de poids corporel exprimés en équivalent steviol.

Tout comme de nombreux pays, c'est le 68ème meeting du JECFA qui va « déverrouiller » le statut des glycosides de steviol en France. En effet, l'AFSSA conclut dans un avis en date du 11 septembre 2008 [96] que le rebaudioside A, extrait de *Stevia rebaudiana* de pureté supérieure à 97%, ne présente pas de risque pour le consommateur sous réserve d'études supplémentaires concernant sa stabilité, ses conditions d'utilisation et ses doses d'emploi. Aucune dose journalière concernant le rebaudioside A n'a été établie dans la mesure où les seules données nouvelles auxquelles l'AFSSA a eu l'accès sont des publications sans les données brutes de ces études.

En Décembre 2008, aux États-Unis, la FDA reconnaît deux glycosides de steviol comme étant Generally Recognized As Safe (GRAS), ou généralement reconnu inoffensif, il s'agit du rebaudioside A et du stevioside. Un aliment est reconnu « GRAS » lorsqu'il a été utilisé pendant une période assez longue et/ou qu'un nombre suffisant d'études scientifiques ont prouvé son innocuité [11]. Cette autorisation permet au rebaudioside A ainsi qu'au stevioside d'être intégrés à des boissons et à des préparations alimentaires commercialisées dans ce pays s'ils sont purifiés à 95% [97].

Selon l'arrêté ministériel du 26 août 2009 [98] (annexe 1), le rebaudioside A purifié à 97% est autorisé en France en tant qu'additif susceptible de figurer dans la composition de denrées alimentaires. Le 8 janvier 2010, le ministère de l'économie, de l'industrie et de l'emploi publie un nouvel arrêté [52] (annexe 2) qui modifie celui du 26 août 2009 [98], suite à l'avis de l'AFSSA en date du 11 décembre 2009 [99]. L'un des points essentiels de cette modification est l'autorisation du rebaudioside A en tant qu'édulcorant de table. La France est le premier pays européen à autoriser de façon officielle le rebaudioside A en tant qu'édulcorant. Le dernier arrêté du 6 septembre 2011 [100] (annexe 3) modifiant l'arrêté du 26 août 2009 [98] mentionne des doses maximales d'emploi exprimées en rebaudioside A, diminuées par rapport aux arrêtés précédents.

Depuis novembre 2011, les glycosides de steviol cités ci-dessus sont autorisés comme édulcorants (E960) au niveau européen selon le règlement N°1131/2011 paru dans le journal officiel de l'Union européenne [53] et ont été réévalué

dernièrement [101]. La commercialisation de la plante *Stevia rebaudiana* en tant que denrée alimentaire n'est pas autorisée en Europe. Elle peut être vendue comme plante d'ornement ou comme matière première aux professionnels pour fabriquer la substance qui en est extraite [102].

On constate que les promoteurs de *Stevia rebaudiana* confondent la plante et les molécules qui en sont extraites, en utilisant les éléments concernant les extraits pour défendre la plante et *vice versa*. Or, les conclusions applicables à l'un ne sont pas automatiquement applicables à l'autre car ces deux produits sont bien différents et relèvent de réglementations spécifiques [102].

Longtemps, en effet, les états européens ainsi que l'état français se sont opposés à l'arrivée de la stevia en raison de doutes quant à son innocuité, c'est pourquoi il était intéressant de s'interroger sur la plante ainsi que sur les édulcorants à base de rebaudioside A issu de la stevia délivrables en pharmacie.

5. Conclusion : conduite à tenir face à une demande spontanée sur l'utilisation des feuilles de stevia et du rebaudioside A comme édulcorant

Afin de disposer de réponses utiles à l'officine, nous avons souhaité dans un dernier chapitre, utiliser l'ensemble de ces données pharmacologiques, cliniques et toxicologiques réalisées sur la poudre de feuille de stevia, différents extraits à base de stevia, le rebaudioside A et le steviol pour répondre aux questions concrètes des patients ou pour les conseiller judicieusement.

À l'officine, face à une interrogation spontanée sur la consommation chronique de feuilles de stevia, nous devons mettre en garde la personne sur le fait que la plante ne peut être utilisée en France que pour un usage ornemental. Cela est due aux études scientifiques menées sur la plante qui montrent des activités pharmacologiques. Le manque d'informations sur la toxicité renforce le fait qu'il est impossible de proposer la feuille de stevia comme édulcorant à des patients. Il est nécessaire d'orienter le patient vers la consommation d'édulcorants autorisés (extraits enrichis en rebaudioside A purifiés à 97%). Il n'est pas nécessaire d'alarmer le patient ayant une consommation très occasionnelle et non chronique de feuilles de stevia dans la mesure où aucune toxicité aiguë n'est rapportée.

Face à la demande de consommation de spécialités à base de rebaudioside A, il est nécessaire de connaître à quelle fin la personne veut l'utiliser. À savoir, si la personne souhaite un apport équilibré de glucides simples pour contrôler ses apports caloriques dans le cadre d'un régime ou non. Les diabétiques pourraient utiliser les édulcorants à base de rebaudioside A afin de limiter leurs apports en sucres simples, notamment lors de collations et afin d'éviter d'augmenter le pic de glycémie post-prandial, en concertation avec leur diététicien et/ou médecin. Par contre, le fait d'avoir recours à un édulcorant favorise le goût sucré recherché et ne déshabitue pas la personne à manger moins sucré.

Une précaution d'emploi envisageable est de déconseiller la consommation de rebaudioside A aux personnes allergiques aux astéracées, même si le rebaudioside A est un produit très purifié.

Aucune contre-indication, ni d'interaction médicamenteuse n'est à prévoir avec cet édulcorant. Les études de tératogenèse sont favorables pour le rebaudioside A, mais elles sont négatives concernant le steviol. Par mesure de précaution, les femmes enceintes et allaitantes ne devraient pas consommer de rebaudioside A.

Il est préférable aussi d'alerter les patients sur le fait que nous n'avons pas de données sur les doses toxiques ainsi que sur la toxicité chronique du rebaudioside A. Une consommation en grande quantité ou sur le très long court est à éviter actuellement.

C'est pourquoi pour récapituler, vous trouverez sur la page suivante toutes les informations importantes concernant *Stevia rebaudiana* et le rebaudioside A.



Stevia

Noms communs : stevia, herbe sucrée du Paraguay

Noms botaniques : *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Eupatorium rebaudianum* Bertoni

Famille : Astéracées

Partie utilisée : Feuilles

Localisation : originaire de la vallée du Rio Monday dans le Nord-Est du Paraguay, cultivée aussi au Brésil, en Uruguay, en Chine, en Corée, en Thaïlande, en Israël et au Japon

Usage traditionnel au Paraguay : édulcorant du maté, hypoglycémiant

Métabolites secondaires : diterpènes glycosylés : glycosides de steviol (génine) : stevioside ($\approx 10\%$) et rebaudioside A ($\approx 4\%$)

Législation :

- Aux États-unis : 1994 : la FDA autorise la commercialisation d'extraits de stevia en tant que complément alimentaire

2007 : DJA= 4 mg/kg de poids corporel exprimés en équivalent steviol

2008 : la FDA reconnaît le rebaudioside A et le stevioside comme GRAS (Generally Recognized As Safe)

- En Europe : 2011 : le stevioside et le rebaudioside A autorisés comme édulcorants (E960)

- En France : 2009 : le rebaudioside A purifié à 97% est autorisé comme additif dans les denrées alimentaires

2010 : le rebaudioside A autorisé en tant qu'édulcorant de table

Essais Pharmacologiques :

- Stevia rebaudiana : extrait aqueux hypoglycémiant chez des rats diabétiques, hypotenseur chez des rats normo- et hypertendus et possible action sur la fertilité
- Rebaudioside A : résultats controversés concernant un rôle hypoglycémiant, pas d'effet hypotenseur
- Steviol : inhibition de l'absorption du glucose au niveau du jéjunum de hamster, pas d'effet hypotenseur lors d'une injection intraveineuse, possible hypotension à fortes doses en infusion

Essais cliniques :

- Stevia rebaudiana : extrait aqueux hypoglycémiant et hypotenseur chez l'Homme sain
- Rebaudioside A : pas d'activité hypoglycémiant, ni hypotensive chez des patients diabétiques et sains
- Steviol : Néant

Essais toxicologiques :

- Stevia rebaudiana : Cornet assay négatif
- Rebaudioside A : 4 tests génétiques négatifs, une étude sur la tératogénèse négative
- Steviol : 4 tests génétiques négatifs, 3 tests génétiques positifs dont un à fortes doses et les autres sont peut être dus à des impuretés ou à d'autres métabolites. Tératogène à fortes doses chez les femelles hamsters

Produits commercialisés et autorisés : poudre, comprimés, morceaux contenant du rebaudioside A purifié à 97%

Conclusion : la plante ne peut pas être consommée, elle ne sert qu'à un usage ornemental. Sont autorisés en France comme édulcorants, les glycosides de steviol comprenant le stevioside et le rebaudioside A. Le rebaudioside A est utilisé car son pouvoir sucrant est supérieur à celui du stevioside.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Photos

Photo 1: Plant de *Stevia rebaudiana*

Photo 2: *Stevia rebaudiana*

Figures

Figure 1: Carte situant la zone géographique d'où est originaire *Stevia rebaudiana*

Figure 2: Structure du steviol

Figure 3: Tableau des principaux glycosides de steviol

Figure 4: Localisation de la biosynthèse des glycosides de steviol

Figure 5: Voie de synthèse des glycosides de steviol

Figure 6: Structure du rebaudioside A

Figure 7: Schéma d'extraction et de purification du rébaudioside A

Figure 8: Métabolisme du rebaudioside A chez l'Homme et chez le Rat

Tableaux

Tableau 1: Liste des spécialités à base de rebaudioside A délivrés par les grossistes répartiteurs

Tableau 2: Récapitulatif des propriétés physiques du rebaudioside A

Tableau 3: Tableau récapitulatif des tests génétiques effectués sur le steviol et le rebaudioside A

Annexes

Annexe 1: Arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rebaudioside A, extrait de *Stevia rebaudiana* comme additif alimentaire.

Annexe 2: Arrêté du 8 janvier 2010 modifiant l'arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rebaudioside A extrait de *Stevia rebaudiana* comme additif alimentaire.

Annexe 3: Arrêté du 6 septembre 2011 modifiant l'arrêté du 26 août 2009 modifié relatif à l'emploi du rebaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) comme additif alimentaire.

Décrets, arrêtés, circulaires

TEXTES GÉNÉRAUX

MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE, DE L'INDUSTRIE ET DE L'EMPLOI

**Arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rébaudioside A
(extrait de *Stevia rebaudiana*) comme additif alimentaire**

NOR : ECEC0907816A

La ministre de la santé et des sports, le ministre de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche, le ministre auprès de la ministre de l'économie, de l'industrie et de l'emploi, chargé de l'industrie, et le secrétaire d'Etat chargé du commerce, de l'artisanat, des petites et moyennes entreprises, du tourisme, des services et de la consommation,

Vu le règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires ;

Vu la directive 89/107/CEE du Conseil du 21 décembre 1988 modifiée relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine, notamment son article 5 ;

Vu le décret n° 89-674 du 18 septembre 1989 modifié relatif aux additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine ;

Vu l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 19 juin 2009,

Arrêtent :

Art. 1^{er}. – Le rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) répondant aux dispositions fixées en annexe I peut être employé en tant qu'additif alimentaire (édulcorant), dans les conditions fixées en annexe II jusqu'à la date d'entrée en vigueur de la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires prévue à l'annexe II du règlement du 16 décembre 2008 susvisé et au maximum pendant une durée de deux ans.

Art. 2. – La directrice générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, la directrice générale de l'alimentation, le directeur général de la santé et le directeur général de la compétitivité, de l'industrie et des services sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 26 août 2009.

*Le ministre auprès de la ministre de l'économie,
de l'industrie et de l'emploi,
chargé de l'industrie,*

Pour le ministre et par délégation :

*La directrice générale adjointe,
C. GRAS*

La ministre de la santé et des sports,

Pour la ministre et par délégation :

Par empêchement

du directeur général de la santé :

*La sous-directrice de la prévention
des risques liés à l'environnement
et à l'alimentation,*

J. BOUDOT

*Le ministre de l'alimentation,
de l'agriculture et de la pêche,*
Pour le ministre et par délégation :

*La directrice générale,
P. BRIAND*

*Le secrétaire d'Etat
chargé du commerce, de l'artisanat,
des petites et moyennes entreprises,
du tourisme, des services et de la consommation,*
Pour le secrétaire d'Etat et par délégation :
*La directrice générale de la concurrence,
de la consommation
et de la répression des fraudes,*
N. HOMOBONO

ANNEXE I

Les spécifications et critères de pureté du rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) doivent répondre aux dispositions suivantes :

Dénomination chimique

13-[(2-O-β-D-glucopyranosyl-3-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy] kaur-16-en-18-oic acid β-D-glucopyranosyl ester.

N° CAS

58543-16-1.

Formules chimiques

C44H70O23.

Masse moléculaire relative

967.03.

Composition

Le produit ne contient pas moins de 97 % de rébaudioside A exprimés sur la base anhydre.
Poudre blanche avec une odeur caractéristique ayant une saveur sucrée. Le pouvoir sucrant est d'environ 300 fois supérieur à celui du saccharose.

Solubilité

Soluble dans l'eau et l'éthanol.

Perte lors du séchage

Pas plus de 6 % (105 °C, 4 heures).

Cendres sulfatées

Pas plus de 1 %, sur la base de la matière sèche.

pH

Entre 4,5 et 7 (solution 1/125).

Arsenic

Pas plus de 1 mg/kg sur la base de la matière sèche.

Plomb

Pas plus de 1 mg/kg sur la base de la matière sèche.

Métaux lourds

Pas plus de 10 mg/kg, exprimés en plomb, sur la base de la matière sèche.

Solvants

Pas plus de 200 mg/kg d'éthanol, pas plus de 10 mg/kg de méthanol sur la base de la matière sèche.

ANNEXE II

DENRÉES ALIMENTAIRES	DOSES MAXIMALES D'EMPLOI (exprimées en rébaudioside A)
Boissons non alcoolisées	
- boissons aromatisées à base d'eau à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	420 mg/l
- boissons à base de lait et produits dérivés ou de jus de fruits à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	420 mg/l
Desserts et produits similaires	
- desserts aromatisés à base d'eau à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	600 mg/kg
- préparations à base de lait et produits dérivés, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	600 mg/kg
- desserts à base de fruits et légumes, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	600 mg/kg
- desserts à base d'œuf à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	600 mg/kg
- desserts à base de céréales, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	600 mg/kg
- desserts à base de matières grasses, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	600 mg/kg
- glaces de consommation, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	540 mg/kg
Confiseries	
- confiseries sans sucres ajoutés	600 mg/kg
- micro-confiserie pour rafraîchir l'haleine sans sucres ajoutés	1 050 mg/kg
- pastille rafraîchissante forte aromatisée pour la gorge sans sucres ajoutés	1 260 mg/kg
- confiseries à base de cacao ou de fruits secs à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	1 260 mg/kg
- confiseries à base d'amidon à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	1 260 mg/kg
- pâtes à tartiner à base de cacao, de lait, de fruits secs ou de graisses, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	600 mg/kg
- gommes à mâcher sans sucres ajoutés	4 200 mg/kg
Autres produits	
- cidre et poiré	420 mg/l
- bières sans alcool ou ayant une teneur en alcool ne dépassant pas 1,2 %	420 mg/l
- « Bière de table/Tafelbier/Table Beer » (contenant moins de 6 % de moût primitif) sauf « Obergäriges Einfachbier »	420 mg/l
- bières ayant une acidité minimale de 30 mill-équivalents exprimée en NaOH	420 mg/l
- bières brunes de type <i>oud bruin</i>	420 mg/l
- bière à valeur énergétique réduite	150 mg/l
- boissons constituées d'un mélange de bière, de cidre, de poiré, de spiritueux ou de vin et de boissons non alcoolisées	420 mg/l
- boissons spiritueuses avec une teneur en alcool de moins de 15 % en volume	420 mg/l
- fruits en boîte ou en bocal, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	600 mg/kg
- préparations de fruits et légumes à valeur énergétique réduite	600 mg/kg
- conserves de fruits et légumes aigres-douces	600 mg/kg
- conserves et semi-conserves aigres-douces de poissons et marinades de poissons, crustacés et mollusques	600 mg/kg
- <i>Feinkostsalat</i>	600 mg/kg
- moutarde	600 mg/kg
- préparations complètes de régime contre la prise de poids destinées à remplacer un repas ou le régime alimentaire d'une journée	600 mg/kg
- préparations complètes et apports nutritionnels à prendre sous surveillance médicale	600 mg/kg
- compléments alimentaires liquides	450 mg/kg
- compléments alimentaires solides	1 440 mg/kg
- compléments alimentaires à base de vitamines et/ou éléments minéraux sous forme de sirop ou à mâcher	3 750 mg/kg

Décrets, arrêtés, circulaires

TEXTES GÉNÉRAUX

MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE, DE L'INDUSTRIE ET DE L'EMPLOI

Arrêté du 8 janvier 2010 modifiant l'arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) comme additif alimentaire

NOR : ECEC0929660A

La ministre de la santé et des sports, le ministre de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche, le ministre auprès de la ministre de l'économie, de l'industrie et de l'emploi, chargé de l'industrie, et le secrétaire d'Etat chargé du commerce, de l'artisanat, des petites et moyennes entreprises, du tourisme, des services et de la consommation,

Vu le règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires ;

Vu la directive 89/107/CEE du Conseil du 21 décembre 1988 modifiée relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine, notamment son article 5 ;

Vu le décret n° 89-674 du 18 septembre 1989 modifié relatif aux additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine ;

Vu l'arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) comme additif alimentaire ;

Vu l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 11 décembre 2009,

Arrêtent :

Art. 1^{er}. – Les annexes de l'arrêté du 26 août 2009 susvisé sont modifiées conformément aux dispositions de l'annexe du présent arrêté.

Art. 2. – La directrice générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, la directrice générale de l'alimentation, le directeur général de la santé et le directeur général de la compétitivité, de l'industrie et des services sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 8 janvier 2010.

*Le ministre auprès de la ministre de l'économie,
de l'industrie et de l'emploi,
chargé de l'industrie,*

Pour le ministre et par délégation :

*Le directeur général
de la compétitivité,
de l'industrie et des services,*

L. ROUSSEAU

La ministre de la santé et des sports,

Pour la ministre et par délégation :

*La sous-directrice
de la prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation,*

J. BOUDOT

*Le ministre de l'alimentation,
de l'agriculture et de la pêche,
Pour le ministre et par délégation :*

*La directrice générale
de l'alimentation,*

P. BRIAND

*Le secrétaire d'Etat
chargé du commerce, de l'artisanat,
des petites et moyennes entreprises,
du tourisme, des services et de la consommation,*

Pour le secrétaire d'Etat et par délégation :

*La directrice générale
de la concurrence, de la consommation
et de la répression des fraudes,*

N. HOMOBONO

ANNEXE

1° Les dispositions relatives à la solubilité et aux solvants de l'annexe I de l'arrêté du 26 août 2009 susvisé sont remplacées par les dispositions suivantes :

Solubilité : soluble dans l'eau.

Solvants : pas plus de 5 000 mg/kg d'éthanol, pas plus de 200 mg/kg de méthanol sur la base de la matière sèche.

2° A l'annexe II de l'arrêté du 26 août 2009 susvisé, le tableau est remplacé par le tableau suivant :

DENRÉES ALIMENTAIRES	DOSES MAXIMALES D'EMPLOI (exprimées en rébaudioside A)
<p>Boissons non alcoolisées</p> <p>- boissons aromatisées à base d'eau à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - boissons à base de lait et produits dérivés ou de jus de fruits à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté .</p>	<p>600 mg/l 600 mg/l</p>
<p>Desserts et produits similaires</p> <p>- desserts aromatisé à base d'eau à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - préparations à base de lait et produits dérivés, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - desserts à base de fruits et légumes, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - desserts à base d'œuf à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - desserts à base de céréales, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - desserts à base de matières grasses, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - glaces de consommation, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté</p>	<p>1 000 mg/kg 1 000 mg/kg 1 000 mg/kg 1 000 mg/kg 1 000 mg/kg 1 000 mg/kg 800 mg/kg</p>
<p>Confiseries</p> <p>- confiseries sans sucres ajoutés - micro-confiserie pour rafraîchir l'haleine sans sucres ajoutés - pastille rafraîchissante forte aromatisée pour la gorge sans sucres ajoutés - confiseries à base de cacao ou de fruits secs à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - confiseries à base d'amidon à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - pâtes à tartiner à base de cacao, de lait, de fruits secs ou de graisses, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté - gommes à mâcher sans sucres ajoutés</p>	<p>1 000 mg/kg 10 000 mg/kg 2 000 mg/kg 2 000 mg/kg 2 000 mg/kg 5 500 mg/kg</p>
<p>Autres produits</p> <p>Cidre et poiré : - bières sans alcool ou ayant une teneur en alcool ne dépassant pas 1,2 % - « Bière de table/Tafelbier/Table Beer » (contenant moins de 6 % de moût primitif) sauf « Obergäriges Einfachbier » - bières ayant une acidité minimale de 30 mill-équivalents exprimée en NaOH - bières brunes de type <i>oud bruin</i> - bière à valeur énergétique réduite - boissons constituées d'un mélange de bière, de cidre, de poiré, de spiritueux ou de vin et de boissons non alcoolisées - boissons spiritueuses avec une teneur en alcool de moins de 15 % en volume - fruits en boîte ou en bocal, à valeur énergétique réduite ou sans sucre ajouté - préparations de fruits et légumes à valeur énergétique réduite - conserves de fruits et légumes aigres douces - conserves et semi-conserves aigres douces de poissons et marinades de poissons, crustacés et mollusques - <i>Feinkostsalat</i> - moutarde - denrées alimentaires destinées à être utilisées dans les régimes hypocaloriques destinés à la perte de poids au sens de l'arrêté du 20 juillet 1977 susvisé - aliments de régime destinés à des fins médicales spéciales au sens de l'arrêté du 20 septembre 2000 susvisé - compléments alimentaires liquides - compléments alimentaires solides - compléments alimentaires à base de vitamines et/ou éléments minéraux sous forme de sirop, ou à mâcher - édulcorants de table</p>	<p>600 mg/l 600 mg/l 600 mg/l 600 mg/l 600 mg/l 600 mg/l 600 mg/l 600 mg/l 1 000 mg/kg 1 000 mg/kg 600 mg/kg 600 mg/l 350 mg/kg 350 mg/kg 800 mg/kg 1 000 mg/kg 600 mg/kg 2 000 mg/kg 5 500 mg/kg Bonnes pratiques de fabrication</p>

Décrets, arrêtés, circulaires

TEXTES GÉNÉRAUX

MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE, DES FINANCES ET DE L'INDUSTRIE

Arrêté du 6 septembre 2011 modifiant l'arrêté du 26 août 2009 modifié
relatif à l'emploi du rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) comme additif alimentaire

NOR: EFIC1121736A

Le ministre du travail, de l'emploi et de la santé, le ministre de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire, le ministre auprès du ministre de l'économie, des finances et de l'industrie, chargé de l'industrie, de l'énergie et de l'économie numérique, la secrétaire d'Etat auprès du ministre du travail, de l'emploi et de la santé, chargée de la santé, et le secrétaire d'Etat chargé du commerce, de l'artisanat, des petites et moyennes entreprises, du tourisme, des services, des professions libérales et de la consommation,

Vu le règlement n° 1333/2008 modifié du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires ;

Vu le décret n° 2011-949 du 10 août 2011 modifiant le code de la consommation en ce qui concerne les additifs, les enzymes et les arômes destinés à l'alimentation humaine ;

Vu l'arrêté du 26 août 2009 modifié relatif à l'emploi du rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) comme additif alimentaire ;

Vu l'avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail en date du 18 juillet 2011,

Arrêtent :

Art. 1^{er}. – L'article 1^{er} de l'arrêté du 26 août 2009 susvisé est remplacé par les dispositions suivantes :

« Art. 1^{er}. – Le rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) répondant aux dispositions fixées en annexe I peut être employé en tant qu'additif alimentaire (édulcorant) dans les conditions fixées en annexe II du présent arrêté jusqu'à l'entrée en vigueur du règlement relatif aux glycosides de stéviol modifiant la liste communautaire d'additifs prévue à l'annexe II mentionnée à l'article 4 du règlement du 16 décembre 2008 susvisé. »

Art. 2. – 1° L'annexe II de l'arrêté du 26 août 2009 susvisé est modifiée conformément aux dispositions de l'annexe du présent arrêté ;

2° Les denrées alimentaires contenant le rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*), mises sur le marché ou étiquetées conformément aux dispositions des articles R. 112-1 à R. 112-31 du code de la consommation avant le 7 septembre 2011 et qui ne sont pas conformes à l'annexe du présent arrêté, peuvent être commercialisées jusqu'à leur date de durabilité minimale ou leur date limite de consommation.

Art. 3. – La directrice générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, la directrice générale de l'alimentation, le directeur général de la santé et le directeur général de la compétitivité, de l'industrie et des services sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait le 6 septembre 2011.

Le ministre auprès du ministre de l'économie,
des finances et de l'industrie,
chargé de l'industrie,
de l'énergie et de l'économie numérique,
Pour le ministre et par délégation :
Le chef du service industrie,
Y. ROBIN

*Le ministre du travail,
de l'emploi et de la santé,*
Pour le ministre et par délégation :
*Le directeur général
de la santé,*
J.-Y. GRALL

*La secrétaire d'Etat
auprès du ministre du travail,
de l'emploi et de la santé,
chargée de la santé,*
Pour la secrétaire d'Etat
et par délégation :
*Le directeur général
de la santé,*
J.-Y. GRALL

*Le ministre de l'agriculture, de l'alimentation,
de la pêche, de la ruralité
et de l'aménagement du territoire,*
Pour le ministre et par délégation :
*La directrice générale
de l'alimentation,*
P. BRIAND

*Le secrétaire d'Etat
auprès du ministre de l'économie,
des finances et de l'industrie,
chargé du commerce, de l'artisanat,
des petites et moyennes entreprises,
du tourisme, des services,
des professions libérales et de la consommation,*
Pour le secrétaire d'Etat et par délégation :
Par empêchement de la directrice générale
de la concurrence, de la consommation
et de la répression des fraudes :
Le chef de service,
S. MARTIN

ANNEXE

DENRÉES ALIMENTAIRES	DOSES MAXIMALES D'EMPLOI (exprimées en rébaudioside A)
<i>Boissons non alcoolisées</i>	
Boissons aromatisées à base d'eau à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	240 mg/l
Boissons à base de lait et produits dérivés ou de jus de fruits à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	240 mg/l
Nectars de fruits au sens du décret n° 2003-838 du 1 ^{er} septembre 2003 relatif aux jus de fruits et à certains produits similaires, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	300 mg/l
<i>Desserts et produits similaires</i>	
Desserts aromatisés à base d'eau à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	300 mg/kg
Préparations à base de lait et produits dérivés, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	300 mg/kg
Desserts à base de fruits et légumes, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	300 mg/kg
Desserts à base d'œuf à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	300 mg/kg
Desserts à base de céréales, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	300 mg/kg
Desserts à base de matières grasses, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	300 mg/kg
Glaces de consommation, à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	610 mg/kg
<i>Confiseries</i>	
Confiseries sans sucres ajoutés	1 000 mg/kg
Micro-confiserie pour rafraîchir l'haleine sans sucres ajoutés	6 060 mg/kg
Pastille rafraîchissante forte aromatisée pour la gorge sans sucres ajoutés	2 000 mg/kg
Confiseries à base de cacao ou de fruits secs à valeur énergétique réduite, ou sans sucre ajouté	820 mg/kg
Gommes à mâcher sans sucres ajoutés	5 500 mg/kg

DENRÉES ALIMENTAIRES	DOSES MAXIMALES D'EMPLOI (exprimées en rébaudioside A)
<i>Autres produits</i>	
Bières sans alcool ou ayant une teneur en alcool ne dépassant pas 1,2 %	210 mg/l
« Bière de table/Tafelbier/Table Beer » (contenant moins de 6 % de moût primitif) sauf « Obergäriges Einfachbier »	210 mg/l
Bières ayant une acidité minimale de 30 milli-équivalents exprimée en NaOH	210 mg/l
Bières brunes de type oud bruin	210 mg/l
Boissons constituées d'un mélange de bière, de cidre, de poiré, de spiritueux ou de vin et de boissons non alcoolisées	450 mg/l
Boissons spiritueuses avec une teneur en alcool de moins de 15 % en volume	450 mg/l
Préparations de fruits et légumes à valeur énergétique réduite	610 mg/kg
Conserves de fruits et légumes aigres douces	300 mg/kg
Conserves et semi-conserves aigres douces de poissons et marinades de poissons, crustacés et mollusques	600 mg/kg
Denrées alimentaires destinées à être utilisées dans les régimes hypocaloriques destinés à la perte de poids au sens de l'arrêté du 20 juillet 1977 en application du décret du 29 août 1991 sur les produits diététiques et de régime	800 mg/kg
Aliments de régime destinés à des fins médicales spéciales au sens de l'arrêté du 20 septembre 2000 relatif aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales	1 000 mg/kg
Compléments alimentaires liquides au sens du décret du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires	600 mg/kg
Compléments alimentaires solides au sens du décret du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires	2 000 mg/kg
Compléments alimentaires à base de vitamines et/ou éléments minéraux sous forme de sirop ou à mâcher au sens du décret du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires	5 450 mg/kg
Edulcorants de table	<i>Quantum satis</i>

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EFSA. Endorsed for public consultation draft scientific opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. 2013. 245p. [En ligne] Disponible sur <http://www.sante.gouv.fr/les-travaux-d-expertise-menes-sur-l-aspartame.html>. Consulté le 08/04/2012.
- [2] HILGER, H.H. et COLE, T.C.H. Angiosperm Phylogeny Flowering Plant Systematics. [En ligne] Disponible sur <http://www2.biologie.fu-berlin.de/sysbot/poster/poster1.pdf>. Consulté le 19/01/2013.
- [3] GAUSSEN, H., LEROY, J-F. et OZENDA, P. Précis de botanique. 2- Végétaux supérieurs. 2^{ème} édition. Editions Masson. Paris. 1982. p.307-308.
- [4] GUIGNARD, J-L. Systématique moléculaire. Abrégé de botanique. 14^{ème} édition. Editions Masson. Paris. 2007. 285p.
- [5] LAZARIN, A. et COUPLAN, F. Stevia le sucre vertueux. Edition Sang de la Terre. Paris. 2009. 95 p.
- [6] YADAV, A.K., SINGH, S., DHYANI, D. et AHUJA, P.S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. Canadian Journal of Plant Sciences. 2011. 91, 1-27.
- [7] European Commission. Opinion on *Stevia rebaudiana* plants and leaves CS/NF/STEV/3 Final. 1999. 5p. [En ligne] Disponible sur <http://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/stevioside.pdf>. Consulté le 08/04/2012.
- [8] BRUNETON, J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Éditions Tec&Doc. Paris. 2008. p.653.
- [9] Le portail de l'économie, des finances et de l'industrie. DGCCRF. Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes. Un nouvel additif alimentaire autorisé en France. [En ligne] Disponible sur <http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Un-nouvel-additif-alimentaire-autorise-en-France>. Consulté le 26/02/2012.
- [10] Agriculture.gouv.fr. Découverte/ le goût du sucre sans le sucre: franc succès pour la «Stevia». [En ligne] Disponible sur <http://agriculture.gouv.fr/decouverte-le-gout-du-sucre-sans>. Consulté le 10/06/12.

- [11] FDA. U.S. Food and Drug Administration. [En ligne] Disponible sur <http://www.fda.gov/food/dietarysupplements/default.html>. Consulté le 02/06/12.
- [12] PATEL, R.M. et SHAH, R.R. Regeneration of Stevia Plant Through Callus Culture. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009. 71, 46-50.
- [13] BRANDLE, J.E., STARATT, A.N. et GUZEN, M. Stevia rebaudiana: It's agricultural, biological and chemicals properties. Canadian Journal of Plant Science. 1998. 78, 527-536.
- [14] Maps of world.com. [En ligne] Disponible sur <http://fr.mapsofworld.com/world-maps/world-map-with-latitude-and-longitude.html>. Consulté le 13/01/13.
- [15] DYRSKOG, S.E., JEPPESEN, P.B., CHEN, J. *et al.* The diterpene glycoside, rebaudioside A, does not improve glycemic control or affect blood pressure after eight weeks treatment in the Goto-Kakizaki rat. The Review of Diabetic Studies. 2005. 2, 84-91.
- [16] WÖLWER-RIECK, U. The leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012. 60, 886-895.
- [17] BRAHMACHARI, G., MANDAL, L.C., ROY, R. *et al.* Stevioside and related compounds-Molecules of pharmaceutical promise: a critical overview. Archiv Der Pharmazie. 2011. 344, 5-19.
- [18] JAITAK, V., GUPTA, A.P., KAUL, V.K. et AHUJA, P.S. Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008. 47, 790-794.
- [19] YAMAZAKI, T. et FLORES, H.E. Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of stevia rebaudiana. Journal of Natural Products. 1991. 54, 986-992.
- [20] RICHMAN, A.S., GIJZEN, M., STARATT, A.L. *et al.* Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. The Plant Journal. 1999. 19, 411-421.

- [21] BRANDLE, J.E. et TELMER, P.G. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*. 2007. 68, 1855-1863.
- [22] SHIBATA, H., SAWA, Y., OKA, T. *et al.* Steviol and steviol-glycoside: glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni—purification and partial characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1995. 321, 390-396.
- [23] SHIBATA, H., SONOKE, S., OCHIAI, H. *et al.* Glucosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiology*. 1991. 95, 152-156.
- [24] RICHMAN, A., SWANSON, A., HUMPHREY, T. *et al.* Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*. 2005. 41, 56-67.
- [25] HAÏAT, R., LEROY, G. et SLAMA, G. *Diabète de type 2 et risque cardiovasculaire*. Éditions Frison-Roche. Paris. 2008. 93p.
- [26] BUYSSCHAERT, M. *Diabétologie clinique*. 3ème édition. Éditions De Boeck. Bruxelles. 2006. 164p.
- [27] KUJUR, R.S., VISHAKHA, S., MAHENDRA, R. *et al.* Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*. 2010. 2, 258-263.
- [28] HIMANSHU, M., MANISH, S., NARENDRA, S. *et al.* Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2011. 3, 242-248.
- [29] SHIVANNA, N., NAIKA, M., KHANUM, F. et KAUL, V.K. Antioxydant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2013. 27, 103-113.
- [30] FERREIRA, E.B., DE ASSIS ROCHA NEVES, F, DA COSTA, M. *et al.* Comparative effects of *stevia rebaudiana* leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis. *Planta Medica*. 2006. 72, 691-696.

- [31] CURI, R., ALVAREZ, M., BAZOTTE, R.B. *et al.* A. Effect of stevia rebaudiana on glucose tolerance in normal adult humans. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1986. 19, 771-774.
- [32] BENTOUNES, A. et SAFAR, M. L'hypertension artérielle: pratique clinique. Éditions Elsevier Masson. Paris. 2011. 127p.
- [33] MELIS, M.S. Chronic administration of aqueous extract of Stevia rebaudiana in rats: renal effects. Journal of Ethnopharmacology. 1995. 28, 129-134.
- [34] MELIS, M.S. A crude extract of Stevia rebaudiana increases the renal plasma flow of normal and hypertensive rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1996. 29, 669-675.
- [35] TIRAPELLI, C.R., AMBROSIO, S.R., DE OLIVEIRA, A.M. et TOSTES, R.C. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: A therapeutic promise for the treatment of hypertension. Fitoterapia. 2010. 81, 690-702.
- [36] TOMITA-TOSHIO, S.N., ARAI, T., SHIRAISHI, H. *et al.* Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from Stevia rebaudiana Bertoni towards enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and other foodborne pathogenic bacteria. Microbiology and Immunology. 1997. 41, 1005-1019.
- [37] JAYARAMAN, S., MANOHARAN, M.S. et ILLANCHEZIAN, S. *In-vitro* Antimicrobial and Antitumor Activities of Stevia Rebaudiana (Asteraceae) Leaf Extracts. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2008. 7, 1143-1149.
- [38] TADHANI, M.B. et SUBHASH, R. In Vitro Antimicrobial Activity of Stevia Rebaudiana Bertoni Leaves. Journal of Pharmaceutical Research. 2006. 5, 557-560.
- [39] GAMBOA, F. et CHAVES, M. Antimicrobial potential of extracts from *Stevia rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. Acta Odontologica Latinoamericana : AOL. 2012. 25, 171-175.
- [40] TAKAHASHI, K., MATSUDA, M., OHASHI, K. *et al.* Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. Antiviral Research. 2001. 49, 15-24.

- [41] PLANAS, G.M. et KUCACUTE, J. Contraceptive properties of stevia rebaudiana. *Science*. 1968. 162. 1007.
- [42] MELIS, M.S. Effects of chronic administration of Stevia rebaudiana on fertility in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999. 67, 157-161.
- [43] OLIVEIRA-FILHO, R.M., UEHARA, O.A., MINETTI, C.A. *et al.* Chronic administration of aqueous extract of Stevia rebaudiana (Bert.) Berton in rats: endocrine effects. *General Pharmacology*. 1989. 20, 187-191.
- [44] SHUKLA, S., MEHTA, A., MEHTA, P. *et al.* Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2012. 64, 807-811.
- [45] SHUKLA, S., MEHTA, A. et BAJPAI, V.K. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. *Food and Chemical Toxicology*. 2009. 47, 2338-2343.
- [46] HALENG, J., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J.O. *Et al.* Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*. 2007. 62, 628-638.
- [47] YASUKAWA, K., KITANAKA, S. et SEO, S. Inhibitory effect of stevioside on Tumor promotion by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2002. 25, 1488-1490.
- [48] JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOODS ADDITIVES. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series: 60. 2009. p.183-219. [En ligne] Disponible sur <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v60je01.pdf>. Consulté le 10/04/2012.
- [49] ABDEL-RAHMAN, A., ANYANGWE, N., CARLACCI, L., CASPER, S. *et al.* The safety and regulation of natural products used as foods and food ingredients. *Toxicological Sciences*. 2011. 123, 333-348.
- [50] KLAUDE, M., ERIKSSON, S., NYGREN, J. et AHNSTRÖM, G. The cornet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*. 1996. 363, 89-96.

- [51] SEKIHASHI, K., SAITOH, H., SASAKI, Y.F. Genotoxicity studies of Stevia extract and steviol by the cornet assay. The Journal of Toxicological Sciences. 2002. 27 Suppl 1, 1-8.
- [52] Arrêté du 8 janvier 2010 modifiant l'arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rebaudioside A extrait de Stevia rebaudiana comme additif alimentaire. Journal Officiel de la République Française. 2010. N° 0012, p.808.
- [53] Règlement (UE) N° 1131/2011 de la commission du 11 novembre 2011 modifiant l'annexe II du règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les glycosides de steviol. 2011. 7p.
- [54] Avis de l'AFSSA relatif à une autorisation provisoire, pour une durée de deux ans, d'emploi de steviol, extraits de Stevia rebaudiana, en tant qu'édulcorant en alimentation humaine dans le cadre de l'article 5 de la directive 89/107/CEE. Saisine n° 2006-SA-0231. 2007.
- [55] POIROT, R. Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. Thèse. 2007. 129p. [En ligne] Disponible sur <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000596/>. Consulté le 19/02/2015.
- [56] Greensweet SAS. Demande d'autorisation de première mise sur le marché d'un additif alimentaire édulcorant. Steviol glycosides. Extrait de Stevia rebaudiana Bertoni. 2006. 76p. [En ligne] Disponible sur <http://www.docstoc.com/docs/84468271/R%C3%A9sum%C3%A9-du-dossier---Stevia-Natura>. Consulté le 15/05/2012.
- [57] Food and Agriculture Organization. Steviol glycosides. 5p. [En ligne] Disponible sur <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph1/additive-442.pdf>. Consulté le 19/02/2015.
- [58] MONDACA, R.L., GALVEZ, A.V., BRAVO, L.Z. et HEN, K.A. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry. 2012. 132, 1121-1132.
- [59] LIU, Y., DI, D., BAI, Q., *et al.* Preparative separation and purification of rebaudioside A from steviol glycosides using mixed-mode macroporous adsorption resins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. 59, 9629-9636.

- [60] LI, C., CHEN, Z. et DI, D. Preparative separation and purification of rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* Bertoni crude extracts by mixed bed of macroporus adsorption resins. Food Chemistry. 2012. 132, 268-276.
- [61] PRAKASH, I., DUBOIS, G.E., CLOS, J.F. *et al.* Development of Rebiana, a natural, non-caloric sweetener. Food and chemical toxicology. 2008. 46, S75-82.
- [62] KINGHORN, A. D. The genus stevia. Édition Taylor & Francis. Londres. 2002. 213p.
- [63] RENWICK, A.G. et TARKA, S.M. Microbial hydrolysis of steviol glycosides. Food and Chemical Toxicology. 2008. 46, S70-74.
- [64] GEUNS, J.M.C., AUGUSTIJNS, P., MOLES, R. *et al.* Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. Food and chemical toxicology. 2003. 41, 1599-1607.
- [65] ROBERTS, A. et RENWICK, A.G. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside and steviol in rats. Food and Chemical Toxicology. 2008. 46, S31-39.
- [66] WINGARD, R.E., BROWN, J.P., ENDERLIN, F.E. *et al.* Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. Experientia. 1980. 36, 519-520.
- [67] KOYAMA, E., KITAZAWA, K., OHORI, Y. *et al.* In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. Food and Chemical Toxicology. 2003. 41, 359-374.
- [68] GARDANA, C., SIMONETTI, P., CANZI, E. *et al.* Metabolism of stevioside and rebaudioside A from stevia rebaudiana extracts by human microflora. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003. 51, 6618-6622.
- [69] KOYAMA, E., SAKAI, N., OHORI, Y. *et al.* Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of Stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. Food and Chemical Toxicology. 2003. 41, 875-883.

- [70] CHATSUDTHIPONG, V. et MUANPRASAT, C. Stevioside and related compounds: Therapeutic Benefits Beyond Sweetness. 2009. 121, 41-54.
- [71] WHEELER, A., BOILEAU, A.C., WINKLER, P.C. *et al.* Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. Food and Chemical Toxicology. 2008. 46, 554-60.
- [72] CARAKOSTAS, M.C., CURRY, L.L., BOILEAU, A.C. *et al.* Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. Food and Chemical Toxicology. 2008. 46, S1-10.
- [73] TOSKULKAO, C., SUTHEERAWATANANON, M., WANICHANON, C. *et al.* Effects of stevioside and steviol on intestinal glucose absorption in hamsters. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 1995. 41, 105-113.
- [74] MELIS, M.S., ROCHA, S.T. et AUGUSTO, A. Steviol effect, a glycoside of *Stevia rebaudiana*, on glucose clearances in rats. Brazilian Journal of Biology. 2009. 69, 371-374.
- [75] YAMAMOTO, N.S., KELMER BRACHT, A.M., ISHII, E.L. *et al.* Effect of steviol and its structural analogues on glucose production and oxygen uptake in rat renal tubules. Experientia. 1985. 41, 55-57.
- [76] MELIS, M.S. Effects of steviol on renal function and mean arterial pressure in rats. Phytomedicine. 1997. 3, 349-352.
- [77] EFSA. Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. 2010. 84p. [En ligne] Disponible sur <http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1537.pdf>. Consulté le 11/04/2012.
- [78] BOONKAUWAN, C. et BURODOM, A. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and steviol on colonic epithelial cells. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2013. 93, 3820-3825.
- [79] BOONKAUWAN, C., AO, M., TOSKULKAO, C. et RAO, M.C. Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008. 56, 3777-3784.

- [80] SARAVANAN, R., VENGATASH-BABU, K. et RAMACHANDRAN, V. Effect of Rebaudioside A, a diterpenoid on glucose homeostasis in STZ-induced diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2012. 68, 421-431.
- [81] ABUDULA, R., JEPPESEN, P.B., ROLFSEN, S.E. *et al.* Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2004. 53, 1378-1381.
- [82] ABUDULA, R., MATCHKOV, W., JEPPESEN, P.B. *et al.* Rebaudioside A stimulates insulin secretion from pancreatic beta cells: a glucose-dependent action via inhibition of ATP-sensitive K channels. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 2008. 10, 1074-1085.
- [83] MAKI, K.C., CURRY, L.L., REEVES, M.S. *et al.* Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*. 2008. 46, suppl 7, S47-53.
- [84] MAKI, K.C., CURY, L.L., MCKENNEY, J.M. *et al.* Glycemic and blood pressure responses to acute doses of rebaudioside A, a steviol glycoside, in subjects with normal glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009. 23, 351-356.
- [85] MAKI, K.C., CURY, L.L., CARAKOSTAS, M.C. *et al.* The hemodynamic effects of rebaudioside A in healthy adults with normal and low-normal blood pressure. *Food and Chemical Toxicology*. 2008. 46 suppl 7, S40-46.
- [86] ONAKPOYA, I.J. et HENEGHAN, C.J. Effect of the natural sweetener, steviol glycoside, on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2014.
- [87] CURRY, L.L. et ROBERTS, A. Subchronic toxicity of rebaudioside A. *Food and Chemical Toxicology*. 2008. 46 Suppl 7, S11-20.
- [88] NIKIFOROV, A.I. et EAPEN, A.K. A 90-day oral (dietary) toxicity study of rebaudioside A in Sprague-Dawley rats. *International Journal of Toxicology*. 2008. 27, 65-80.

- [89] MORTELMANS, K. et ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*. 2000. 455, 29-60.
- [90] WILLIAMS, L.D. et BURDOCK, G.A. Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food and Chemical Toxicology*. 2009. 47, 1831-1836.
- [91] MATSUI, M., MATSUI, K., KAWASAKI, Y. *et al.* Evaluation of genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis*. 1996. 11, 573-579.
- [92] CURRY, L.L., ROBERTS, A. et BROWN, N. Rebaudioside A: two generation reproductive toxicity study in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2008. 46, S21-30.
- [93] TOSKULKAO, C., CHATURAT, L., TAMCHAROEN, P. et GLINSUKON, T. Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. *Drug and Chemical Toxicology*. 1997. 20, 31-44.
- [94] BRUSICK, D.J. A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*. 2008. 46, 83-91.
- [95] WASUNTARAWAT, C., TEMCHAROEN, P. et TOSKULKAO, C. Developmental toxicity of steviol, a metabolite of stevioside, in the hamster. *Drug and Chemical Toxicology*. 1998. 21, 207-222.
- [96] Avis de l'AFSSA relatif à une autorisation provisoire, pour une durée de deux ans, d'emploi de steviol, extraits de *Stevia rebaudiana*, en tant qu'édulcorant en alimentation humaine dans le cadre de l'article 5 de la directive 89/107/CEE, à la suite de l'avis du 12 octobre 2007. Saisine N°2008-SA-0108. 2008.
- [97] GRAS Assessment of high purity steviol glycosides- Sweetleaf® *Stevia*. 2009. 109p. [En ligne] Disponible sur <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm276021.pdf>. Consulté le 10/04/2012.
- [98] Arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rebaudioside A, extrait de *Stevia rebaudiana* comme additif alimentaire. *Journal Officiel de la République Française*. 2009. N° 206, p. 14 774.

[99] Avis de l'AFSSA sur un projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rebaudioside A extrait de *Stevia rebaudiana* comme additif alimentaire. Saisine n° 2009-SA-0269. 2009.

[100] Arrêté du 6 septembre 2011 modifiant l'arrêté du 26 août 2009 modifié relatif à l'emploi du rebaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) comme additif alimentaire. Journal Officiel de la République Française. 2011. N° 217, p.15650.

[101] ANSES. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail. Évaluation des bénéfices et des risques nutritionnels des édulcorants intenses. 2015. 126p. [En ligne] Disponible sur <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/NUT2011sa0161/Ra.pdf>. Consulté le 20/02/2015.

[102] Le portail de l'économie et des finances. DGCCRF. Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes. *Stevia rebaudiana* et produits fabriqués à base de stevia. [En ligne] Disponible sur <http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Securite/Produits-alimentaires/Stevia-rebaudiana-produits-base-de-stevia>. Consulté le 01/12/2014.

RÉSUMÉ

L'achat de plante fraîche est autorisé en France et en Europe. Cependant, la consommation de plante fraîche ou de poudres extraites des feuilles de stevia ne l'est pas. Ceci est dû aux études menées sur la plante ainsi que ses extraits, celles-ci ayant démontrées que les extraits de feuilles ont une action hypoglycémiant chez le Rat diabétique et chez l'Homme ; une action hypotensive chez le Rat normo- et hypertendu ainsi que chez l'Homme hypertendu. Une activité sur la fertilité des Hommes, des Rates et des Rats a aussi été démontrée. Ce travail nous conduit à déconseiller aux personnes diabétiques, hypertendues et aux adultes en âge de procréer, de consommer des feuilles fraîches, en infusion ou sous forme de poudre de façon chronique.

Le pouvoir édulcorant de la stevia est dû aux glycosides de steviol, notamment le rebaudioside A ainsi que le stevioside, extrait des feuilles de *Stevia rebaudiana*. L'autorisation du rebaudioside A titré à 97% en tant qu'édulcorant fait suite à de nombreuses évaluations par les différentes autorités sanitaires, le JECFA, l'EFSA, la FDA et l'AFFSA. En France, depuis janvier 2010, le rebaudioside A est autorisé comme édulcorant de table ainsi que dans diverses denrées alimentaires.

Le rebaudioside A est une poudre blanche cristalline que l'on peut retrouver sous différentes formes, poudres, comprimés, morceaux et paillettes cristallisées chez les grossistes-répartiteurs.

Il est question d'usage agroalimentaire, c'est pourquoi la question de la toxicité est importante. Les études concernant le rebaudioside A n'ont pas montré de toxicité subchronique ni de toxicité génétique pour l'Homme. Mais nous n'avons aucune données scientifiques sur le long terme. L'usage sur de longues périodes et à forte dose est donc à éviter actuellement.

Mots-clés : stevia, steviol, glycosides de steviol, rebaudioside A

REVIEW ON THE SWEETENER OF STEVIA

ABSTRACT

The purchase of plant of stevia is authorized in France and in Europe. However, the consumption of plant or powders extracted from the leaves of stevia isn't it. This is due to the studies led on the plant as well as its extracts, these having demonstrated that the extracts of leaves have a hypoglycemic action to the diabetic rat and in men; an hypotensive action to normo- and hypertensive rat as well as hypertensive men. An activity on the fertility of the men, female and male rats was also demonstrated. This work leads us to disadvise to the diabetics, hypertensive and at the adults old enough to procreate, consume fresh leaves, in infusion or in the form of powder in a chronic way.

The stevia sweetness is due to steviol glycosides, rebaudioside A and stevioside, extracted of *Stevia rebaudiana* leaves. The use of rebaudioside A, at 97% as sweetness followed evaluations by differents sanitary authority, JECFA, EFSA, FDA and AFFSA. In France, since january 2010, rebaudioside A is authorized as sweetner of table as well as differents foodstuffs.

Rebaudioside A is a white cristalline powder that we can find under differents forms, powders, tablets, pieces and glitter crystallized at the wholesalers-distributors.

It is about food-processing use, that is why the question of the toxicity is important. The studies concerning the rebaudioside A didn't show subchronic toxicity nor genetic toxicity for the Man. But we haven't scientific studies on long term. The use over long periods and in strong dose thus is to be avoided at present.

Keywords : stevia, steviol, steviol glycosides, rebaudioside A

