



Stevia rebaudiana B. : réels enjeux de santé publique ou campagne marketing ?

Jonathan Lesniarek

► To cite this version:

Jonathan Lesniarek. Stevia rebaudiana B. : réels enjeux de santé publique ou campagne marketing ?. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01235395

HAL Id: dumas-01235395

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01235395>

Submitted on 30 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2015

<i>Stevia rebaudiana</i> B. : Réels enjeux de santé publique ou campagne marketing ?

THÈSE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ÉTAT

Jonathan LESNIAREK

Né le 01 Janvier 1988 à MONTÉLIMAR

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le 12 Novembre 2015

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Monsieur le Docteur Serge KRIVOBOK, Docteur en Pharmacie, Maître de Conférences
(UFR de Pharmacie de Grenoble)

Membres :

Monsieur le Docteur Basile PERES, Maître de Conférences (UFR de Pharmacie de Grenoble)

Madame le Docteur Marie JOYEUX-FAURE, Docteur en Pharmacie, Maître de Conférences
(UFR de Pharmacie de Grenoble)

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr



Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr



MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT-MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr



MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »**

D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et

Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
et de Cognition et Ontogenèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maîtres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeurs des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

*Ma mère m 'a dit que le bonheur était la clé de la vie.
Quand je suis allé à l 'école, ils m 'ont demandé ce que je voulais être quand je serai grand.
J'ai répondu "heureux".
Ils m 'ont dit que je n 'avais pas compris la question,
J'ai répondu qu 'ils n 'avaient pas compris la vie.*

John Lennon

A Michel Pizette dit Barnico, qui assistera à la soutenance dans mon cœur.

REMERCIEMENTS

À Monsieur Serge KRIVOBOK,

Pour m'avoir fait le grand honneur d'accepter de présider cette thèse,
Pour l'aide que vous m'avez apportée pour mener à bien ce travail,
Pour m'avoir transmis le virus de la botanique,
Veuillez accepter le témoignage de ma sincère reconnaissance

À Monsieur Basile PERES,

Pour m'avoir fait le grand honneur de diriger ce travail,
Pour la disponibilité et les généreux conseils,
Pour la confiance que vous avez accordé à ce projet,
Veuillez accepter l'expression de mon profond respect.

À Madame Marie JOYEUX-FAURE,

Pour m'avoir fait l'honneur de siéger à mon jury de thèse,
D'avoir apporté vos connaissances à la critique de ce travail,
Soyez assurée de ma profonde gratitude.

À ma famille et particulièrement à ma maman et mon papa,

Pour avoir tout fait pour que je puisse arriver où j'en suis.
Vous avez ma reconnaissance éternelle.

À Lise-Marie,

Pour avoir lu, relu et rere lu ma thèse,
D'être le pilier de mon bonheur,
Et surtout de me supporter au quotidien.

À ma belle-famille,

Pour m'avoir accepté avec la plus grande gentillesse,
Je vous dois énormément tant sur mon épanouissement personnel que professionnel.

À mes amis pharma,

Pour tous les moments inoubliables passés ensemble,
Brièvement Lucie, Loïc, Géraldine, Irwin, Charlotte, Romain, Agathe, Octave, Alice, Mike,
fillots, fillotes... Je ne peux pas vous remercier un à un, alors simplement : j'vous kiff!

À mes amis Ardéchois et ma famille de coeur,

Pour avoir toujours gardé contact malgré l'éloignement,
Pour ces retours aux sources qui me font un bien fou,
Entre autres Charlé, Anthony, Mathieu, Florian, Claudette, Popo, Murielle, Michou, Camille,
Alexis, Maxime...

À mes amis Ensicéens,

Qui ont fait que mes études à Nancy soient mémorables,
Benoit et les p'tits frères, les PP, ma marraine et les BÂM...

À mes coloc Gwendal et Jerem',

Qui ne m'ont absolument pas aidé pour ce travail, mais avec qui j'ai passé de merveilleux
moments et qui ont réussi à me supporter.

À Maud ROUGIER,

Pour son travail sur lequel j'ai pu m'appuyer.

AVANT-PROPOS

De nos jours, le monde pharmaceutique, de part les progrès acquis au cours des derniers siècles, s'éloigne de son domaine d'origine qui n'est autre que la botanique. Cependant, à travers cette thèse, je souhaiterai montrer que le monde végétal reste une source de solutions thérapeutiques, notamment pour l'obésité et le diabète qui sont des pathologies largement répandues à travers le monde. Il existe déjà des édulcorants acaloriques luttant contre le diabète, mais sont-ils vraiment sûrs ? Dans un monde où les avancées sont toujours plus rapides, où l'économie prend le pas sur la santé et où l'information circulante n'est pas systématiquement vérifiée, quelle est la place de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni?

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	13
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, ACRONYMES, SYMBÔLES ET UNITÉS.....	17
INTRODUCTION.....	20
PREMIÈRE PARTIE : BOTANIQUE, AGRONOMIE ET HISTORIQUE	22
1. Classification botanique	23
1.1.Caractéristiques de la famille des <i>Asteraceae</i>	23
1.2.Description de la plante	25
1.2.1.Description botanique	25
1.2.2.Autres appellations.....	28
1.2.3.Répartition géographique	28
1.2.4.Falsification.....	29
1.2.5.Intérêts et utilisation.....	29
2. Culture	30
2.1.Méthodes et techniques	30
2.1.1.Voie classique : le semis	30
2.1.2.Voie végétative	31
2.1.2.1.Bouturage.....	31
2.1.2.2.Micropropagation	31
2.2.Conditions et exigences environnementales	32
2.2.1.Climat et température.....	32
2.2.2.Photopériode	32
2.2.3.Sol	33
2.2.4.Eau	33
2.2.5.Densité de la population.....	34
2.2.6.Pollinisation	34
2.3.Récolte	34
2.4.Post-récolte	34
2.5.Organismes nuisibles.....	34
3. Histoire de cette plante sucrée	35
3.1.Origine du nom	35
3.2.Histoire de la Stevia.....	36

SECONDE PARTIE : COMPOSITION CHIMIQUE DE *Stevia rebaudiana* 39

1. Phytochimie	40
1.1.Composition chimique.....	40
1.2.Structure chimique.....	41
1.2.1.Glycosides de stéviol	41
1.2.2.Labdanes	44
1.2.3.Triterpènes et stérols	45
1.2.4.Flavonoïdes	46
1.3.Biosynthèse des glycosides de stéviol	46
1.3.1.Chloroplaste	48
1.3.2.Réticulum endoplasmique.....	48
1.3.3.Cytosol	49
1.3.4.Vacuole	50
1.4.Génétique.....	51
1.5.Pouvoir sucrant	52
2. Aspects nutritionnels.....	52
2.1.Glucides	52
2.2.Protéines	53
2.3.Minéraux.....	54
2.4.Lipides	54
2.5.Vitamines.....	55
3. Intérêts alimentaire et médicinal	56
4. Sources et variations quantitatives des glycosides de stéviol	56
5. Extraction des glycosides de stéviol.....	58
5.1.Généralités	58
5.1.1.Description	58
5.1.2.Identification	58
5.1.3.Pureté	59
5.1.4.Stabilité	59
5.2.Méthode d'extraction	60
5.2.1.Méthode selon la réglementation européenne.....	60
5.2.2.Optimisation de l'extraction à l'eau	62
5.2.2.1.Procédé discontinu.....	62
5.2.2.2.Procédé continu	63
5.3.Autres méthodes d'extraction	64
5.3.1.Extraction solide - liquide avec d'autres solvants que l'eau	64
5.3.2.Extraction par sonification	65

5.3.3.Extraction au dioxyde de carbone supercritique	65
5.3.4.Extraction enzymatique.....	66
6. Conclusion.....	66
TROISIÈME PARTIE : <i>Stevia rebaudiana</i> ET LA SANTÉ.....	68
1. Pharmacocinétique.....	69
1.1.Absorption	69
1.2.Distribution.....	71
1.2.1.Chez l'Homme.....	71
1.2.2.Chez l'Animal.....	73
1.2.2.1.Paramètres pharmacocinétiques	73
1.2.2.2.Profil de distribution.....	74
1.3.Métabolisation	75
1.3.1.Métabolisation intestinale	75
1.3.2.Métabolisation hépatique	76
1.4.Elimination	76
2. Toxicologie	78
2.1.Toxicologie des glycosides de stéviols (extraits bruts)	78
2.1.1.Toxicité orale aiguë.....	80
2.1.2.Toxicité subchronique.....	80
2.1.3.Génotoxicité.....	82
2.1.3.1.Etudes positives <i>in vitro</i>	83
2.1.3.2.Etude positive <i>in vivo</i>	85
2.1.4.Toxicité chronique	85
2.1.5.Tératogénicité et reproduction	86
2.1.6.Potentiel allergène.....	87
2.1.7.Etude à large échelle	88
2.1.8.Conclusion sur la toxicité.....	89
2.2.Risques liés aux procédés d'extractions.....	89
3. Pharmacologie clinique et expérimentale	90
3.1.Glycosides de stéviol et diabète.....	90
3.2.Glycosides de stéviol et système cardiovasculaire	94
3.3.Glycosides de stéviol et activité anticariogène.....	94
3.4.Glycosides de stéviol et activité antioxydante.....	95
3.1.Glycosides de stéviol, activité anti-inflammatoire et anticancérigène	95
3.2.Glycosides de stéviol et activité antimicrobienne	96
3.3.Conclusion	98

QUATRIÈME CHAPITRE : <i>Stevia rebaudiana</i> ET L'ÉCONOMIE	100
1. Droit.....	101
1.1.Qu'est ce qu'un édulcorant ?	101
1.2.Réglementation	103
1.2.1.Réglementation des édulcorants.....	103
1.2.2.Réglementation de la commercialisation	104
1.2.2.1.Les glycosides de stéviol	104
1.2.2.2.La plante	104
2. Épidémiologie et économie	105
2.1.Définition et données épidémiologiques	105
2.1.1.Surpoids et obésité	105
2.1.2.Diabète	107
2.2.Données économiques	108
2.2.1.Coûts directs.....	108
2.2.2.Coûts indirects.....	108
2.2.3.Coûts immatériels	109
2.2.4.Coût de l'obésité	109
2.2.5.Coût du diabète	111
2.2.5.1.En France	111
2.2.5.1.1.Données de l'étude ENTRED	111
2.2.5.1.2.Données de l'Assurance maladie.....	111
2.2.5.1.3.Données de l'Inspection générale des affaires sociales	112
2.2.5.2.Dans le monde	113
2.2.6.Le marché de la stévia.....	113
2.2.6.1.La solution apportée par les édulcorants	113
2.2.6.2.Les différents édulcorants.....	114
2.2.6.3.Le marché de la stévia et des édulcorants.....	115
2.2.6.3.1.Aspect portefeuille	115
2.2.6.3.2.Estimations économiques.....	117
2.2.6.3.3.Acteurs économiques	119
2.2.6.3.4.Investissements et associations	121
2.2.6.3.5.La stévia en France	121
2.2.6.3.6.Abus et confusion.....	122
CONCLUSION	124
LISTE DES ANNEXES.....	127
BIBLIOGRAPHIE.....	167

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description de quatre maladies retrouvées chez <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni	35
Tableau 2 : Avancées historiques dans la découverte et l'utilisation des stéviolosides.	37
Tableau 3 : Constituants chimiques majeurs de <i>Stevia rebaudiana</i>	41
Tableau 4 : Structures chimiques et pouvoirs sucrant des principaux glycosides de stéviol... ..	43
Tableau 5 : Structure chimique et pouvoir sucrant d'un nouveau glycoside de stéviol.	44
Tableau 6 : Structures de flavonoïdes isolés à partir de <i>Stevia rebaudiana</i>	46
Tableau 7 : Comparaison de la composition en acides aminés des feuilles de <i>Stevia rebaudiana</i> avec les besoins journaliers en acides aminés essentiels.	53
Tableau 8 : Minéraux contenus dans les feuilles de <i>Stevia rebaudiana</i> (mg/100 g).	54
Tableau 9 : Composition en acide gras de l'huile de feuille de <i>Stevia rebaudiana</i>	55
Tableau 10 : Vitamines hydrosolubles extraits des feuilles et cals de <i>Stevia rebaudiana</i>	55
Tableau 11 : Évaluation de la pureté des glycosides de stéviol.	59
Tableau 12 : Effet du ratio feuilles de stévia - eau sur la concentration en stévioloside et en solides solubilisés lors d'une extraction à l'eau.	62
Tableau 13 : Rendement d'extraction et pureté de l'extrait en stévioloside en fonction du solvant utilisé.	64
Tableau 14 : Résumé des principaux paramètres pharmacocinétiques obtenu chez l'Homme suivant une administration orale en prise unique de rébaudioside A et stévioloside.....	71
Tableau 15 : Paramètres pharmacocinétiques provenant de la concentration radioactive dans le plasma de rat Sprague-Dawley, suivant une administration orale en prise unique de ¹⁴ C-rébaudioside, ¹⁴ C-stévioloside et ¹⁴ C-stéviol.....	73
Tableau 16 : Facteurs de conversion et masse molaire du stéviol et de ses principaux glycosides.	76
Tableau 17 : Résumé chronologique des études sur la toxicité subchronique du stévioloside et du rébaudioside A respectant les spécifications JECFA.....	81
Tableau 18 : Évaluation de la génotoxicité <i>in vivo</i> du stéviol, du stévioloside et du rébaudioside A.	83

Tableau 19 : Études <i>in vitro</i> positives sur le potentiel génotoxique du stéviol et du stévioside.	84
Tableau 20 : Résultats d'une étude de 4 ans sur la surveillance de la santé de consommateurs de produits à base de stévia.	89
Tableau 21 : Activité antimicrobienne <i>in vitro</i> de l'huile essentielle et des extraits de <i>Stevia rebaudiana</i> .	97
Tableau 22 : Concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle et des extraits de <i>Stevia rebaudiana</i> .	97
Tableau 23 : Exemples d'additifs alimentaires et de leurs fonctions.	102
Tableau 24 : Référence et nom des édulcorants autorisés en France.	115
Tableau 25 : Évolution du marché mondial de la stévia en fonction de la localisation géographique.	119
Tableau 26 : Classement géographique, non exhaustif, des entreprises productrices de glycosides de stéviol dans le monde en 2013.	120

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification de la <i>Stevia rebaudiana</i> selon APG III.....	23
Figure 2 : Répartition mondiale des Asteraceae.	24
Figure 3 : Plantes de la famille des Asteraceae.....	25
Figure 4 : À gauche : partie aérienne d'un plant de <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni ; à droite : Un plant de <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni dans son habitat naturel (Argentine).....	25
Figure 5 : Dessin analytique de <i>Stevia rebaudiana</i>	26
Figure 6 : A gauche : Schéma d'une fleur avec ses organes reproductifs ; A droite : Plant de <i>Stevia rebaudiana</i> B. en fleur.....	28
Figure 7 : Découpage géographique du Paraguay dans les années 1860.....	29
Figure 8 : Régénération par micropropagation d'un plant de <i>Stevia rebaudiana</i> à partir d'un broyat de feuille.....	32
Figure 9 : Ontogénèse de <i>Stevia rebaudiana</i> en fonction de la durée d'exposition à la lumière.	33
Figure 10 : Structure du stéviol.....	41
Figure 11 : Structure du stéviolside montrant la partie aglycone au centre, entourée par des groupements glucose G1, G2 et G3.	42
Figure 12 : Structure d'un glycoside de stéviol mineur présent dans la stévia	44
Figure 13 : Structures des principaux labdanes retrouvés chez <i>Stevia rebaudiana</i>	44
Figure 14 : Structures du jhanol et stérébine E - F extraits de <i>Stevia rebaudiana</i>	45
Figure 15 : Structures de triterpénoïdes et stérols extraits de <i>Stevia rebaudiana</i>	45
Figure 16 : Biosynthèse des glycosides de stéviol.....	47
Figure 17 : Voie majeure et voies mineures de la biosynthèse des glycosides de stéviol.	50
Figure 18 : Schéma artistique de la biosynthèse de glycoside de stéviol avec la localisation des étapes.....	51
Figure 19 : A gauche : Effets des conditions environnementales sur la concentration en stéviolside et rébaudioside A dans les feuilles de stévia ; A droite : Evolution de la concentration en stéviolside et rébaudioside A en fonction de la position de la feuille sur la tige.....	57

Figure 20 : Exemple de procédé de fabrication respectant la réglementation Européenne.	61
Figure 21 : Evolution temporelle de la concentration plasmatique du glucuronide de stéviol chez l'Homme.	72
Figure 22 : Concentration de la radioactivité dans le plasma de rat Sprague-Dawley male et femelle, suivant une administration orale en prise unique de ^{14}C -rébaudioside A, ^{14}C - stévioside et ^{14}C -stéviol.	74
Figure 23 : Schéma représentant l'ensemble du processus de pharmacocinétique suivant une alimentation en <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, chez l'Homme et le rat. Avec R1 et R2 des groupements mono ou polyosidiques.	79
Figure 24 : Evolution de la glycémie pendant les tests de tolérance au glucose chez 8 groupes de rat Wistar après une semaine de traitement.	91
Figure 25 : Evolution de la glycémie et du taux d'insuline chez 5 groupes de rat Wistar	92
Figure 26 : Amélioration de la stéatose hépatique chez la souris après administration de stévioside, rébaudioside A et stéviol.	93
Figure 27 : Actions anti-hypertensives du stévioside.	94
Figure 28 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Stevia rebaudiana</i>	96
Figure 29 : Potentielles activités des glycosides de stéviol, des extraits de Stevia et de l'huile essentielle de Stevia.	98
Figure 30 : Surcharge pondérale dans le monde.	106
Figure 31 : Nombre d'enfants souffrant d'un excès pondéral ou obèses et prévalence du surpoids et de l'obésité chez l'enfant à l'échelle mondiale, 1990-2012.	107
Figure 32 : Estimation du coût annuel mondial et des investissements pour la lutte des fardeaux sociaux au niveau mondial en 2012.	110
Figure 33 : Comparaison des attributs sensoriels du rébaudioside A et du rébaudioside M dans l'eau et dans de l'eau acidifié.	116
Figure 34 : Comparaison des attributs sensoriels de différents mélanges composés de rébaudioside M.	117
Figure 35 : Évolution des ventes mondiales de stévia, 2008-2013.	118
Figure 36 : Évolution du nombre de produits contenant des glycosides de stéviol dans le monde.	119

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, ACRONYMES, SYMBÔLES ET UNITÉS

%m : Pourcentage massique

°C : Degrés Celsius (Température)

°S : Degrés sud (Latitude)

ADN, ARN : Acide désoxyribonucléique, Acide ribonucléique

Ae_u et Ae_f : Quantité excrétée dans les urines ou les fèces (mg)

AESA (ou EFSA) : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (European Food Safety Authority)

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

ANZFSA : Australia-New Zealand Food Safety Authority

APG III : Angiosperm Phylogeny Group III

Ara : O- α -L-arabinopyranosyl

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

ASC_{0-t} : Aire sous la courbe du temps zéro jusqu'au dernier échantillon quantifiable (ng.h.ml⁻¹)

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CDPS : Copalyldiphosphate Synthase

CL_R : Clairance rénale (l.h⁻¹)

C_{max} : Concentration plasmatique maximale (ng.ml⁻¹)

CMK : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythrolol Kinase

CMS : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythrolol Synthase

CSAH : Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine

Da : Dalton

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

DJA : Dose Journalière Admissible

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

DOXP : 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate

DPP-4 : Dipeptidyl peptidase 4

DXR : 1-déoxyxylulose-5-phosphate réductoisomérase

DXS : Déoxyxylulose-5-phosphate Synthase

EV : Early Vegetative growth

F : Flowering

FAO : Food and Agriculture Organisation of the united nation

FB : Flower Bud fromation

g, kg, mg, ng : Gramme, Kilogramme, Milligramme, Nanogramme

G3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate

GGDPS : Géranylgéranyldiphosphate Synthase

Glc ou Glcβ : β-D-glucopyranosyl

GLP-1 : Glucagon Like Peptide 1

GRAS : Generally Recognized As Safe

h, min, s : Heure, Minute, Seconde

HDR / HDS : 1-hydroxy-2-(E)-butenyl-4-diphosphate Réductase / Synthétase

CLHP (HPLC) : Chromatographie Liquide Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography)

IDF : International Diabetes Federation

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

IPP : Isopentényl-pyrophosphate

JECFA : Joint Expert Comittee on Food Additive

KAH : Acide ent-kaurénoïque-13-hydroxylase

KO / KS : Kaurène Oxydase / Synthase

l, ml : Litre, Millilitre

LV : Late Vegetative growth

m, cm, mm : Mètre, Centimètre, Millimètre

M : Poids moléculaire (g.mol^{-1})

m/v : masse/volume

MATE : Multidrug and Toxic Compound Extrusion

mc : Masse Corporelle

MCS : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythrolol 2,4 cyclodiphosphate Synthase

MEP : 2-C-méthyl-D-erythritol-4-phosphate

MFS : Major Facilitor Superfamily

mol : Mole

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P_{app} : Coefficient de perméabilité (cm.s^{-1})

PCR (ou ACP) : Polymérase Chain Reaction (Amplification en Chaîne par Polymérase)

Rha : α-L-rhamnopyranosyl

Rut : 6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosyl

STZ : Streptozotocine

t_{1/2} : Temps de demi-vie (h)

t_{max} : Temps d'atteinte de la concentration plasmatique maximale (h)

UDS : Unscheduled DNA Synthesis

UDP : Uridine diphosphate

UGT : Uridine diphosphate glycosyltransférase

USFDA : United State Food and Drug Administration

vs : Versus

W : Watt

Xyl : α -D-Xylopyranosyl

λ_z : Constante de vitesse d'élimination (l.h⁻¹)

INTRODUCTION

Notre civilisation est une grande consommatrice de sucres simples que ce soit dans l'alimentation ou dans les boissons, car ils sont une source de plaisir. Ces sucres, dont principalement le saccharose, sont ajoutés dans les denrées alimentaires non seulement pour leurs propriétés sensorielles, mais également pour leurs propriétés physiques, microbiennes et chimiques. Consommé de manière excessive, le sucre induit des pathologies graves pouvant être irréversibles. Malheureusement ces pathologies sont de plus en plus nombreuses et surviennent de plus en plus tôt.

Depuis ces vingt dernières années, pour pallier à ces problèmes sans supprimer le goût des denrées alimentaires, des édulcorants ont commencé à se substituer au sucre, tels que la saccharine ou l'aspartame. Toutefois, les problèmes sanitaires sont encore présents et ne cessent d'augmenter, engendrant des dépenses de santé considérables.

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, plus communément appelée stévia est une plante de la famille des *Asteraceae* originaire d'Amérique du sud. Elle possède la spécificité d'avoir un fort goût sucré lorsque l'on porte une de ses feuilles en bouche ; particularité due à la présence de glycosides diterpénoïdes tétracycliques. Ces composés ont l'avantage d'avoir un indice glycémique de zéro et n'apportent ni glucides ni calories. Ces caractéristiques ajoutées à son origine naturelle font de la stévia une candidate à la diminution du nombre de pathologies liées au sucre. Mais le fait-elle vraiment ? De plus, des tribus amérindiennes attribuent des propriétés abortives à la stévia ; des questions se posent donc quant à son innocuité. Est-elle dangereuse pour la santé ? Possède-t-elle d'autres propriétés en plus de son caractère gustatif ?

L'autre aspect du monde du sucre est que l'alimentation actuelle regorge tellement de sucres ajoutés, qu'il devient difficile de les éviter. Cette forte présence traduit un marché économique tout aussi grand, représentant plusieurs milliards d'euros. Le saccharose domine ce marché mais la substitution du sucre par les édulcorants et l'intérêt de la population pour les produits "sans sucres ajoutés" et "naturels" progressent. La stévia vient donc bouleverser ce marché, de part son origine naturelle qui lui confère une attractivité que les autres édulcorants n'ont pas. Ainsi, elle représente un enjeu économique majeur... mais seulement économique ou également sanitaire ? C'est autant de questions auxquelles nous allons tenter de répondre tout au long de cette thèse.

Ce travail présentera dans un premier temps, les aspects botaniques, agronomiques et historiques. Ensuite, nous traiterons de sa composition chimique et plus particulièrement des glycosides de stéviol. Par la suite, nous nous focaliserons sur les intérêts thérapeutiques de la stévia en étudiant sa pharmacologie et sa toxicologie. Enfin, nous nous intéresserons à la réglementation soumise, ainsi qu'aux enjeux économiques de la plante et ses composés dans le domaine public et privé.

PREMIÈRE PARTIE :

BOTANIQUE, AGRONOMIE ET HISTORIQUE

1. Classification botanique

La taxonomie utilisée pour classer la stévia sera l'APG III ou *Angiosperm Phylogeny Group III* ; datant de 2009, dernière version de la classification APG [1]. Cette classification botanique est construite sur la phylogénétique, c'est-à-dire basée principalement¹ sur l'étude des molécules informatives telles que les acides nucléiques (ADN ou ARN) et les protéines [1][2].

1.1. Caractéristiques de la famille des *Asteraceae*

La stévia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) est une plante vivace indigène appartenant à la famille des *Asteraceae*, anciennement *Compositae*, faisant partie de l'embranchement des Spermatophytes [3] [4] (Du grec, *Sperma* : "graine" et *Phytón* : "végétal") :

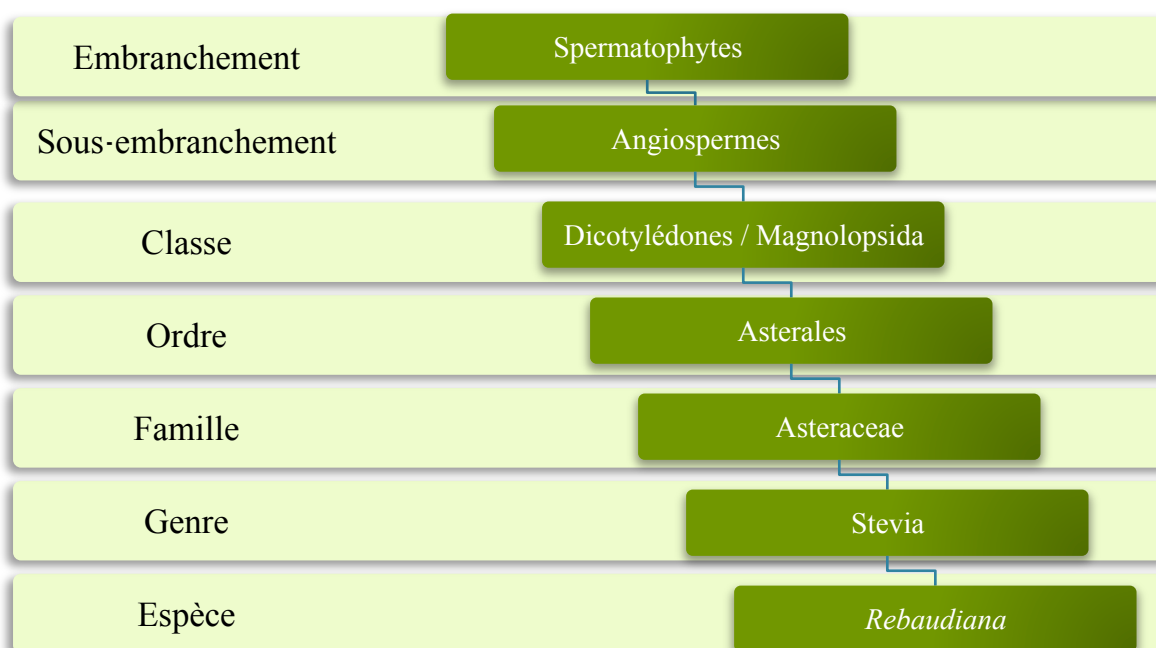


Figure 1 : Classification de la *Stevia rebaudiana* selon APG III

La stévia fait partie d'une famille largement répandue sur le globe (Figure 2), celle des *Asteraceae* provenant de l'ordre des Astérales. Relativement grand, cet ordre ne contient pas moins de onze familles [4] : *Alseuosmiaceae*, *Argophyllaceae*, *Asteraceae*, *Calyceraceae*, *Campanulaceae*, *Goodeniaceae*, *Menyanthaceae*, *Pentaphragmataceae*, *Phellinaceae*, *Rousseaceae* et *Stylidiaceae*.

¹ Cette classification peut être complétée par l'étude de caractères morphologiques



Figure 2 : Répartition mondiale des Asteraceae [4].

Les *Asteraceae* représentent numériquement, la famille la plus vaste des Angiospermes comprenant plus de 1.600 genres et 22.800 espèces [5]. Elle comprend majoritairement des plantes herbacées, mais contient aussi des arbres (*Olearia traversii* (F. Muell.) Hook. f.), arbustes (*Ageratina ligustrina* (DC.) R.M. King & H. Rob.) et lianes (*Humbertacalia tomentosa* (Lam.) C. Jeffrey).

Leurs feuilles sont alternes, rarement opposées ou verticillées et exstipulées. Concernant les fleurs, elles sont de petite taille, réunies en capitules et situées à l'extrémité d'une tige ou d'un rameau. Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de poils permettant une dispersion éolienne.

Étant une grande famille, les *Asteraceae* possèdent de nombreuses particularités² :

- Allergène : l'ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia* (L.) Farw.),
- Emblématique : le chardon-Marie (*Silybum marianum* (L.) Gaertn), l'edelweiss (*Leontopodium nivale* subsp. *alpinum* (Cass.) Greuter),
- Ornementale : le dahlia (*Dahlia pinnata* Cav.),
- Médicinale : le calendula (*Calendula officinalis* L.), l'arnica (*Arnica Montana* L.),
- Alimentaire : le tournesol (*Helianthus annuus* L.), la laitue (*Lactuca scariola* subsp. *sativa* (L.) Bonnier & Layens).

² Il est à noter que certaines espèces peuvent entrer dans plusieurs catégories.



Figure 3 : Plantes de la famille des Asteraceae (de gauche à droite et de haut en bas : *Ambrosia artemisiifolia*, *Silybum marianum*, *Leontopodium alpinum*, *Dahlia pinnata*, *Calendula officinalis*, *Arnica montana*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*) [6] à [13].

1.2.Description de la plante

La description se fera du bas de la plante vers son extrémité haute.

1.2.1. Description botanique

Il n'existe pas moins de 261 espèces de *Stevia* dans le monde [14] et leurs caractéristiques sont relativement similaires.



Figure 4 : À gauche : partie aérienne d'un plant de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni [15] ; à droite : Un plant de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni dans son habitat naturel (Argentine) [16].

La *S. rebaudiana* (Figure 4) est une plante herbacée pluriannuelle qui peut prendre l'aspect d'une haute herbe ou d'un arbrisseau. En effet, elle mesure entre 30 et 70 cm en milieu naturel et jusqu'à 1,80 m dans des milieux de culture en terre fertile [17] [18].

Les racines sont filiformes (Figure 5) et très ramifiées ce qui donne un système racinaire fibreux et dense. Ce système est également superficiel offrant une sensibilité aux changements climatiques ; cependant, la stévia s'adapte à tout type de climat puisqu'elle est cultivée dans le monde entier [19] [20]. Les racines renferment des réserves importantes en nutriments, mais ne contiennent pas ou très peu de stéviolosides [21].

La tige est mince (Figure 5a), semi-ligneuse, de couleur verte et possède des rameaux opposés décussés espacés de 2 à 4 cm. Elle comporte aussi des poils courts, fins et de couleur blanchâtre. La tige est annuelle et renferme des stéviolosides mais bien moindre par rapport aux feuilles et fleurs [22].

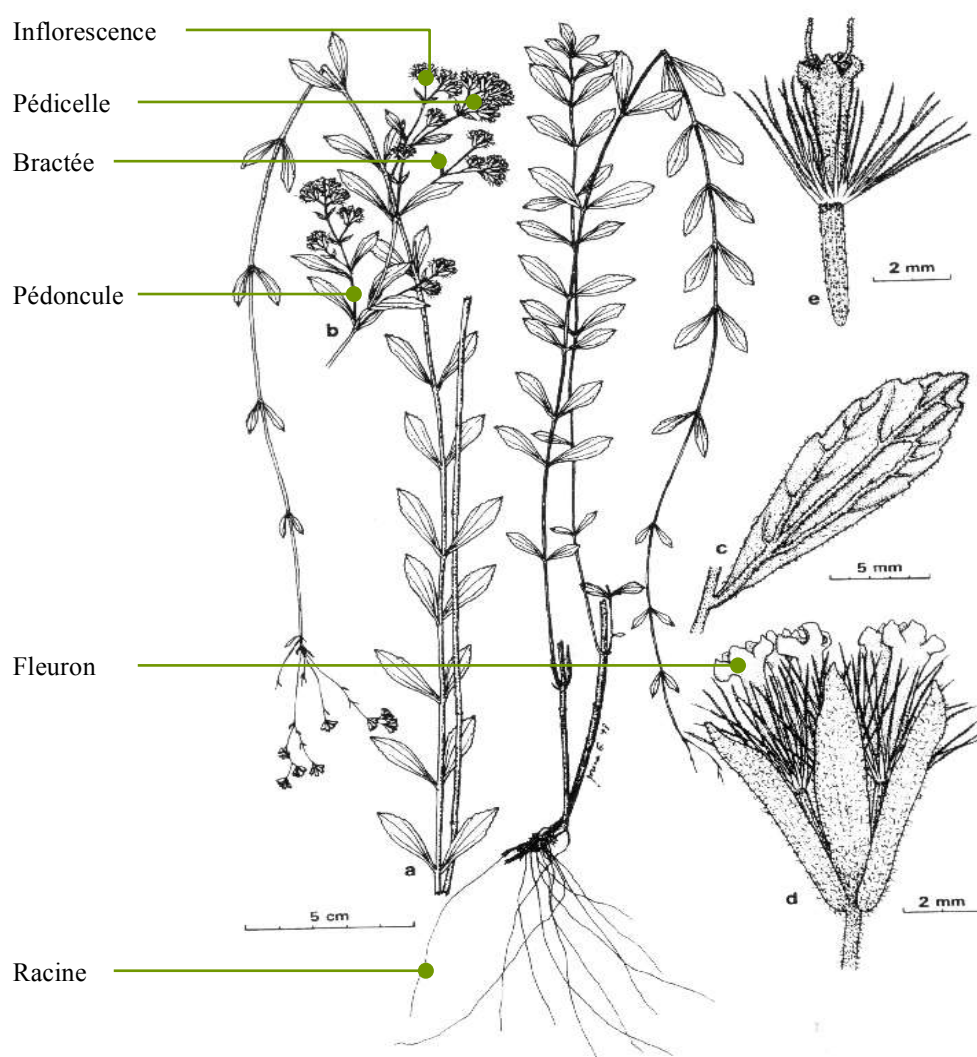


Figure 5 : Dessin analytique de *Stevia rebaudiana* [22], (a) Spécimen provenant d'un plant sauvage du Paraguay, (b) Spécimen provenant d'un plant en culture, (c) Feuille, (d) Capitule avec fleurons ouverts, (e) Anthère avec poils surmonté d'un fleuron

Les feuilles sont simples, de forme oblongue, crénelées et lancéolées avec une longueur de 2 à 5 cm et une largeur de 0,6 à 2 cm. Tout comme la tige, elles sont vertes et pubescentes, simples, opposés décussées, rarement alternes et pourvues, le plus souvent, d'un pétiole court de 3 à 4 mm. Les feuilles sont rugueuses sur les deux faces et montrent des nervures réticulées ou pennées. La face intérieure possède trois nervures primaires bien marquées (Figure 5c), d'où partent les nervures secondaires moins marquées. En prenant la nervure centrale comme axe de symétrie de la feuille, le limbe est un peu plié vers le haut (Figure 4). La feuille est la partie végétale contenant la plus grande quantité de stévioides [22].

Concernant les pièces florales, les pédoncules mesurent de 1 à 4 cm et les pédicelles de 1 à 4 mm (Figure 5b). Les bractées sont de formes lancéolées de 1 à 2 mm de long. Le type d'inflorescence varie selon les sources :

- elle est décrite comme simple monopodiale (ou indéfinie ou racémeuse) en cas de bourgeon non florifère à l'extrémité de l'axe central [22],
- ou décrite en cyme sympodiale [23].

L'inflorescence est formée de capitules en corymbe irrégulière au niveau de la partie terminale de la tige ou des rameaux. Les capitules sont enveloppés dans des involucre de forme cylindrique et composés de 2 à 6 fleurons à corolle actinomorphe (Figure 5d).

La floraison se déroule d'août à décembre dans l'hémisphère nord et de janvier à mars dans l'hémisphère sud et dure plus d'un mois afin d'atteindre sa maturité. La floraison est initiée par la plante seulement quand celle-ci possède un minimum de quatre vraies feuilles formées. La formule florale est la suivante : $5S + 5P + 5E + 2C^3$.

Les fleurs sont petites (15 à 17 mm), blanches avec une gorge de couleur violette claire, hermaphrodites et auto-incompatibles, c'est-à-dire nécessitant l'aide d'insectes pour effectuer une pollinisation croisée et obtenir des graines viables. La fleur ne possède pas d'odeur caractéristique [17] [20] [22] [23].

Les fruits sont des akènes minces cylindriques, prismatiques ou encore fusiformes et sont pentagonaux avec des faces concaves. Les akènes font 3 mm de long et sont surmontés d'une aigrette sans stipe possédant environ 20 poils persistants (Figure 5e). Les graines contenues dans l'akène sont relativement petites et légères car elles mesurent de 2,5 à 3 mm (1000 graines pèsent entre 0,3 et 1 g) [23]. Il est possible de reconnaître la viabilité d'une graine grâce à sa couleur : les graines fertiles sont généralement de couleur foncée ou sombre, tandis que les graines stériles sont de couleur claire ou pâle [24].

³ S : Sépales, P : Pétales, E : Etamines, C : Carpelles



Figure 6 : A gauche : Schéma d'une fleur avec ses organes reproductifs : involucre (1), corolle (2), pistil (3), akène avec ses aigrettes (4) ; A droite : Plant de *Stevia rebaudiana* B. en fleur [25] [26].

1.2.2. Autres appellations

La stévia étant connue depuis fort longtemps, elle a possédé chronologiquement les noms suivants :

- *Ka'a he'e* (ou *ka'a he'ê* ou encore *kaa he-he*) : premier nom donné à la stévia par les Guarani (Amérindiens), signifiant "herbe douce" ou "herbe comme miel" [16] [20] [27] ;
- *Caaje'é* (ou *azuca-ca'a*) : qui n'est autre que la transcription espagnole du nom donné par les indiens d'Amérique, à l'époque de la découverte du Nouveau Monde [16] ;
- *Eupatorium rebaudianum* Bert. : nom donné à la stévia pour la classer selon des critères botaniques [15] ;
- mais aussi des noms usuels tel que *chanvre d'eau*, *Yerba dulce* (Espagne), *sweet herb* et *honey leaf* (pays anglo-saxons)...

1.2.3. Répartition géographique

S. rebaudiana est originaire des régions montagneuses du nord du Paraguay (sur la frontière brésilienne), entre les latitudes 23°S et 24°S (Figure 7). Elle est également présente de manière sauvage à une altitude de 200 à 500 m, dans la région montagneuse de l'Amambay et plus précisément, dans la vallée du Rio Monday. Dans cette région, le climat est semi-humide subtropical avec des températures variant de - 6°C à 43°C et une moyenne de 23°C. Quant aux précipitations, elles sont de 1500 à 1800 mm par an [23] [28].

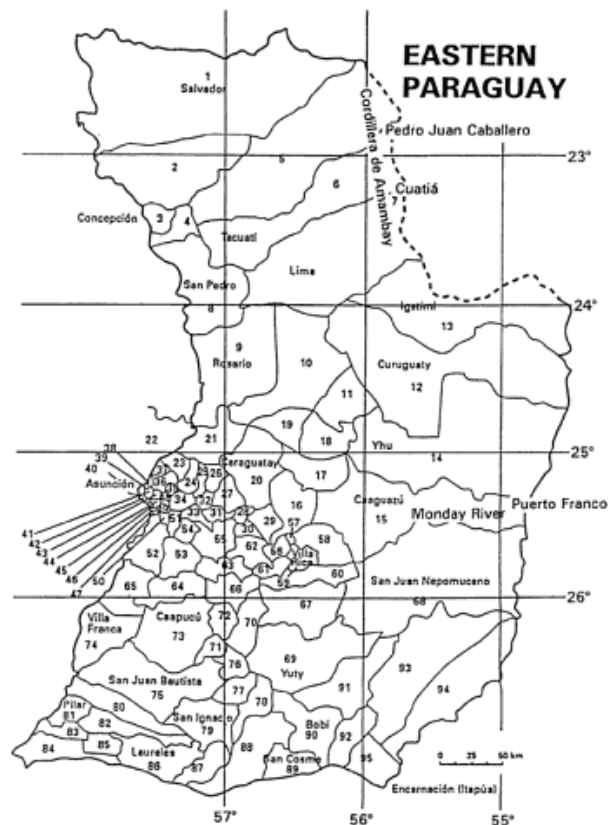


Figure 7 : Découpage géographique du Paraguay dans les années 1860 [22].

Aujourd'hui, de part son intérêt comme édulcorant, elle est cultivée de manière industrielle. La stévia a donc fait l'objet d'une mondialisation, a été exportée du Paraguay vers de nombreux pays tels que le Brésil, la Corée, le Mexique, les États-Unis d'Amérique, l'Indonésie, la Tanzanie, le Canada, l'Inde, le Maroc... [17] [20], des environnements aussi divers que variés, comportant des climats pouvant être très différents du climat du pays originaire de la stévia.

1.2.4. Falsification

Aucune confusion avec une plante toxique n'est décrite dans la littérature. La seule falsification constatée vient d'une confusion entre la plante et les molécules qui en sont extraites. Ces deux produits sont bien différents et relèvent de réglementations spécifiques [29].

1.2.5. Intérêts et utilisation

Il est important de faire la différence entre l'usage de la plante entière et l'usage de ses glycosides. Traitant dans ce chapitre de la botanique, seul la plante est étudiée, les glycosides de stéviol seront traités le chapitre II (Composition chimique de *Stevia rebaudiana* B.).

La stévia présente un intérêt agronomique certain du fait que c'est une espèce pérenne à bonne capacité de régénération, s'adaptant à une large gamme d'environnements et pouvant être récoltée 3 à 4 fois par an [17]. Toutes les parties de la plante, excepté les racines peuvent être utilisées, sous forme fraîche ou sèche, entière ou en poudre pour [15] [16] [17] [30] :

- un usage alimentaire : infusion, agent sucrant pour des aliments (yaourt, chewing-gum, biscuits...) ou des boissons (thé, café...) et colorant...
- un usage médicinal : régime diététique, alimentation pour diabétique, inhibition de la formation des cavités et des plaques dentaires, utilisation dermatologique (eczéma, acné...), activité antibactérienne et antiviral, activité digestive...
- un usage autre : production de régulateurs de croissance des plantes.

2. Culture

Dans cette partie, la culture de la stévia est discutée afin d'obtenir une plante contenant une grande quantité de glycosides de stéviol.

2.1.Méthodes et techniques

La propagation naturelle de *Stevia rebaudiana* se fait par dissémination des graines. Comme il a été décrit précédemment, la fertilité des graines est basse et généralement le rendement de la germination est inférieur à 50%⁴ [20]. Pour pallier à ce problème, l'Homme a mis en place de nouvelles techniques de culture.

2.1.1. Voie classique : le semis

La première méthode n'est autre que celle de la nature, c'est à dire la semence des graines dans un sol fertile. C'est la voie la plus facile et la plus économique pour obtenir des plants adultes, mais ce n'est pas celle qui offre une homogénéité des cultures.

La semence est une technique plus efficace dans les pays tropicaux que dans les pays à climat tempéré. En effet, le climat tropical possède une saison propice à la croissance de la stévia plus longue et plus stable (température). Les pays n'ayant pas cette chance doivent semer les graines sous serre afin de les protéger des variations climatiques [20].

⁴ Non viabilité des semences (auto-incompatibilité pollinique).

2.1.2. Voie végétative

Cette voie a été développée en raison des problèmes de germination des graines de stévia. Contrairement à la voie classique, les deux méthodes suivantes doteront les nouvelles plantes des mêmes caractéristiques que la plante mère. Toutefois, elles demandent une main d'œuvre qualifiée.

2.1.2.1. Bouturage

C'est avant tout la méthode de propagation la plus utilisée car le rendement de propagation est élevé [31] et les plantes obtenues sont identiques aux plantes mères. Cependant, le coût de production est élevé.

Pour réaliser un bouturage il faut couper une tige ou un rameau vigoureux à la base avec une lame tranchante, en prenant soin de garder deux à trois nœuds au-dessus du sol. Avant de placer la partie découpée dans le sol, il faut préalablement la plonger dans de l'huile de margousier ou tout autre fongicide afin de diminuer les risques d'infection [32].

L'enracinage est généralement facile tandis que la croissance l'est moins. Le développement de la bouture est modulé par plusieurs paramètres et de façon non exhaustive par [17] [20] :

- le nombre de feuilles au moment de la coupe, qui peut être de 2 à 4 paires de feuilles selon la période de la plantation,
- le lieu de prélèvement des boutures, par exemple le nombre d'internœuds présents,
- la longueur de la bouture (plus le prélèvement pour faire une bouture est long, plus la reprise de la croissance sera facile),
- la durée du jour, qui est un des critères majeurs pour la croissance des formes végétatives.

2.1.2.2. Micropropagation

La micropropagation est la méthode qui demande le plus de compétences car c'est une culture de cellules *in vitro*. Elle consiste à broyer un échantillon de la plante de départ puis de réaliser sa croissance dans un tube à essai avec un milieu de culture adéquat (Figure 8). De part les nombreuses recherches en laboratoire dans cette voie, de nombreuses techniques de mise en culture sont décrites (partie de plante utilisée, type de broyage...) et également de nombreux milieux de culture⁵ (le milieu le plus utilisé est le MS (Murashige et Skoog), milieu supplémenté en hormones de croissance type AIA, AIB, ANA).

⁵ Citation de quelques exemples : [20] [23] [30] [33] à [37].

La micropropagation possède l'avantage de pouvoir utiliser différentes parties de la plante mère : feuilles, pousses auxiliaires, pousses de racines de base de la plante et les tissus nodaux et internodaux...

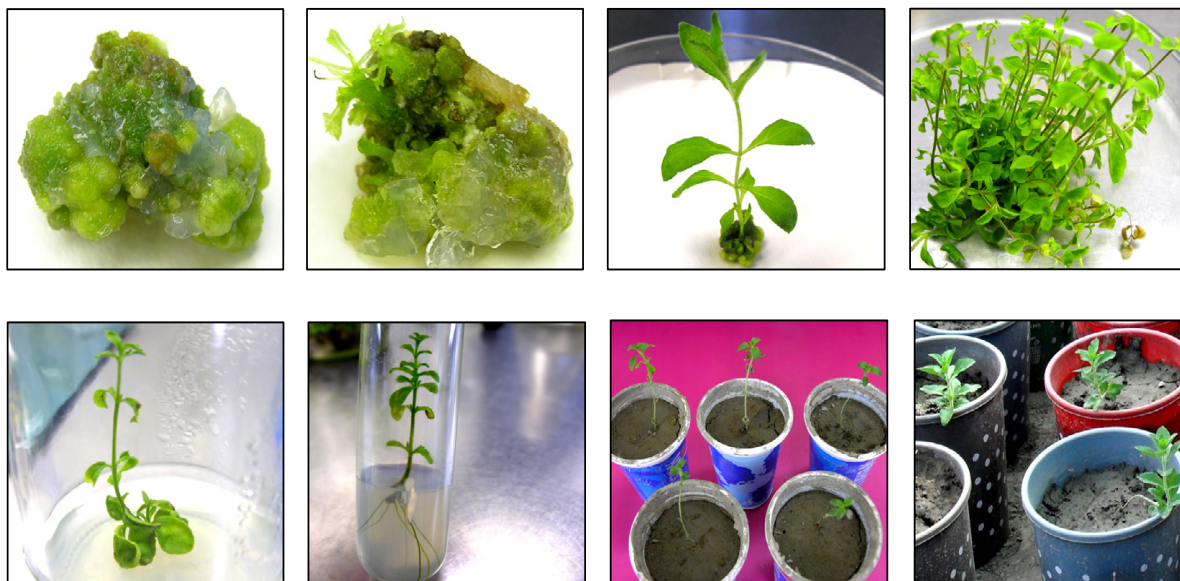


Figure 8 : Régénération par micropropagation d'un plant de *Stevia rebaudiana* à partir d'un broyat de feuille (de gauche à droite et de haut en bas : broyat de feuille, initiation d'un cal, développement de la pousse, multiplication des tiges, élancement de la tige, induction des racines, transplantation en terre, réussite de la croissance et du développement) [37].

2.2. Conditions et exigences environnementales

2.2.1. Climat et température

Le climat d'origine de Stévia est semi-humide subtropical ; donc un climat chaud, humide et ensoleillé lui est préférable. Les températures doivent être comprises entre 6 et 43°C avec une température optimale située entre 15 et 30°C. Les plants ne survivent pas à des températures inférieures à -3°C. La variation de la température diurne et nocturne ne doit respectivement pas excéder 40°C et diminuer en-dessous de 10°C.

2.2.2. Photopériode

La durée d'ensoleillement doit être de 11 à 16 heures par jour. Une longue durée donnera une croissance plus rapide (Figure 9), des internœuds plus longs, une tige principale unique et large et une teneur plus élevée en glycosides. La photopériode a également un impact sur la floraison puisqu'elle est initiée lorsque les jours sont courts (11 heures). L'intensité lumineuse a une action positive sur la croissance et la teneur des feuilles en stéviolosides [38].

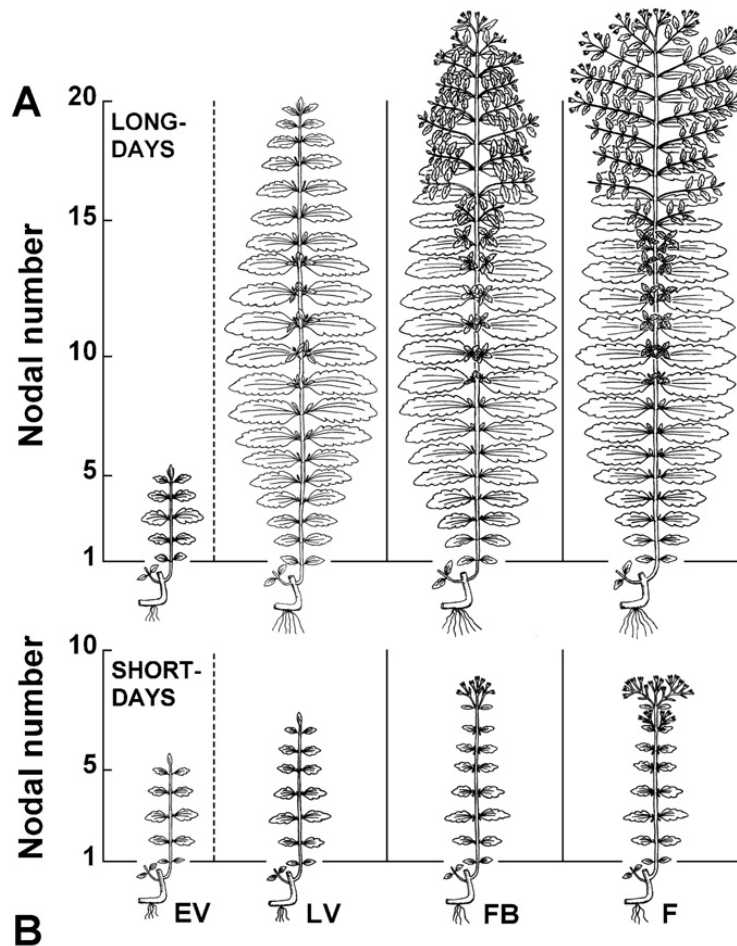


Figure 9 : Ontogénèse de *Stevia rebaudiana* en fonction de la durée d'exposition à la lumière ; avec EV : *Early Vegetative growth* (début de la croissance végétative), LV : *Late Vegetative growth* (fin de la croissance végétative), FB : *Flower Bud formation* (formation des bourgeon) et F : *Flowering* (floraison) [26].

2.2.3. Sol

Le sol doit être acide (pH entre 4 et 5) et sablonneux. La stévia tolère un sol peu fertile avec un taux de matière organique faible. En revanche, il faut éviter les sols salins et alcalins qui ne seront pas supportés.

2.2.4. Eau

Venant d'une région où le climat d'origine est semi-humide subtropical, la stévia nécessite un milieu humide mais qui ne doit pas être soumis à des inondations répétées et prolongées. Elle n'aime pas la restriction d'eau et résiste peu au stress hydrique.

2.2.5. Densité de la population

La densité de peuplement recommandée se situe entre 80.000 et 100.000 plantes par hectare. Cette densité diminue à 50.000 plantes par hectare en cas de cultures pérennes à récoltes multiples. L'écartement entre les lignes doit être de 45 à 65 cm [17].

2.2.6. Pollinisation

Les fleurs de stévia doivent être fécondées par le pollen des autres plantes de stévia pour obtenir des graines viables. Une forte densité d'abeilles (3 à 4 ruches par hectare) est recommandée pour une bonne reproduction des semences [39].

2.3.Récolte

Le délai de croissance avant la récolte se situe entre 54 et 104 jours.

La récolte se déroule différemment en fonction du type de culture ; en effet, une culture pérenne sera récoltée manuellement (prélèvement des feuilles ou coupe des tiges) tandis qu'une culture annuelle sera récoltée mécaniquement (plants coupés au ras du sol). Dans les deux cas, la récolte doit être effectuée juste avant la floraison (initiation du bouton floral) car c'est à cette période que la quantité de stévioides présente dans les feuilles est la plus élevée. Le nombre de récoltes est influencé par les conditions climatiques et varie de 1 à 3 par an. Il est important d'ajouter qu'une récolte réalisée trop tôt dans le développement de la plante rend des graines immatures et donc à faible taux de germination [40].

2.4.Post-récolte

Le séchage est un paramètre important quant à la conservation des glycosides. Immédiatement après la récolte [41], les plants doivent être séchés jusqu'à ce que leur humidité soit inférieure à 10%. Le séchage est soit effectué de manière naturelle au soleil dans les pays qui peuvent le pratiquer, soit dans des séchoirs entre 40 et 50°C. Une fois l'objectif atteint, les feuilles sont séparées des tiges.

Les feuilles séchées sont entreposées à basse température, basse luminosité et faible humidité relative, dans des boîtes scellées aux parois. L'entreposage peut durer jusqu'à deux ans, jusqu'au moment de l'extraction des stévioides [42].

2.5.Organismes nuisibles

Hormis les espèces de *Lepidoptera* (vers-gris ou larves de noctuelles), les attaques par les insectes de *Stevia rebaudiana* sont négligeables. La stévia serait épargnée de ces ravageurs grâce à son goût sucré qui agirait comme un répulsif [20] [42].

En revanche, les attaques fongiques sont plus nombreuses. Un recensement des champignons responsables des maladies a été établi et sont retrouvés: *Septoria steviae*, *Alternaria alternata*, *Sclerotium dephinii* Welch., *Sclerotium rolfsii*, *Erysiphe cichoracearum* DC, *Rhizoctonia solani* Kuehn. et *Sclerotinia sclerotiorum*. Parmi ces champignons, Yadav. et al. [20] décrit les symptômes de quatre de ces maladies (Tableau 1).

Tableau 1 : Description de quatre maladies retrouvées chez *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni [20].

Maladie	Organisme responsable	Symptômes
Tâches sur les feuilles	<i>Septoria steviae</i>	Formation de lésions foliaires déprimées, angulaires, de couleurs gris olive brillant et avec halo chlorotique autour. Les lésions ont tendances à fusionner. Par la suite, les feuilles se nécrosent et tombent.
Tâches sur les feuilles	<i>Alternaria alternata</i>	Apparition de petites tâches circulaires de couleur marron clair. Ensuite, la plupart des tâches deviennent grises et irrégulières ; tandis que d'autres restent circulaires avec des anneaux ou zones concentriques.
Pourriture des racines	<i>Sclerotiu rolfsii</i>	Jaunissement des feuilles qui fanent et qui tombent. Formation d'un mycélium cotonneux sur les zones de flétrissement. Ensuite, le mycélium se propage à la tige et aux racines qui fini par les faire pourrir. Enfin, des sclérotés bruns apparaissent sur les zones malades.
Pourriture de la tige	<i>Sclerotini sclerotiorum</i>	Apparition de lésions marrons sur la tige (près du sol), suivi par son flétrissement. Ces dernières ramollissent la tige conduisant à son effondrement.

3. Histoire de cette plante sucrée

3.1.Origine du nom

Avant de raconter l'histoire de la *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, rappelons pourquoi elle porte ce nom. En isolant les parties de l'appellation, nous retrouvons :

- *Stevia* venant du nom du premier homme ayant découvert cette plante, Pedro Jaime Esteve, botaniste espagnol du XVI^e siècle.
- *rebaudiana* qui provient du nom du premier homme ayant travaillé sur la stévia et réussi à isoler les molécules d'intérêt, Ovidio Rebaudi, chimiste paraguayen du XIX^e siècle.
- "Bertoni" venant du nom du premier homme ayant répertorié et classé la *Stevia*, Moisés Santiago Bertoni, botaniste suisse-italien qui donna le nom final de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni au XX^e siècle.

3.2. Histoire de la Stevia

L'histoire de la Stévia commence chez les indiens Guarani, peuple habitant une région du Paraguay, qui connaissaient l'existence de cette plante bien avant l'arrivée des conquistadors de l'ancien monde. La stévia était connue des Guarani pour son goût différent de toutes autres herbes ou arbustes. Ce goût si particulier, si bon lui a valu son premier nom de *ka'a he'e* signifiant "herbe douce" ou "herbe comme miel", car ne connaissant pas le sucre, le miel était la substance se rapprochant du goût de la stévia. Ces indiens utilisaient couramment les feuilles de la stévia pour [23] :

- améliorer le goût de leur infusion de "maté" (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., 1822),
- un usage médical (hypotenseur, cardiotonique, diurétique),
- simplement être mâchées pour son goût sucré.

Ces utilisations ont été remarquées par les Espagnols dans des documents historiques datant du XVI^e siècle, conservés aux archives nationales du Paraguay à Asunción.

Dans les années 1800, la consommation de stévia est bien ancrée dans tout le pays et se répand même dans les pays voisins tels que le Brésil et l'Argentine [16].

Ce n'est qu'en 1899 que la stévia fût classée dans un répertoire botanique par Moisés Santiago Bertoni qui la décrivit plus en détails. Initialement, n'ayant pas la plante entière mais seulement des parties de la plante, il l'appela *Eupatorium rebaudianum* Bertoni⁶. Un jour de l'année 1904, un habitant de San Pedro offrit à M. S. Bertoni un plant entier de stévia, et le botaniste l'étudiant à nouveau, en 1905, il la change de classe officiellement⁷ et la renomme *Stevia rebaudiana* Bertoni.

À ce même moment⁸, un chimiste paraguayen nommé O. Rebaudi travaille sur les feuilles de la stévia afin d'isoler le ou les glycosides responsables du goût sucré. Puis en 1908, un glycoside est isolé pour la première fois sous forme cristalline, grâce au travail du chimiste allemand P. Rasenack [43]. Les recherches sur l'extraction et l'isolation des substances d'intérêt continuent à travers le Monde ; ainsi en 1931, deux chimistes français, M. Bridel et R. Lavieille, isolent les principaux glycosides qu'ils appellent stéviosides et rébaudiosides. D'autres avancées historiques majeures dans la découverte des glycosides de stéviol sont apparues par la suite (Tableau 2).

⁶ Suite à la publication de nouvelles espèces, le consul britannique à Asunción, H.B.M. Cecil Gosling, informa en 1901 le *Royal Botanic Garden* en Angleterre et envoya une lettre contenant une description en latin de la Stévia, ainsi que quelques parties de la plante [22].

⁷ Publication datant de 1905 [22].

⁸ Publication datant de 1900 [16].

Tableau 2 : Avancées historiques dans la découverte et l'utilisation des stéviolides [44].

Chronological sequence of events	Reference
Report of sweetness of <i>S. Rebaudiana</i> leaves from Paraguay published in a major scientific paper	Gosling 1901
First chemical report on the sweet constituents of Stevia	Bertoni 1905
Realisation that steviolide is a form of glycoside	Dieterich 1908
Production of steviolbioside from steviolide	Wood et al. 1955
Evidence that steviolide is a sophorolide	Vis and Fletcher 1956
Final structures of steviol and isosteviol confirmed	Mosetigg et al. 1963
Steviol chemically synthesised	Cook and Knox, 1970; Mori and Matsui 1970
<i>S. rebaudiana</i> from Brazil cultivated experimentally in Japan	Sumida 1973
Isolation and characterisation of rebaudioside A	Kohda et al. 1976
Minor <i>S. rebaudiana</i> leaf diterpene glycosides obtained	Yamasaki et al. 1976; Kobayashi et al. 1977
Advent of extensive use of <i>S. rebaudiana</i> extracts for sweetening and flavouring of foods and beverages in Japan	Abe and Sonobe 1977; Akashi 1977
From 1982 onwards, large-scale cultivation of <i>S. rebaudiana</i> in mainland China and nearby islands	Kinghorn and Soejarto 1991
Demonstration of mutagenic activity of metabolically activated steviol in a forward mutation test	Pezzuto et al. 1985
First approval of <i>S. rebaudiana</i> products in Brazil	Schwontkowski 1995
During the 1980s, <i>S. rebaudiana</i> leaves become a popular herbal tea in the USA	Blumenthal 1995
First approval of steviolide in South Korea	Korea National Institute of Health 1996
Import ban on <i>S. rebaudiana</i> into USA by FDA (1991)	Blumenthal 1995
FDA import ban on <i>S. rebaudiana</i> leaves rescinded in 1995	Blumenthal 1995
Long-term toxicity test, showing lack of any carcinogenic effects by steviolide, conducted in rats of both sexes in Japan	Toyoda et al. 1997
In USA, rebaudioside A and steviolide are considered as generally recognised as safe (GRAS) products	Curry 2010
Steviol glycosides are permitted as food additive by European Union in December 2011	Stones 2011

En 1943, les premières graines de stévia sont exportées vers le Royaume-Uni, mais leur culture est un échec [20].

En 1964, un premier rapport est rédigé sur une culture commerciale au Paraguay.

En 1968 la stévia est exportée au Japon où elle obtient un grand succès, sa consommation ne s'est jamais interrompue depuis. À partir de 1980, la culture s'étend à d'autres pays comme le Brésil, la Corée, les États-Unis d'Amérique...

En 1999, suite à une étude, un comité d'experts comportant des membres du JECFA ou *Joint Expert Committee on Food Additive* (experts du FAO et de l'OMS) et du CSAH acronyme du Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (experts Européens), refuse l'utilisation des stéviolides comme édulcorant car il n'y a pas suffisamment de données scientifiques [44].

Depuis les années 2000, une succession d'études et de réunions de comités ont permis d'accorder l'utilisation alimentaire des glycosides de stéviol (nourriture et boisson), en fixant une DJA à 4 mg/kg mc/j et un niveau de pureté de 95% selon le JECFA (2008) et de 97%

selon l'AFSSA (2009) [45]. Ces autorisations ont fait l'objet de réévaluations car les avis favorables ont des durées limitées à deux années.

En décembre 2011, les glycosides de stéviol sont autorisés dans l'Union Européenne en tant qu'édulcorant alimentaire et porte le numéro E960 [16] [46].

D'après cet historique, le parcours légal de la plante n'a pas été simple ; cependant ce n'est pas sa culture qui a posé problème aux Autorités mais son utilisation. C'est pourquoi, nous allons maintenant nous intéresser à la composition de la stévia.

SECONDE PARTIE :

COMPOSITION CHIMIQUE DE *Stevia rebaudiana*

Ce chapitre est présent pour définir et décrire les composés chimiques fabriqués par la stévia. La composition biochimique et phytochimique sera détaillée avec une prépondérance pour les glycosides de stéviol. Les aspects pharmacologiques et toxicologiques, ainsi que les aspects réglementaires ne seront pas traités dans ce chapitre, mais respectivement dans les chapitres III (*Stevia rebaudiana* et la santé) et IV (*Stevia rebaudiana* et l'économie).

1. Phytochimie

Avant de débiter cette partie, il est nécessaire de préciser que la composition quantitative de *S. rebaudiana* peut varier d'une culture à une autre, alors que la composition qualitative n'est pas modifiée. Il est souvent reporté que les variations relatives aux différentes méthodes de cultures (composition du sol, ensoleillement, irrigation, récolte...), entraînent une variation sur la teneur en molécules d'intérêt, la composition chimique restant invariée.

1.1.Composition chimique

Depuis les origines de l'Homme, les plantes sont utilisées à des fins nutritives mais également médicinales. L'effet médicinal, produisant un effet physiologique sur le corps humain, réside dans la composition chimique des plantes. Ces constituants bioactifs sont en majorité des alcaloïdes, des tanins et des polyphénols [47], mais dans la stévia, il y a aussi beaucoup de terpènes et de flavonoïdes. Les espèces phytochimiques présentes sont entre autres, l'austroïnine, le β -carotène, le dulcoside, la niacine, la riboflavine, le stéviol, le stéviolside, la thiamine... [48]. Un tableau non exhaustif, mais rassemblant les principaux constituants chimiques de la stévia est présenté en annexe 1.

Les données de criblage phytochimique ont montré que les tanins sont présents en concentration élevée, suivis par les alcaloïdes, les glycosides, les saponines, les stérols et triterpènes, les anthraquinones et d'autres composés réducteurs [49].

Dans ce travail de thèse, les molécules qui suscitent notre intérêt sont les glycosides de stéviol, car ce sont les responsables du goût sucré de la stévia et donc les responsables de la particularité de cette plante. Concernant ces substances, leur concentration peut aller jusqu'à 30% dans les feuilles sèches [50]. Les quatre composés les plus abondants sont le stéviolside, le rébaudioside A, le rébaudioside B et le rébaudioside C (Annexe 1). Toutefois, des études plus récentes indiquent que le rébaudioside B n'est pas un constituant direct de la stévia, mais un composé formé par l'hydrolyse partielle du rébaudioside A pendant l'extraction (1.2.1. Glycosides de stéviol) [22] [51]. Le dulcoside A est alors le quatrième hétéroside le plus

répandu dans les feuilles de stévia (Tableau 3). Concernant plus précisément les glucides, les protéines, les minéraux, les lipides et les vitamines ils seront traités dans la partie 2. (Aspects nutritionnels).

Tableau 3 : Constituants chimiques majeurs de *Stevia rebaudiana* [49].

Constituants	Valeur (g/100g de masse sèche)
Glucides	35,2
Protéines	12,0 - 20,42
Lipides	2,7 - 4,34
Stévioside	4 - 14
Rébaudioside A	2 - 4
Rébaudioside C	1 - 2
Dulcoside A	0,4 - 0,7
Rébaudioside D,E,F; stéviolbioside; rubusoside	> 0,4

1.2. Structure chimique

1.2.1. Glycosides de stéviol

La particularité de *S. rebaudiana* provient de son goût sucré. Les édulcorants naturels extraits des feuilles de stévia, appelés glycosides de stéviol sont tous issus d'une même molécule. Ce précurseur est l'acide *ent*-kaurénoïque hydroxylé, plus communément appelé stéviol (Figure 10). Le stéviol est un aglycone de la famille des diterpènes tétracycliques.

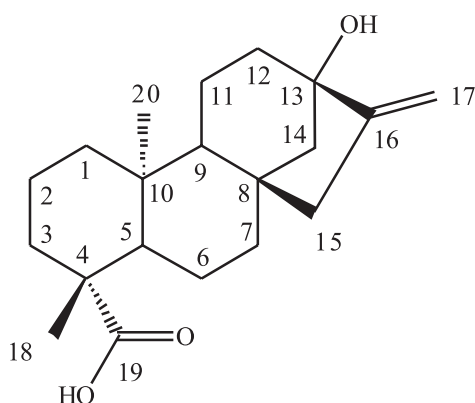


Figure 10 : Structure du stéviol [52].

Les glycosides de stéviol quant à eux, possèdent une partie glucidique supplémentaire leur offrant un goût sucré. Ces oses sont fixés au squelette de stéviol en deux endroits :

- Carbone n°13 : liaison de type osidique (*O*-hétéroside),
- Carbone n°19 : liaison de type ester sur le COOH.

La figure 11 représente la molécule de stéviolside, c'est un exemple illustrant les deux types de liaisons, osidique et ester respectivement en C13 (bas de la figure) et C19 (haut de la figure), rencontrées chez tous les glycosides de stéviol.

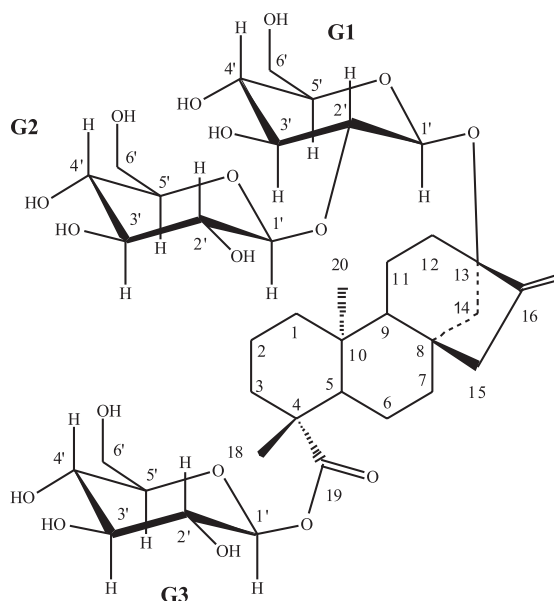


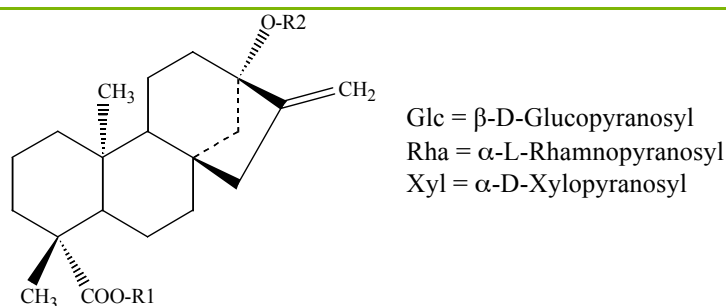
Figure 11 : Structure du stéviolside montrant la partie aglycone au centre, entourée par des groupements glucose G1, G2 et G3 [52].

Selon la JECFA, en 2007, les glycosides de stéviol isolés et identifiés étaient au nombre de dix : stéviolbioside, stéviolside, rébaudioside A à F, rubusoside et dulcoside [50] [53]. Les structures chimiques de ces hétérosides sont rassemblées dans le tableau suivant (Tableau 4).

Bien qu'ils soient classés, le rébaudioside B et le stéviolbioside ne seraient pas des constituants directs de la stévia, mais des artéfacts liés au procédé d'extraction. En effet, il y aurait une hydrolyse partielle de la fonction ester (facilement hydrolysable en milieu alcalin) entraînant la perte du groupement glucose porté par le C19, ce qui transformerait le rébaudioside A en rébaudioside B et le stéviolside en stéviolbioside⁹ [22] [51].

⁹ Bien que le stéviolbioside serait le précurseur du stéviolside au niveau de la biosynthèse végétale [54].

Tableau 4 : Structures chimiques et pouvoirs sucrant des principaux glycosides de stéviol [44] [53] [55].



Nom du composé	R1	R2	Formule	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	Pouvoir sucrant
Stéviolbioside	H	Glc-Glc(2→1)	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642,73	90
Stévioside	Glc	Glc-Glc(2→1)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804,88	210
Rébaudioside A (Rébiana)	Glc	Glc-Glc(2→1) Glc(3→1)	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967,01	200
Rébaudioside B	H	Glc-Glc(2→1) Glc(3→1)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804,88	150
Rébaudioside C (Dulcoside B)	Glc	Glc-Rha(2→1) Glc(3→1)	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	951,01	30
Rébaudioside D	Glc-Glc(2→1)	Glc-Glc(2→1) Glc(3→1)	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	1129,15	221
Rébaudioside E	Glc-Glc(2→1)	Glc-Glc(2→1)	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967,01	174
Rébaudioside F	Glc	Glc-Xyl(2→1) Glc(3→1)	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	936,99	200
Rubusoside	Glc	Glc	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642,73	114
Dulcoside A	Glc	Glc-Rha(2→1)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	788,87	30

Le pouvoir sucrant de référence est le saccharose avec un pouvoir de 1.

Les recherches ont été poursuivies et cinq glycosides mineurs ont été trouvés [56] [57], ce qui porte le nombre total de glycosides de stéviol à quinze (Annexe 2). Parmi ces nouveaux hétérosides, deux font l'objet de remarques :

- Le premier ne possède pas le même squelette de base que les autres glycosides de stéviol, la différence vient d'un déplacement de la double liaison C16-C17 à C15-C16 (Figure 12).
- Le second, appelé rébaudioside M ou rébaudioside X a un pouvoir sucrant d'environ 200 à 350 fois supérieur au saccharose [55], ce qui le place devant le stévioside et le rébaudioside A (Tableau 5).

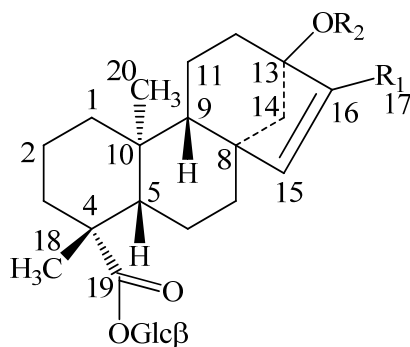


Figure 12 : Structure d'un glycoside de stéviol mineur présent dans la stévia ; avec Glcβ = β-D-Glucopyranosyl ; R₁ = CH₃ ; R₂ = Glcβ -Glcβ(2→1) [58].

Tableau 5 : Structure chimique et pouvoir sucrant d'un nouveau glycoside de stéviol [55].

Glc = β-D-Glucopyranosyl

Nom du composé	R1	R2	Formule	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	Pouvoir sucrant
Rébaudioside M (Rébaudioside X)	Glc-Glc(2→1) Glc(3→1)	Glc-Glc(2→1) Glc(3→1)	C ₅₆ H ₉₀ O ₃₃	1291,30	250

1.2.2. Labdanes

D'autres diterpènes ont été isolés de *S. rebaudiana*. Ces diterpènes de type labdane sont faiblement présents dans les feuilles de stévia. Les deux principaux sont le 6-O-austroinuline et l'austroinuline (Figure 13) retrouvés respectivement à un pourcentage massique de 0,15 et 0,06%_m. Ensuite, vient le jhanol et la série des stérébines (Figure 14).

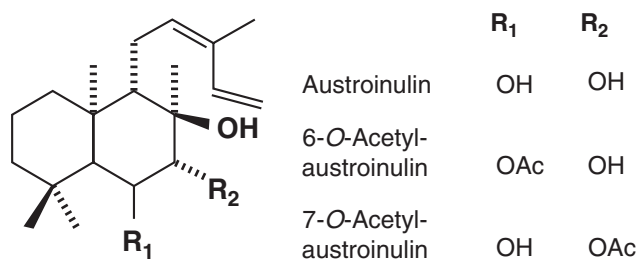


Figure 13 : Structures des principaux labdanes retrouvés chez *Stevia rebaudiana* [44].

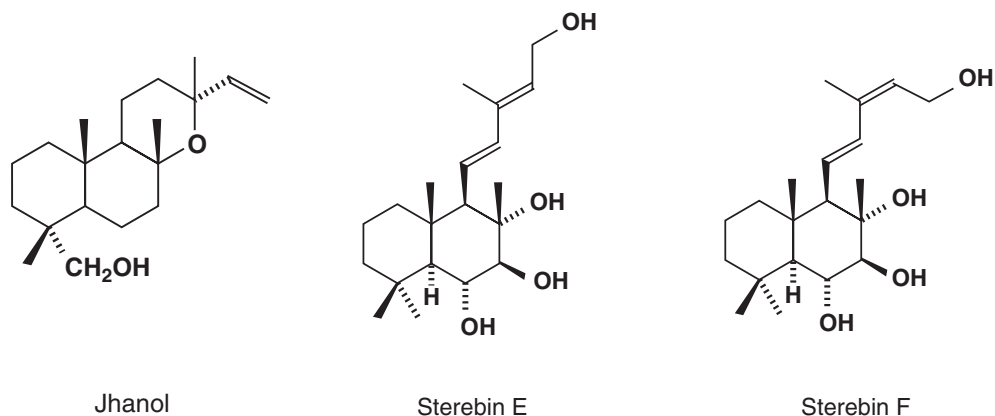


Figure 14 : Structures du jhanol et stérébine E - F extraits de *Stevia rebaudiana* [22].

1.2.3. Triterpènes et stérols

Ces molécules sont retrouvées à l'état de traces dans la stévia. Les stérols majoritairement présents sont le stigmastérol et le β -sistostérol (Figure 15). Leur concentration respective est de 45,8 et 39,4% de la fraction totale de stérols.

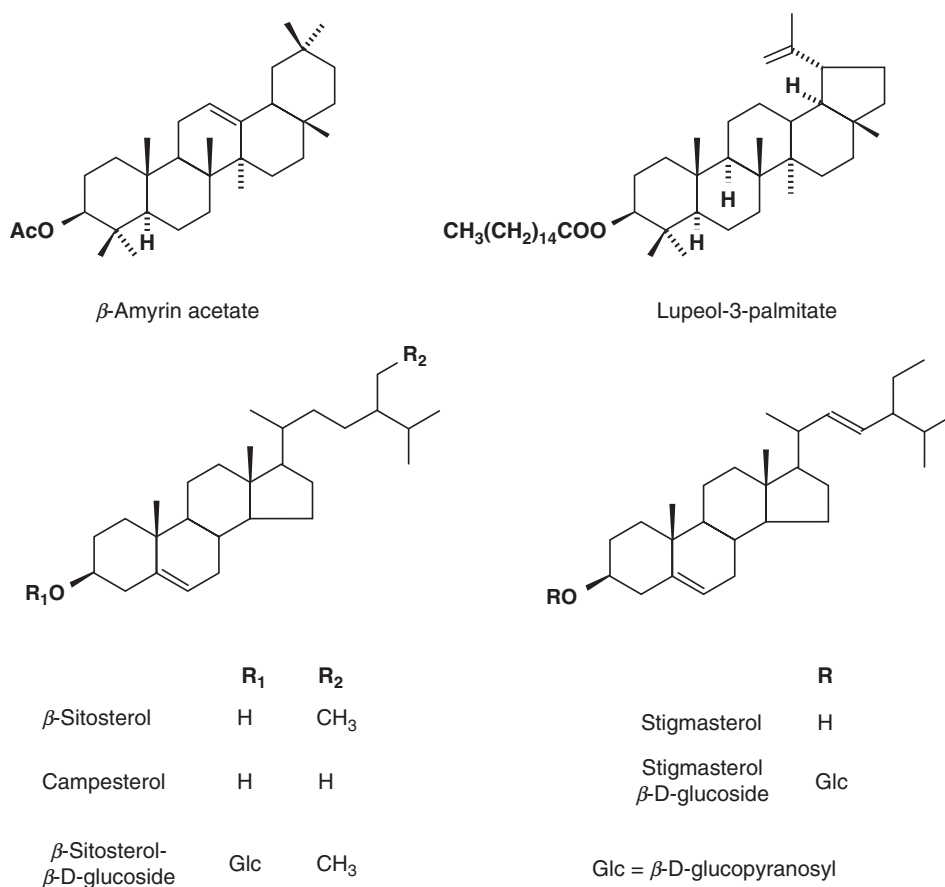
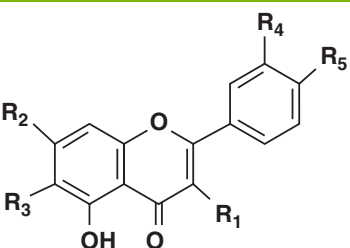


Figure 15 : Structures de triterpénoïdes et stérols extraits de *Stevia rebaudiana* [44].

1.2.4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes ou bioflavonoïdes sont des substances retrouvées chez les plantes. Ces métabolites secondaires possèdent tous un même squelette de base (Tableau 6). Ils sont en partie responsables de la coloration des fleurs et peuvent avoir des propriétés médicinales (non démontré chez *S. rebaudiana*).

Tableau 6 : Structures de flavonoïdes isolés à partir de *Stevia rebaudiana* [44].

 Glc = O-β-D-Glucopyranosyl Rha = O-α-L-Rhamnopyranosyl Ara = O-α-L-Arabinopyranosyl Rut = 6-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-Glucopyranosyl					
Nom du composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Apigénine 4'-O-glucoside	H	H	OH	H	Glc
Kaempferol 3-O-rhamnoside	Rha	H	OH	H	OH
Lutéoline 4-O-glucoside	H	H	Glc	OH	OH
Quercétine 3-O-arabinoside	Ara	H	OH	OH	OH
Quercétine 3-O-glucoside	Glc	H	OH	OH	OH
Quercétine 3-O-rhamnoside	Rha	H	OH	OH	OH
Centaureidine	OMe	OMe	OH	OH	OMe
Apigénine 7-O-glucoside	H	H	Glc	H	OH
Quercétine 3-O-rutinoside	Rut	H	OH	OH	OH

1.3. Biosynthèse des glycosides de stéviol

La biosynthèse des glycosides de stéviol a été beaucoup étudiée au cours des dernières années [54] [59] à [63] ; cette voie de fabrication complexe nécessite douze étapes pour obtenir du stéviol. Elle se réalise à partir des molécules primaires comme le pyruvate et le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) pour aboutir à la formation du géranylgéranyl-diphosphate impliqué dans les voies biosynthétiques des diterpènes et tétraterpènes [64]. À partir du géranylgéranyl-diphosphate, quatre étapes supplémentaires sont nécessaires pour aboutir à la formation du rébaudioside A (Figure 16). Bien que la plupart de la biosynthèse ait été élucidée (Figure 16 et 17), il reste quelques zones d'ombres (enzyme non identifié, rôle de l'appareil de Golgi, transport dans la vacuole...).

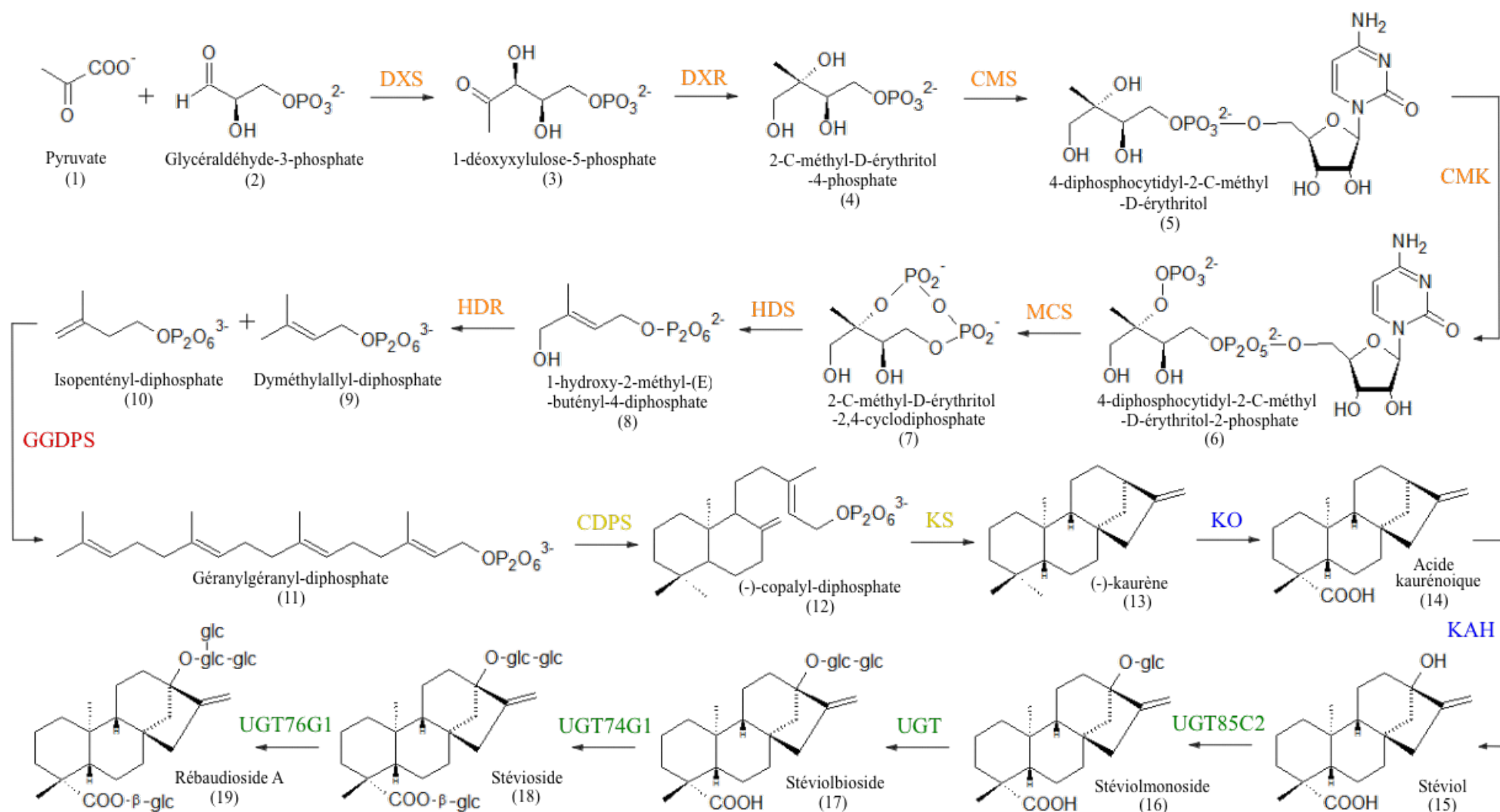


Figure 16 : Biosynthèse des glycosides de stéviol (Enzymes situées dans le chloroplaste : orange, rouge et jaune ; enzymes situées dans le réticulum endoplasmique : bleue ; enzymes situées dans le cytosol : verte) [54].

La biosynthèse se déroule dans plusieurs organites de la cellule (chloroplaste et réticulum endoplasmique¹⁰), ainsi que dans le cytosol et le stockage dans les vacuoles (figure 18). Comme il y a principalement quatre lieux impliqués [20] [54], la description se fera en quatre parties et s'appuiera sur la figure 16.

1.3.1. Chloroplaste

Dans cet organite se déroule les trois premières grandes étapes de la biosynthèse des glycosides de stéviol (figure 16) :

- La voie du MEP/DOXP¹¹ (enzymes oranges) : cette voie dite non mévalonique, permet d'obtenir de l'IPP (10) et du DMAPP (9) (respectivement IsoPentényl-Pyrophosphate et DiMéthylAllyl-PyroPhosphate¹²) à partir du pyruvate (1) de G3P (2). Il y a une cascade de sept réactions enzymatiques comportant quatre types d'enzymes, les synthases (DXS, CMS, MCS et HDS), les réductoisomérases (DXR) les kinases (CMK) et les réductases (HDR).
- La voie de la gibbérellone :
 - Action de l'enzyme GGDPS (enzyme rouge) : l'IPP (10) et le DMAPP (9) sont assemblées sous l'action d'une synthase (GGDPS), ce qui forme le GGPP (11) (GéranylGéranyl-PyroPhosphate¹³).
 - Cyclisation (enzymes jaunes) : Le GGPP (11) subit deux étapes de cyclisation grâce à la CDPS et la KS qui sont deux enzymes synthases. Cette cyclisation du GGPP aboutit sur la formation d'une molécule d'*ent*-kaurène (13). Ensuite, la molécule sort du chloroplaste pour rejoindre les cytochromes P450 du réticulum endoplasmique [20].

1.3.2. Réticulum endoplasmique

Arrivée dans le réticulum endoplasmique (enzymes bleues), l'*ent*-kaurène (13) suit encore la voie des gibbérellines. Sur son carbone C19, elle est oxydée en trois étapes en acide *ent*-kaurénoïque (14), à l'aide de l'enzyme KO qui est une mono-oxygénase de type P450 (famille du CYP701A5) [54].

¹⁰ Il y aurait également l'appareil de Golgi, mais son rôle n'est pas clairement défini [20].

¹¹ MEP : 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate et DOXP : 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate.

¹² Également appelées isopentényl-diphosphate et diméthylallyl-diphosphate.

¹³ Également appelée géranylgéranyl-diphosphate.

À partir de l'acide *ent*-kaurénoïque (14), la voie de la gibbérelline est abandonnée au profit de la voie du stéviol. La première enzyme de cette nouvelle voie est une hydroxylase (KAH) et agit en C13 pour former un alcool tertiaire. La molécule obtenue est un stéviol (15) et quitte le réticulum endoplasmique pour se diriger dans le cytosol.

Ces deux étapes sont importantes, car elles induisent des groupements ou sites accepteurs, permettant la fixation des sucres sur la molécule.

1.3.3. Cytosol

Une fois arrivée dans le cytosol, le stéviol (15) suit la voie des glycosides de stéviol. Cette voie a pour but de passer d'une molécule aglycone (15) à un hétéroside (16, 17, 18, 19) et permet de stabiliser les molécules, de détoxifier et de solubiliser les métabolites.

Le stéviol est pris en charge par des glycosyltransférases (enzymes vertes), de la famille des UGT ; avec comme ordre d'apparition UGT85C2, UGT, UGT74G1 et UGT76G1. Elles ont toutes le rôle de fixer un ose, mais de manière différente : fixation d'un sucre en C13 ou C19 et fixation d'un sucre sur un sucre déjà présent en C13 [54].

La première lettre de ces enzymes est un "U" qui signifie "Uridine diphosphate" (UDP), en raison de la dépendance des glycosyltransférases à l'UDP-glucose [60] [65a]. Un criblage a été réalisé pour déterminer leur structure et parmi les quatre enzymes entrant en action, seulement trois ont été élucidées [60], c'est pourquoi une des enzymes ne comporte pas de suffixe.

D'autres voies de formation des glycosides de stéviol existent mais sont minoritaires (Figure 17). Ces voies nécessitent seulement deux des quatre enzymes utilisées dans la voie majoritaire.

Le rébaudioside A (19) est la molécule finale de cette biosynthèse. Avec le stévioside (18) qui est son précurseur, il est donc normal que ces deux hétérosides soient retrouvés en majorité dans la stévia. Les glycosides mineurs tels que le rébaudioside C, le rébaudioside F ou encore le dulcoside A sont obtenus par action d'autres enzymes ajoutant soit des unités de glucose, soit des unités de sucres différents (rhamnose, xylose).

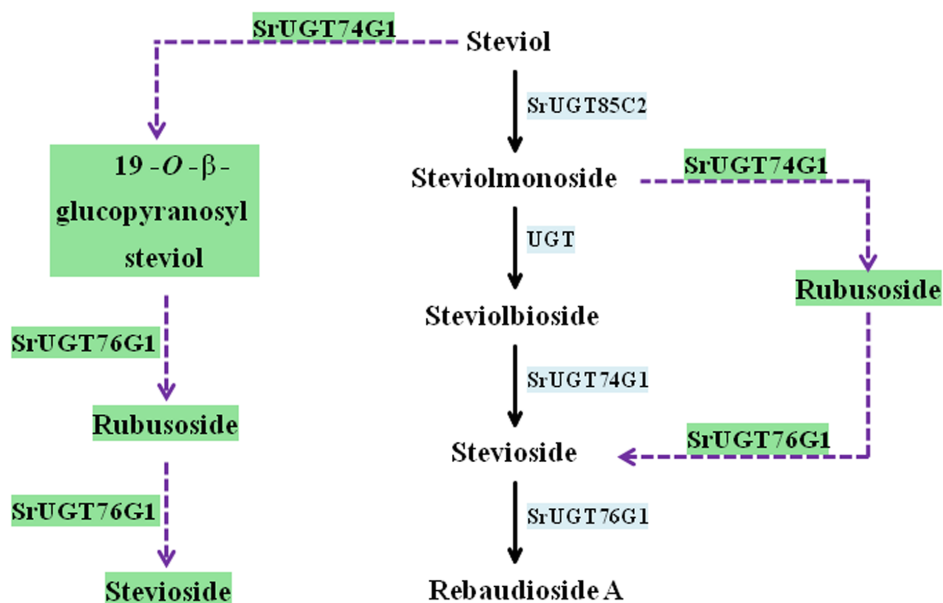


Figure 17 : Voie majeure (flèches pleines noires) et voies mineures (flèches en pointillés violets) de la biosynthèse des glycosides de stéviol [59].

1.3.4. Vacuole

Les glycosides ainsi formés ne restent pas dans le cytosol, mais sont stockés dans les vacuoles. Ce passage au sein de la vacuole n'est pas entièrement connu, toutefois des hypothèses sont émises quant aux transporteurs entrant en jeu : des transporteurs de la famille des Major Facilitor (MFS) et des Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) utilisant l'énergie de gradient ionique ou de gradient de proton ; des transporteurs de la famille des ATP-Binding Cassette (ABC) utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse d'ATP [54].

La biosynthèse est résumée sous forme schématique (Figure 18) en indiquant la localisation des étapes.

Pour faire face aux variations de concentration des hétérosides d'intérêt, des techniques de synthèse chimique ont été mises en place par la main de l'homme [66] [67]. Elles sont de différentes natures et peuvent utiliser des micro-organismes comme des bactéries (*Escherichia coli*, bacilles gram positifs), des levures (*Saccharomyces*, *Pichia*, *Yarrowia*), et des cellules végétales (algue, plante) [67].

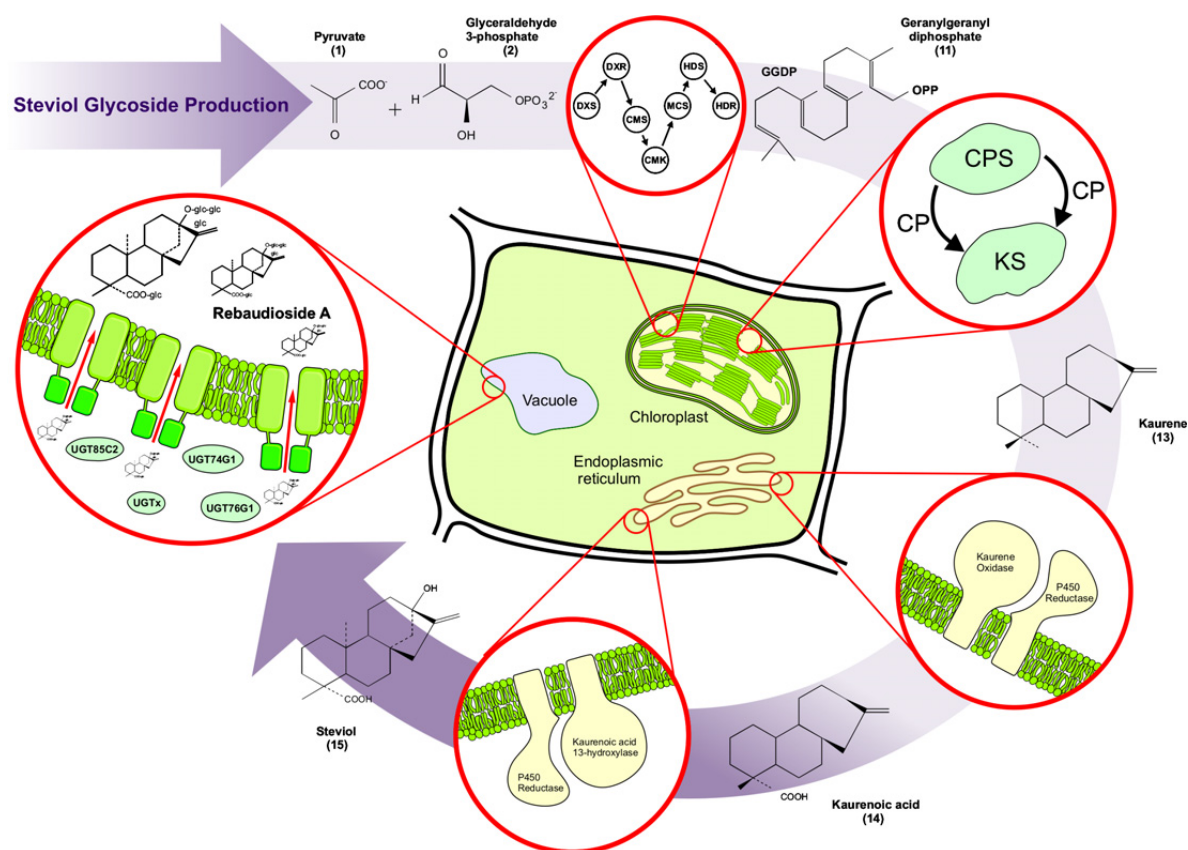


Figure 18 : Schéma artistique de la biosynthèse de glycoside de stéviol avec la localisation des étapes [54].

1.4.Génétique

Au sein de *S. rebaudiana*, quinze gènes impliqués dans la biosynthèse des glycosides de stéviol ont été identifiés. Ces gènes sont SrDXS, SrDXR, SrMCT, SrCMK, SrMDS, SrHDS, SrHDR, SrIDI, SrGGDPS, SrCPS1, SrKS1-1, SrKO1, SrUGT85C2, SrUGT74G1 et SrUGT76G1 [68]. Ils sont retrouvés dans toutes les parties de la plante, mais ne sont pas exprimés de la même façon. Par exemple, les gènes SrDXR et SrKO sont beaucoup exprimés dans les feuilles du premier noeud et le sont moins dans les feuilles du cinquième noeud. L'expression de ces deux gènes montre qu'il y a une corrélation positive avec le contenu en glycosides de stéviol. De manière similaire, il y a une expression plus élevée de ces quinze gènes dans les feuilles que dans les tiges et racines, ce qui indique une nouvelle fois le lien entre l'expression de ces gènes et la quantité de glycosides de stéviol [69]. Les séquences des amorces pour l'analyse de la transcription sont retrouvées en annexe 3.

1.5. Pouvoir sucrant

Le pouvoir sucrant est estimé selon la différence de goût par rapport à une référence : le saccharose, qui a un pouvoir sucrant égal à 1. La mesure est relativement subjective puisque le goût n'est pas quantifiable.

La stévia possède des molécules dégageant un fort pouvoir sucrant (Tableaux 4 et 5) tels que les rébaudiosides A, D et M qui sont respectivement environ 200, 221 et 250 fois plus sucrants que le saccharose, ainsi que le stéviolside qui a un pouvoir sucrant de 210 [55].

Suite aux études des structures chimiques et aux études organoleptiques, trois relations structure-activités découlent :

- Le pouvoir sucrant n'est pas lié au nombre d'oses présents sur la molécule ; par exemple, le stéviolside qui comporte 3 oses a un pouvoir sucrant plus élevé que le rébaudioside E qui possède 4 oses et un pouvoir sucrant moins élevé que le rébaudioside M qui détient 6 oses.
- Le remplacement d'une unité glucose par un rhamnose diminue le pouvoir sucrant ; pour illustrer, le stéviolside est plus sucrant que le dulcoside A.
- Le remplacement d'une unité glucose par un xylose ne modifie pas le pouvoir sucrant ; par exemple, le rébaudioside A montre le même pouvoir sucrant que le rébaudioside F.

2. Aspects nutritionnels

2.1. Glucides

Un glucide est un sucre pouvant être :

- Simple : monosaccharide ou disaccharide qui est la principale source d'énergie dans le métabolisme humain.
- Complexe ou ramifié : polysaccharide servant au stockage de l'énergie.

La stévia est une bonne source nutritionnelle de glucides puisqu'elle en contient 35 à 62 g/100 g de matière sèche [25], dont des stéviolsides et rébaudiosides, ainsi que des fructo-oligosaccharides de type inuline. D'après Braz de Oliveira [70], ces derniers possèderaient des propriétés fonctionnelles importantes notamment sur le contrôle du diabète.

2.2. Protéines

Une protéine est une molécule composée de plusieurs acides aminés (Annexe 4), pouvant porter le nom d'oligopeptide quand elle comporte quelques acides aminés ou le nom de polypeptide lorsqu'elle en possède plus. Les protéines possèdent de nombreux rôles, par exemple dans la croissance, dans la réparation cellulaire... ce qui en font des éléments indispensables au maintien de l'homéostasie. Cependant, leur durée de vie est plus ou moins longue, elles doivent donc être renouvelées sans cesse par l'intermédiaire des voies de synthèse et de dégradation protéiques (Annexe 5), ce qui explique le besoin d'un apport continu [71].

La qualité d'apports protéiques de la stévia peut être déterminée en mesurant la teneur totale en protéines et en analysant les différents types d'acides aminés présents, en particulier les acides aminés essentiels ou indispensables¹⁴.

La teneur totale en protéines dans les feuilles de stévia se situe autour de 10 à 20 g/100 g de matière sèche [25], ce qui en fait une bonne source protéique. Les acides aminés rencontrés chez *S. rebaudiana* sont au nombre de 17, dont 10 sont des acides aminés essentiels (Tableau 7). La stévia comporte 10 acides aminés indispensables sur 11, ce qui fait d'elle une bonne source nutritive.

Tableau 7 : Comparaison de la composition en acides aminés des feuilles de *Stevia rebaudiana* avec les besoins journaliers en acides aminés essentiels.

Composition des feuilles de <i>Stevia rebaudiana</i> B. (matière sèche) [72]				Besoins journalier en acides aminés essentiels chez l'adulte selon l'AFSSA [71]	
Acides aminés essentiels	g/100 g	Acides aminés non essentiels	g/100 g	Acides aminés essentiels	g/100 g
Arginine ^a	0,45	Aspartate	0,37	Tryptophane	0,04
Lysine	0,70	Serine	0,46	Lysine	0,30
Histidine	1,13	Acide Glutamique	0,43	Histidine	0,11
Phénylalanine	0,77	Proline	0,17	Acides aminés aromatiques (Phénylalanine + Tyrosine)	0,27
Leucine	0,98	Glycine	0,25	Leucine	0,39
Méthionine	1,45	Alanine	0,56	Acides aminés soufrés (Méthionine + Cystéine)	0,15
Valine	0,64	Cystéine ^b	0,40	Valine	0,18
Thréonine	1,13	Tyrosine ^b	1,08	Thréonine	0,16
Isoleucine	0,42			Isoleucine	0,18
Total	7,67	Total	3,72	Total	1,78

^a : Considéré comme non essentiel selon l'AFSSA [71].

^b : Considéré comme essentiel dans certaines situations [72].

¹⁴ Acides aminés non synthétisés par le corps humain, au nombre de 11 (Tableau 7).

2.3.Minéraux

Les minéraux sont des éléments chimiques essentiels dans le métabolisme animal. Ils sont classés en deux catégories en fonction des besoins de l'organisme [73] :

- Macro-élément ou élément majeur : besoin important tel que le sodium, le magnésium, le phosphore, le soufre, le chlore, le potassium et le calcium.
- Oligo-élément ou élément mineur : besoin moindre tel que le chrome, le manganèse, le fer, le cobalt, le cuivre, le zinc, le sélénium, le molybdène et l'iode.

Les minéraux contenus dans les feuilles de stévia sont présentés dans le tableau 8, qui est un résumé de plusieurs études afin d'obtenir une fourchette de valeur.

Tableau 8 : Minéraux contenus dans les feuilles de *Stevia rebaudiana* (mg/100 g) [15].

Minéraux	Références					
	Mishra et al. (2010)	Goya et al. (2010)	Serio (2010)	Tadhani et Subhash (2006)	Kaushik et al. (2010)	Abou-arab et al. (2010)
Calcium	464,4	544	600	1550	722	17,7
Phosphore	11,4	318	318	350	ND ^a	ND ^a
Sodium	190	89,2	ND ^a	160	32,7	14,93
Potassium	1800	1780	1800	2510	839	21,15
Fer	55,3	3,9	3,9	36,3	31,1	5,89
Magnésium	349	349	500	ND ^a	ND ^a	3,26
Zinc	1,5	1,5	ND ^a	6,39	ND ^a	1,26

^a : Non déterminé

2.4.Lipides

Les lipides sont des molécules constituées d'acides gras, formant un grand groupe diversifié (stérols, phospholipides, triglycérides...). Le monde animal et végétal sont capables de les synthétiser, cependant l'Homme n'est pas capable de synthétiser tous les lipides dont il a besoin, il doit donc avoir un apport extérieur.

La stévia peut répondre à ce besoin, car dans l'huile de ses feuilles six acides gras ont été identifiés (Tableau 9). Parmi ces acides gras, il y a une forte concentration en acide linoléique ; cette valeur élevée peut contribuer à maintenir un rapport d'acide gras idéal dans le régime alimentaire humain.

Tableau 9 : Composition en acide gras de l'huile de feuille de *Stevia rebaudiana* [15].

Acides gras	g/100 g
Acide palmitique (C16)	27,51
Acide palmitoléique (C16-1)	1,27
Acide stéarique (C18)	1,18
Acide oléique (C18-1)	4,36
Acide linoléique (C18-2)	12,40
Acide linolénique (C18-3)	21,59

2.5. Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques présentes dans les aliments à doses infimes et nécessaires au métabolisme. On les regroupe, non pas parce qu'elles sont chimiquement proches ou ont des rôles physiologiques similaires, mais parce que ce sont des substances essentielles de l'alimentation et qu'elles ont été découvertes lors des recherches sur les maladies résultant de leur carence [73]. Il y a treize vitamines classées en deux catégories, les vitamines liposolubles au nombre de quatre (Vitamines A, D, E et K) et les vitamines hydrosolubles au nombre de neuf (huit vitamines du groupe B et la vitamine C).

Une étude menée en 2010 [74] détermine les concentrations des vitamines hydrosolubles extraites des feuilles et des cals de stévia (Tableau 10). Les résultats montrent que trois vitamines sont présentes (vitamine B2, B9 et C), dont deux d'entre elles sont en proportion beaucoup plus élevée dans les feuilles. De plus, la vitamine la plus présente dans les feuilles est la vitamine B9, tandis que dans les cals c'est la vitamine C.

Tableau 10 : Vitamines hydrosolubles extraits des feuilles et cals de *Stevia rebaudiana* B (matière sèche) [74].

Vitamines	Feuilles (mg/100 g)	Cals (mg/100 g)
Vitamine B1 (Thiamine)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Vitamine B2 (Riboflavine)	0,43 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Vitamine B3 (Niacine)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Vitamine B6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Vitamine B9 (Acide folique)	52,18 ± 0,21	0,09 ± 0,01
Vitamine C (Acide L-ascorbique)	14,98 ± 0,07	1,64 ± 0,02

Valeurs moyennes déterminées trois fois (n = 6) ± les déviations standards.

3. Intérêts alimentaire et médicinal

Les constituants de la stévia suscitent de multiples intérêts, du fait qu'ils possèdent des propriétés médicinales ainsi que des propriétés gustatives particulières sans apporter de calories [15] [17] :

- Usage alimentaire : édulcorant (gâteaux, boissons...).
- Usage médicinal :
 - Tanins, flavonoïdes, glycosides de stéviol : activité antimicrobienne notamment sur *Salmonella typhi*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.
 - Flavonoïdes : activité antioxydante.
 - Glycosides de stéviol : régime diététique (diminution des apports caloriques et diminution du cholestérol), alimentation pour diabétique, amélioration de la régénération cellulaire, augmentation de la coagulation sanguine, activité diurétique, activité anti-inflammatoire, inhibition de la formation des cavités et des plaques dentaires, utilisation dermatologique (eczéma, acné...)...

Parmi toutes ces propriétés, l'usage dans un but diététique est le plus reconnu. Toutefois, le patient devra prendre quelques précautions quant à l'utilisation des glycosides de stéviol au quotidien, que ce soit au niveau quantitatif (recommandations officielles) ou au niveau qualitatif (respect du pH et de la température pour éviter la dégradation...). Ces informations seront retrouvées dans le chapitre III (*Stevia rebaudiana* B. et la santé) et IV (*Stevia rebaudiana* B. et l'Économie).

4. Sources et variations quantitatives des glycosides de stéviol

Les organes végétaux ne sont pas égaux en terme de concentration en glycosides de stéviol. Un classement des parties de la plante, des plus concentrées aux moins concentrées, est établi : feuilles, fleurs, tiges, graines et quasi-absence dans les racines [20] [21]. Par exemple, la première source de stéviolside et de rébaudioside A se trouve dans les feuilles avec une quantité allant de 5 à 20%_m ; la seconde source située dans les fleurs, de concentration plus faible autour de 0,9 à 1%_m [75]. Ces résultats sont confirmés dans un test sensoriel puisque le goût sucré des feuilles est deux fois plus élevé que celui des inflorescences [76]. Néanmoins, ce classement est différent en fonction de la maturité de la plante ainsi la fleur peut passer de la deuxième à la quatrième position [23].

La distribution de ces hétérosides dans chaque organe est différente, toutefois elle peut varier au sein d'un même organe de la même plante [77], ou d'un même organe d'un plant à un autre (facteurs environnementaux) [20] [78].

L'environnement est l'acteur prépondérant dans les variations de quantité de glycosides de stéviol (Figure 19), mais de nombreux autres critères interviennent [17] [38] [39] [41] [68] [79]:

- La photopériode : plus elle est longue, plus la quantité de glycosides sera importante,
- L'âge : une plante jeune contient moins de glycosides qu'une plante plus âgée,
- Le moment de récolte : la concentration en glycosides diminue pendant la période de floraison,
- Le climat, le sol, l'irrigation, variété...

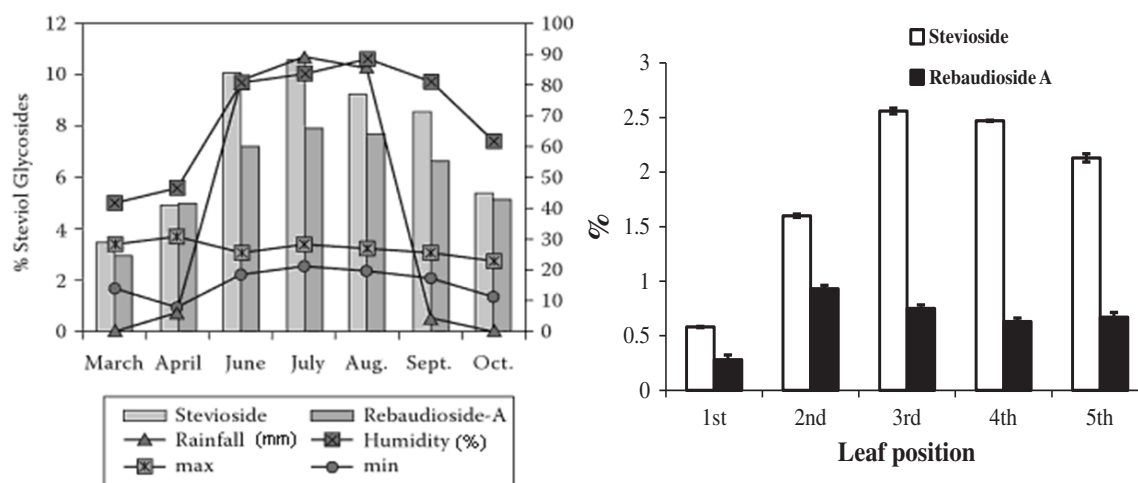


Figure 19 : A gauche : Effets des conditions environnementales sur la concentration en stéviol et rébaudioside A dans les feuilles de stévia [25] ; A droite : Evolution de la concentration en stéviol et rébaudioside A en fonction de la position de la feuille sur la tige [69].

En raison des différences de concentrations en glycosides d'un champ de stévia à un autre, complété par une importance économique de ces composés, des méthodes de synthèse ont été développées [66] [80] à [82]. Cette nouvelle source qu'est la synthèse chimique offre un rendement fixe en stéviol. Cependant à l'échelle industrielle, elle est plus difficile à mettre en oeuvre qu'une extraction à partir de la plante par solvant ou par séparation membranaire [44].

5. Extraction des glycosides de stéviol

Pour extraire des composés bioactifs à partir de plantes, de nombreuses techniques existent ; les méthodes dites conventionnelles telles que le chauffage à reflux ou l'appareil de Soxhlet et les méthodes modernes telles que l'extraction à l'eau chaude pressurisée, l'extraction avec des fluides supercritiques, extractions assistées par ultrasons ou micro-ondes [83] à [87].

5.1.Généralités

Les spécifications sont issues du règlement UE n°231/2012 [88]. Elles sont en accord avec celles établies par la JECFA [89].

5.1.1. Description

L'extrait ou produit fini doit avoir l'aspect d'une poudre de couleur blanche à jaune claire, avec un pouvoir sucrant situé aux alentours de 200 à 300 fois supérieur à celui du saccharose¹⁵. Sa composition doit être au minimum égale à 95% en stéviolside, rébaudioside A, B, C, D, E et F, stéviolbioside, rubusoside et dulcoside A sur la base de la matière sèche [88]. La composition est qualitativement variable car d'une culture à une autre, les proportions de glycosides sont différentes.

Avec la méthode d'extraction préconisée par la réglementation européenne, d'autres glycosides de stéviol apparentés pouvant être obtenus au terme du processus de production, mais non présents naturellement dans le végétal *S. rebaudiana* ont été identifiés en faibles quantités (0,10 à 0,37% m/m).

5.1.2. Identification

L'identification des glycosides de stéviol est obtenue à partir de trois critères [88] :

- La solubilité : légèrement à facilement soluble dans l'eau. Sans spécification pour d'autres liquides,
- La chromatographie : le pic principal du chromatogramme doit correspondre soit au stéviolside, soit au rébaudioside A,
- Le pH : il doit être situé entre 4,5 et 7,0 (solution 1:100).

¹⁵ Le saccharose sert d'indice pour quantifier le pouvoir sucrant, ayant la valeur de 1.

5.1.3. Pureté

La pureté quant à elle est évaluée selon les paramètres résumés dans le tableau 11.

Selon la JECFA [53], des impuretés présentes dans les extraits seraient issues du processus d'extraction, telles que des pigments et des glucides. Selon le procédé d'extraction utilisé, certaines substances glucidiques autres que les glycosides autorisés, seraient des associations de glycosides de stéviol avec des résidus de solvant d'extraction/recristallisation ou des résidus de résine de la chromatographie par échange d'ions.

Tableau 11 : Évaluation de la pureté des glycosides de stéviol [88].

Paramètres	Taux acceptables
Cendres totales	Pas plus de 1%
Perte à la dessiccation	Pas plus de 6% (105°C, 2 heures)
Solvants résiduels	Pas plus de 200 mg/kg de méthanol Pas plus de 5.000 mg/kg d'éthanol
Arsenic	Pas plus de 1 mg/kg
Plomb	Pas plus de 1 mg/kg

5.1.4. Stabilité

Les glycosides de stéviol sont sensibles à la température et au pH, en revanche ils sont photostables. Les conditions pour obtenir la meilleure stabilité des glycosides de stéviol, notamment le rébaudioside A, sont de le stocker à une température située entre 5 et 25°C et à pH entre 4 et 6 [53].

Kroyer [90] qui étudie la stabilité du stéviolside, démontre que dans son état solide le stéviolside est stable pendant 1 heure à 120°C. Quand la température excède les 140°C, le stéviolside commence à se dégrader et au-delà de 200°C sa décomposition s'accélère. Ce qui est en accord avec les recommandations de L'AFFSA qui préconise de ne pas chauffer les glycosides de stéviol au-dessus de 100 à 120°C [53]. L'utilisation dans des denrées alimentaires qui nécessitent d'être cuites ou réchauffées doit faire l'objet d'une attention particulière.

Le même auteur s'intéresse aussi à la stabilité du stéviolside dans des solutions aqueuses. Il rapporte qu'après quatre mois de stockage à température ambiante, il n'y a pas de dégradation du stéviolside dans des solutions à 1 g/L d'acide acétique (pH = 3,1), d'acide citrique (pH = 2,6) et d'acide tartrique (pH = 2,6). Toutefois une dégradation à hauteur de 30% est observée dans une solution d'acide phosphorique (pH = 2,2).

5.2.Méthode d'extraction

5.2.1. Méthode selon la réglementation européenne

Il existe plusieurs processus d'extraction des glycosides de stéviol à partir du végétal *S. rebaudiana*, cependant une seule méthode est préconisée dans le règlement UE n°231/2012 [88] : l'extraction à l'eau. Le Comité Européen s'est dirigé vers ce type d'extraction plutôt qu'une autre, pour des raisons liées à la sécurité. En effet, une extraction à l'eau est plus sécuritaire d'un point de vue sanitaire car elle n'implique pas l'utilisation d'agents chimiques.

Tout en respectant les bonnes pratiques de fabrication (BPF), l'extraction des glycosides de stéviol est réalisée, selon le règlement UE n°231/2012, en plusieurs phases : en premier lieu, les feuilles de la plante stévia sont soumises à une extraction à l'eau. Les feuilles macèrent dans l'eau et libèrent des composés chimiques. Comme de nombreux composés chimiques sont solubilisés, il faut purifier l'extrait. L'extrait brut est alors soumis à une purification préliminaire au moyen d'une chromatographie par échange d'ions afin d'obtenir un extrait primaire de glycosides de stéviol. A ce stade, les glycosides de stéviols sont solubilisés, il faut les mettre sous forme solide pour obtenir un produit fini. La recristallisation est réalisée à l'aide de méthanol ou d'éthanol aqueux permettant d'obtenir une poudre constituée principalement, à raison de 75% tout au moins, de stévioside et/ou de rébaudioside A [88]. Un exemple de procédé d'extraction respectant la réglementation Européenne est décrit en figure 20.

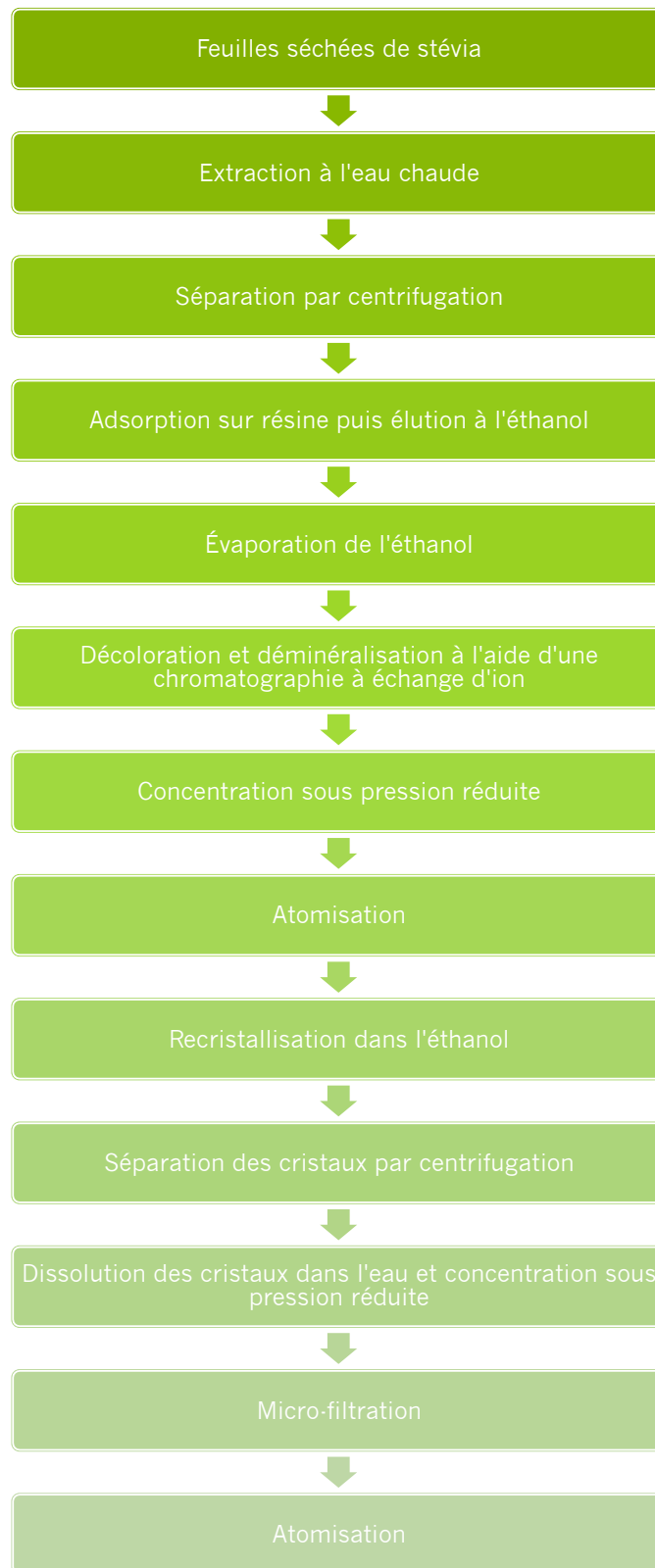


Figure 20 : Exemple de procédé de fabrication respectant la réglementation Européenne [91].

5.2.2. Optimisation de l'extraction à l'eau

Le règlement européen définit l'utilisation d'une extraction solide-liquide à l'eau, mais il ne précise pas les paramètres à fixer tels que la température, la pression, le temps de macération ... L'industriel peut alors jouer sur ces paramètres pour obtenir la meilleure extraction possible.

5.2.2.1. Procédé discontinu

Un procédé discontinu peut être défini comme un ensemble d'étapes conduisant à un produit fini obtenu en quantité déterminée appelé "lot".

Abou-arab et al. [72] testent différentes proportions feuilles de stévia - eau, afin d'obtenir un rendement optimal en stéviolside. Après avoir broyé les feuilles sèches de stévia, ils mettent en contact les feuilles au solvant. Ils fixent la température à 65°C et le temps de contact à 3 h, tandis que le ratio feuilles - eau varie de 1:15 à 1:75 m/v (Tableau 12).

Tableau 12 : Effet du ratio feuilles de stévia - eau sur la concentration en stéviolside et en solides solubilisés lors d'une extraction à l'eau [72].

Ratio feuille/eau (m/v)	Stéviolside (%)	Total des solides solubilisés (%)
1:15	6,75 ± 0,99	9,0 ± 1,0
1:25	7,13 ± 0,99	7,5 ± 0,2
1:35	7,53 ± 0,99	6,6 ± 0,2
1:45	7,59 ± 0,99	5,5 ± 0,1
1:55	7,60 ± 0,99	5,0 ± 1,0
1:65	7,61 ± 0,99	4,4 ± 0,2
1:75	7,60 ± 0,17	3,6 ± 0,2

Leurs résultats (Tableau 12) montrent que plus la proportion en eau augmente, plus il y a de stéviolside extrait des feuilles. Cependant, plus la concentration en eau augmente, plus le total des solides solubilisés diminue ; ce qui signifie que la solution est de plus en plus diluée. En d'autres termes, la concentration en stéviolside diminue. Le meilleur ratio pour obtenir le plus de stéviolside durant l'extraction n'est donc pas 1:65 mais 1:35.

Rai et al. [92] étudient également un procédé d'extraction discontinu. En plus de faire varier le ratio feuilles - eau (1:5 à 1:20), ils jouent également sur la température (30 à 90°C) et le temps de contact (10 à 120 min). Ils obtiennent des conditions optimales d'extraction correspondant à une température de 78°C pendant un temps de 56 min avec un ratio feuilles - eau de 1:14 m/v. À ces conditions, la quantité de stéviolside extraite est de 10,45 g/100 g de feuilles sèches.

5.2.2.2. Procédé continu

Un procédé continu peut être décrit comme un procédé où le produit fini est obtenu de manière ininterrompue.

Yildiz-osturk et al. [83] évaluent quant à eux un procédé continu sous pression. Ils fixent la proportion feuilles - eau à 1:10 et étudient l'impact de trois paramètres qui sont la température de l'eau (100 à 150°C), le temps de contact (30 à 60 min) et le débit (2 à 6 ml.min⁻¹). Leur étude révèle que les meilleures conditions d'extraction du stéviolside et du rébaudioside A (Annexes 6 et 7) sont : une température à 125°C avec un temps de contact de 45 min et un débit de 4 ml.min⁻¹. L'augmentation de la température permet de diminuer la viscosité et la tension superficielle, ce qui améliore la diffusivité de l'eau et donc le transfert de matière.

Toujours d'après ces résultats (Annexes 6 et 7) la quantité maximale de stéviolside et de rébaudioside A extraite est respectivement de 38,67 et 35,68 mg/g. De plus, la température joue un rôle prépondérant. Bien que les glycosides de stéviol soient des composés thermostables et relativement polaires [93] [94], quand la température augmente à 150°C, les rendements diminuent considérablement. Cela serait le fait qu'à température modérée l'eau solubiliserait plus les composés polaires et à haute température elle solubiliserait plus les composés non polaires [83].

Teo et al. [93] évaluent également un système d'extraction sous pression. Leurs paramètres sont une température de 100°C pendant 50 min avec un débit de 1,5 ml/min et une pression de 11 à 13 bar. Ils obtiennent un rendement d'extraction de 14,36 mg/g en stéviolside et 14,33 mg/g en rébaudioside A.

Les concentrations de stéviolside obtenues par les procédés continus sont plus importantes que celles des procédés discontinus. Il est donc intéressant de se diriger vers un procédé continu pour augmenter les rendements d'extraction.

Les paramètres influençant de manière significative les propriétés de transfert et donc la qualité d'extraction sont principalement la température, la pression et le temps de contact car ils jouent un rôle important sur des paramètres physico-chimiques tels que la viscosité, la tension superficielle ou encore la diffusivité [83] [84].

Lorsqu'une industrie cherche à optimiser son procédé d'extraction, elle ne modifie pas tous les paramètres en même temps. Par exemple, l'équipement est déjà en place et il faut trouver les meilleurs critères pour l'équipement en question. Il faut ajouter à cela que des paramètres optimaux peuvent être différents en fonction de la variété de *Stevia rebaudiana* utilisée. Il n'y

a donc pas réellement de méthode universelle pour obtenir le meilleur rendement en glycosides de stéviol lors d'une extraction à l'eau, mais une méthode optimale par type de procédé et par variété de *S. rebaudiana*.

5.3. Autres méthodes d'extraction

Seuls les procédés retrouvés dans la littérature pour l'extraction des glycosides de stéviol seront analysés.

5.3.1. Extraction solide - liquide avec d'autres solvants que l'eau

Les procédés d'extraction solide - liquide utilisant d'autres solvants que l'eau sont similaires à ceux retrouvés dans les extractions à l'eau (procédés discontinus et continus) [72] [95] à [97]. Ce sont les mêmes infrastructures qui sont utilisées, la différence vient au niveau de la purification (utilisation de l'ultrafiltration et l'osmose inverse) [98].

Dans la littérature, plusieurs solvants sont retrouvés polaires ou non [95]. D'emblée, il paraît logique que les solvants polaires seront préférés aux solvants apolaires, car les glycosides sont des molécules polaires. Parmi les solvants polaires, la famille des alcools est la plus étudiée, notamment une molécule, le méthanol.

Seul ou en association, le méthanol offre de bons résultats d'extraction. Abou-arab et al. [72] comparent les rendements d'extraction entre l'eau, le méthanol et le mélange eau - éthanol. L'étude révèle que le méthanol extrait mieux les stévioides qu'une extraction à l'eau. Cependant, la pureté en stéviocide est plus faible pour l'extraction au méthanol qu'à l'eau. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Jaroslav et al. [97]. Les conclusions pour le mélange eau - méthanol sont les mêmes. Ainsi, les meilleurs rendements en stéviocide sont obtenus avec l'extraction au méthanol, suivi de l'extraction au mélange eau - méthanol puis l'extraction à l'eau. En revanche, cet ordre est inversé quand il s'agit de pureté de l'extrait en stéviocide (Tableau 13).

Tableau 13 : Rendement d'extraction et pureté de l'extrait en stéviocide en fonction du solvant utilisé.

Solvant	Rendement d'extraction	Pureté de l'extrait en stéviocide
Eau	+	+++
Eau - méthanol	++	++
Méthanol	+++	+

Plus il y a de "+", plus le critère est élevé.

Afandi et al. [95] s'intéressent également à l'eau, au méthanol et au mélange de ces deux en tant que solvant, mais contrairement aux études précédentes, c'est dans l'extraction du rébaudioside A. Leurs résultats (Annexe 8) montrent que similairement au stéviolside, les rendements d'extraction sont meilleurs lorsque le méthanol est utilisé.

Afin d'obtenir des rendements plus élevés en glycosides de stéviol, les feuilles de stévia peuvent être prétraitées avec des solvants apolaires comme le chloroforme ou l'hexane pour enlever les huiles essentielles, les lipides, la chlorophylle et d'autres substances apolaires [95].

5.3.2. Extraction par sonification

Ce procédé correspond à une extraction solide - liquide avec en plus, une agitation provoquée par ultrasons : c'est une sonification. Gasmalla et al. [85] l'utilisent notamment lors d'une extraction de la manière suivante : ils mettent en contact des feuilles de stévia séchées et broyées avec un solvant qui peut être de l'eau, des alcools. Du phosphate de sodium est ajouté pour contrôler le pH. Ensuite la sonification a lieu à l'aide d'une sonde ultrasons placée dans le mélange et générant une puissance de 360 W. Comme cette étape modifie la température, elle est contrôlée à l'aide d'un bain-marie. Après l'extraction, l'extract brut est centrifugé, filtré et analysé par chromatographie liquide haute performance (CLHP ou plus couramment appelée HPLC). À titre indicatif, lors d'un tel procédé, le rendement d'extraction du rébaudioside A se situe entre 32 et 37 mg/g.

Il existe également une méthode d'extraction similaire, qui utilise des micro-ondes [99] à la place des ultrasons.

5.3.3. Extraction au dioxyde de carbone supercritique

L'extraction de composés bioactifs des végétaux à l'aide du dioxyde de carbone (CO₂) dans son état supercritique est une technique moderne qui nécessite une plus grande technicité que celles décrites précédemment. Il faut du matériel de précision qui soit également robuste. En effet, le dioxyde de carbone doit être pressurisé à minima de 73,8 bars pour atteindre son état supercritique. Ainsi, la cellule d'extraction doit supporter des pressions allant jusqu'à plusieurs centaines de bars. Cette technique est compatible avec une chimie éco-responsable car associée à l'utilisation de l'eau comme solvant, elle permet de réaliser une extraction sans l'usage de solvants toxiques ou néfastes pour l'environnement. Le procédé est décrit en annexe 9 [100].

L'inconvénient de cette méthode, c'est qu'elle est réalisable seulement à l'échelle d'un laboratoire de recherche et difficilement transposable au niveau industriel.

5.3.4. Extraction enzymatique

Ce type d'extraction a été récemment utilisé pour la première fois dans l'extraction des glycosides de stéviol [86]. Le procédé de mise en oeuvre est le suivant : il faut préparer une solution d'enzymes selon la concentration souhaitée puis la mettre en contact avec la poudre de feuilles séchées de stévia. Ajuster le pH pour obtenir un pH optimal pour les enzymes puis mettre l'ensemble sous agitation. Après l'agitation, la solution est filtrée, concentrée, centrifugée puis de nouveau filtrée.

Puri et al. [86] sont les premiers à avoir pratiqué cette méthode. Ils ont étudié plusieurs paramètres tels que le type d'enzyme, la concentration enzymatique, la température d'extraction, le temps d'extraction. Ils ont utilisé des enzymes hydrosolubles (pectinase, cellulase et hémi-cellulase) permettant d'obtenir une solution enzymatique aqueuse. Dans cette solution aqueuse, il peut être ajouté d'autres solvants comme du méthanol pour améliorer l'extraction (2.3.3.1. Extraction solide - liquide avec d'autres solvants que l'eau). Ils obtiennent les meilleurs résultats avec l'utilisation pendant 1 heure à 60°C de l'hémi-cellulase à environ 2% (m/v).

Ce procédé offre une alternative aux autres types d'extraction car les résultats sont encourageants.

6. Conclusion

S. rebaudiana contient de nombreux composés d'intérêts, parmi eux un groupe de molécules qui attire particulièrement l'attention, ce sont les glycosides de stéviol. Ils offrent une singularité à la plante en apportant un goût sucré. Tous constitués à partir d'un squelette de stéviol, ils diffèrent en fonction du nombre d'unité(s) osidique(s) et de leur(s) position(s). À ce jour, les voies de biosynthèse végétale des glycosides de stéviol sont en grande partie élucidées que ce soit les lieux de synthèse (chloroplaste, réticulum endoplasmique, cytosol), le lieu de stockage (vacuole) et les enzymes impliquées.

En ce qui concerne les procédés d'obtention des glycosides de stéviol à partir des feuilles de stévia ; l'extraction, la purification et la concentration sont maîtrisées. Il existe plusieurs

méthodes permettant d'extraire les glycosides de stéviol, mais pour en obtenir à usage alimentaire, l'Union Européenne autorise une seule méthode : l'extraction à l'eau. Cette extraction peut être réalisée avec des procédés continus ou discontinus, toutefois les procédés continus donnent de meilleurs rendements.

Il faut à présent définir si les glycosides de stéviol peuvent avoir un intérêt thérapeutique dans la prise en charge de pathologies liées ou non au sucre. Cela passe par des études pharmacologiques et toxicologiques, comme il sera étudié dans le chapitre suivant.

TROISIÈME PARTIE :

Stevia rebaudiana ET LA SANTÉ

Dans ce chapitre nous allons aborder deux aspects des glycosides de stéviol qui sont la pharmacologie et la toxicologie.

1. Pharmacocinétique

Au cours de ces dernières années, les études du stéviol et ses glycosides (principalement le rébaudioside A et le stéviolside) chez l'Homme et l'Animal, permettent de révéler l'ensemble du processus de pharmacocinétique. Ces études sont nécessaires pour évaluer la sécurité des glycosides de stéviol et s'affranchir d'une toxicité éventuelle liée au métabolites de stéviol.

1.1.Absorption

L'absorption également appelée résorption, est généralement la première phase se produisant après l'ingestion d'un aliment ou d'un médicament. Pour la quantifier, il suffit d'alimenter un individu (humain ou animal), puis de mesurer la concentration de ladite molécule, dans la circulation sanguine après passage hépatique.

La plupart des études *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées à partir d'une alimentation en rébaudioside A, stéviolside et stéviol. Une étude seulement, réalisée en condition *in vitro* en 2014, traite des caractéristiques pharmacocinétiques d'autres glycosides de stéviol tels que les rébaudiosides B, D et M [101].

Les premières études d'absorption ont été menées chez l'Animal et révèlent des résultats différents en fonction de l'espèce animale. Des équipes de chercheurs [102] à [104] montrent qu'après une alimentation en rébaudioside A, stéviolside et stéviol, le porc ne présente aucun de ces composés dans son sang ; le rat et l'hamster ont seulement du stéviol dans leur compartiment sanguin ; le poulet quant à lui élimine rapidement le stéviolside. Il n'y a donc pas la présence de glycosides de stéviol dans la circulation sanguine.

Chez l'Homme, le résultat est le même que chez le rat et le hamster, seul le stéviol est retrouvé dans le sang. Sur l'ensemble des animaux étudiés, les rongeurs semblent constituer le modèle Animal le plus proche de celui de l'Homme.

Comme les glycosides de stéviol ne sont pas retrouvés dans la circulation sanguine après ingestion, les questions qui se posent naturellement sont : que deviennent le rébaudioside A et le stéviolside dans l'organisme ? Sont-ils directement éliminés dans les fèces ou sont-ils métabolisés avant/après leur absorption ? Des chercheurs ont alors étudié quatre paramètres :

- Les caractéristiques des glycosides de stéviol,
- La composition en stéviol et glycosides de stéviol des selles et des urines,
- La flore et les enzymes du tractus intestinal,
- Les métabolites du stéviol et des glycosides de stéviol.

Le rébaudioside A et le stévioside sont des glycosides diterpénoïdes hydrophiles, possédant un poids moléculaire relativement haut ($M_{\text{rébaudioside A}} = 967,01 \text{ g.mol}^{-1}$ et $M_{\text{stévioside}} = 804,9 \text{ g.mol}^{-1}$), ce qui signifie qu'ils ne sont probablement pas absorbés par le tractus digestif [105] [106]. De plus, après une alimentation en rébaudioside A, stévioside et stéviol, les selles du porc, du rat (Spargue-Dawley [107] et Wistar [108]), du hamster et de l'Homme contiennent toutes du stéviol, mais pas de glycosides de stéviol [99]. L'ensemble de ces données permettent d'affirmer que le rébaudioside A et le stévioside doivent être métabolisés au niveau intestinal. En effet, plusieurs équipes de chercheurs, notamment celle de Gardana [109], démontrent qu'il y a une métabolisation des glycosides de stéviol au niveau du tractus digestif permettant leur absorption. Les glycosides sont donc bien absorbés, mais sous une autre forme chimique. Leur métabolisation ainsi que leurs métabolites seront détaillés dans la partie dédiée à la Métabolisation (1.3. Métabolisation).

Des recherches menées sur du tissu gastro-intestinal [110] et sur des monocouches de cellules intestinales humaines Caco-2¹⁶ [103] ont permis de déterminer un modèle de transport du stéviol et de ses glycosides. Le coefficient de perméabilité P_{app} est [103] :

- $P_{\text{app rébaudioside A}} = 0,11.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$,
- $P_{\text{app stévioside}} = 0,16.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$,
- $P_{\text{app stéviol}} = 44,5.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ dans le sens de l'absorption,
- $P_{\text{app stéviol}} = 7,93.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ dans le sens de la sécrétion.

Les deux informations ressortant sont que l'absorption du stéviol est beaucoup plus rapide que celle de ses glycosides ; et que le stéviol est plus rapidement absorbé que sécrété. De plus, l'absorption des glycosides de stéviol est d'environ 80%, tandis que celle du stéviol est totale [107]. Chatsudthipong et Muanprasat [105], ajoutent que l'absorption du stéviol implique un mécanisme de diffusion passif à l'aide d'un transporteur monocarboxylique.

Récemment, Purkayastha et son équipe [101] ont montré que, chez l'Homme, le mécanisme d'absorption des rébaudiosides B, D et M, est similaire à celui du rébaudioside A.

¹⁶ Ensemble de cellule formant un épithélium ayant les caractéristiques de la barrière intestinale.

1.2.Distribution

Dans la partie précédente, il a été vu que les glycosides de stéviol sont métabolisés avant d'être absorbé par le système digestif. Alors pour étudier la distribution, il ne faut pas s'intéresser à eux mais à leurs métabolites qui sont le stéviol et le glucuronide de stéviol (détaillés dans la partie 1.3. Métabolisation).

1.2.1. Chez l'Homme

Une étude conduite par Wheeler et son équipe [111] sur des hommes sains, a permis de révéler des paramètres pharmacocinétiques (Tableau 14).

Tableau 14 : Résumé des principaux paramètres pharmacocinétiques obtenu chez l'Homme, suivant une administration orale en prise unique de rébaudioside A et stéviolside [111].

Paramètre	Rébaudioside A			Stéviolside		
	N ^b	Métabolites		N ^b	Métabolites	
C_{max} (ng.mL ⁻¹)	8	Glucuronide de stéviol	1588	8	Glucuronide de stéviol	2222
	1	Stéviol	227	1	Stéviol	121
t_{max} (h)	8	Glucuronide de stéviol	12,0	8	Glucuronide de stéviol	8,00
	1	Stéviol	72,0	1	Stéviol	6,00
ASC_{0-t} (ng.h.mL ⁻¹)	8	Glucuronide de stéviol	33904	8	Glucuronide de stéviol	39928
	0	Stéviol	NA ^a	0	Stéviol	NA ^a
t_{1/2} (h)	4	Glucuronide de stéviol	14,8	4	Glucuronide de stéviol	14,0
	0	Stéviol	NA ^a	0	Stéviol	NA ^a
λ_z (1.h ⁻¹)	4	Glucuronide de stéviol	0,0483	4	Glucuronide de stéviol	0,0551
	0	Stéviol	NA ^a	0	Stéviol	NA ^a
Ae_u (0-72) (mg)	8	Glucuronide de stéviol	106	8	Glucuronide de stéviol	112
	8	Stéviol	0,0510	8	Stéviol	0,0238
CL_R (L.h ⁻¹)	8	Glucuronide de stéviol	3,73	8	Glucuronide de stéviol	3,36
	0	Stéviol	NA ^a	0	Stéviol	NA ^a
Ae_r (0-72) (mg)	6	Glucuronide de stéviol	0	7	Glucuronide de stéviol	0
	6	Stéviol	5,88	7	Stéviol	6,50

^a Non Applicable

^b Nombre de personnes possédant un niveau mesurable au-dessus de la limite de quantification.

Dans cette étude, les doses administrées oralement en prise unique, comportaient 5 mg.kg⁻¹ de rébaudioside A et 4,2 mg.kg⁻¹ de stéviolside¹⁷. Après une administration de rébaudioside A, la concentration plasmatique maximale C_{max} de stéviol était de 227 ng.mL⁻¹, atteinte au bout de 72 heures. Le stéviolside quant à lui présentait une C_{max} de 121 ng.mL⁻¹, atteinte en 6 heures (Tableau 14). Nous pourrions être tentés de dire que le rébaudioside A est plus absorbé sous forme de stéviol comparé au stéviolside, mais cette interprétation n'est pas réalisable car il n'y a qu'un seul type d'individu pour chaque cas présentant un niveau de stéviol quantifiable.

¹⁷ Doses en quantité équivalentes sur la base molaire d'unité stéviol.

La concentration plasmatique du glucuronide de stéviol obtenue à partir du stéviolside est supérieure à celle du rébaudioside A (Tableau 14). Selon la concentration de glucuronide de stéviol, le stéviolside est plus absorbé que le rébaudioside A. Concernant la vitesse d'absorption, le stéviolside est supérieur au rébaudioside A, mais leur temps de demi-vie $t_{1/2}$ sous forme de glucuronide de stéviol est relativement similaire.

D'après cette étude, le stéviol a été détecté dans le compartiment sanguin seulement chez 2 individus sur 16. Les valeurs sont au-dessus de la limite de détection, qui est de 100 ng.mL^{-1} . Inversement, l'ensemble des individus a un taux de glucuronide de stéviol largement détectable ($> 1000 \text{ ng.mL}^{-1}$). Le glucuronide de stéviol est donc retrouvé majoritairement dans le plasma par rapport au stéviol.

L'aire sous la courbe ASC_{0-t} du stéviolside et rébaudioside A, respectivement $39.928 \text{ ng.h.mL}^{-1}$ et $33.904 \text{ ng.h.mL}^{-1}$ montre que la biodisponibilité du stéviolside est supérieure à celle du rébaudioside A (Tableau 14). Ce résultat est aussi observable dans le graphique ci-dessous (Figure 21).

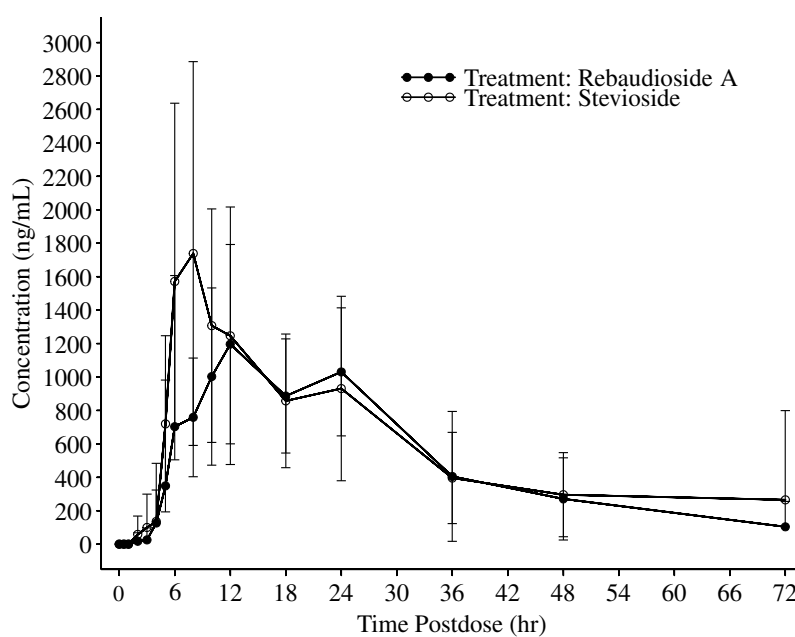


Figure 21 : Evolution temporelle de la concentration plasmatique du glucuronide de stéviol chez l'Homme [111].

1.2.2. Chez l'Animal

1.2.2.1. Paramètres pharmacocinétiques

Roberts et Renwick [107] étudient le devenir *in vivo* du stéviol et de ses glycosides chez des rats Sprague-Dawley des deux sexes. Les résultats de cette étude sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 15 : Paramètres pharmacocinétiques provenant de la concentration radioactive dans le plasma de rat Sprague-Dawley, suivant une administration orale en prise unique de ^{14}C -rébaudioside, ^{14}C -stévioside et ^{14}C -stéviol [107].

Paramètre	Substance administré					
	Rébaudioside A Male	Femelle	Stévioside Male	Femelle	Stéviol Male	Femelle
$C_{\max}$ (ng.g ⁻¹)	90	177	101	279	114	264
$t_{\max}$ (h)	2	8	4	8	0,25	0,25
ASC_{0-72} (ng.h.g ⁻¹)	645	3329	1617	4287	1251	1604
$t_{1/2}$ (h)	5	10	9	15	16	16

Les doses administrées oralement en prise unique, comportaient 5 mg.kg⁻¹ de rébaudioside A, 4,2 mg.kg⁻¹ de stévioside et 1,6 mg.kg⁻¹ de stéviol¹⁸. Ces doses sont sensiblement les mêmes que celles observées chez l'Homme dans l'étude précédente. Les résultats montrent que la concentration plasmatique maximale et la biodisponibilité sont plus élevées chez la femelle que chez le male (Tableau 15 et Figure 22). Roberts et Renwick émettent trois hypothèses au regard de ces résultats :

- Soit les métabolites de stéviol atteignent plus facilement la circulation sanguine chez la femelle lors d'une administration orale de glycosides de stéviol,
- soit le premier passage hépatique est plus élevé chez le mâle,
- soit la clairance systémique de la radioactivité due à l'oxydation, la conjugaison et l'excrétion biliaire pourraient être plus prononcées chez le male.

Cette étude montre également que la concentration plasmatique maximale et la biodisponibilité sont plus importantes lors d'une prise orale de stévioside que de rébaudioside A (Tableau 15 et Figure 22). Ce résultat est en accord avec l'étude chez l'Homme [111] et l'ensemble des résultats de cette étude sont en accord avec celle dirigée sur des rats Wistar, par Nakayama et al. [108].

¹⁸ Doses en quantité équivalentes sur la base molaire d'unité stéviol.

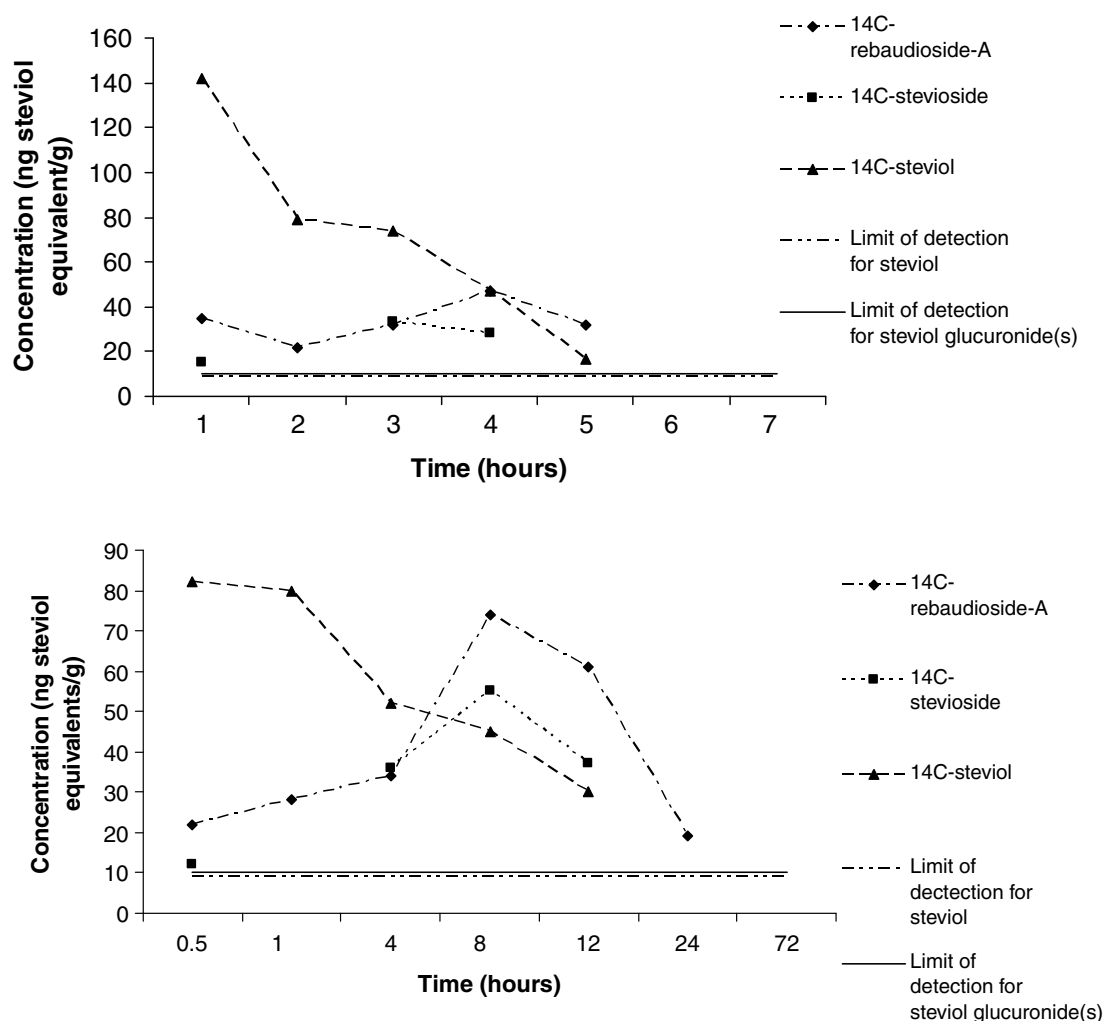


Figure 22 : Concentration de la radioactivité dans le plasma de rat Sprague-Dawley male (haut) et femelle (bas), suivant une administration orale en prise unique de ¹⁴C-rébaudioside A, ¹⁴C-stévioside et ¹⁴C-stéviol [107].

1.2.2.2. Profil de distribution

Le profil de distribution au niveau des organes a pu être établi sur des rats males Wistar. Les examinations révèlent qu'après une administration orale unique en glycoside de stéviol radiomarké, la radioactivité s'est accumulée dans les intestins (intestin grêle et côlon) [108]. Tandis que lors d'une injection en intraveineuse la radioactivité s'est principalement accumulée dans le foie, les intestins et les reins et une faible quantité, moins de 1,8% de la dose initiale, a été retrouvée dans le coeur, l'estomac, les testicules et les muscles [112]. Ces résultats sont intéressants, car ils permettent de montrer qu'il n'y a pas d'accumulation de métabolites de glycosides de stéviol ailleurs que dans des organes de détoxification ou dans des organes d'élimination. De plus, la forte concentration dans les intestins et les reins permet de donner une première idée sur les voies d'élimination.

1.3.Métabolisation

Il existe deux types de métabolisation suivant l'alimentation en glycosides de stéviol [113]. Une permettant l'absorption et l'autre permettant leur élimination. La première métabolisation se situe au niveau intestinal, la seconde se situe au niveau hépatique. Ces métabolisations sont similaires chez l'Homme et chez le Rat [114]. Il est à noter que les études sur la métabolisation sont facilitées, car le modèle de métabolisme *in vitro* est approprié au métabolisme *in vivo* [101].

1.3.1. Métabolisation intestinale

Comme il a été dit dans la partie 1.1. (Absorption), les glycosides de stéviol subissent une métabolisation avant d'être absorbés par les intestins, que ce soit chez l'Homme ou l'Animal. Les enzymes du tractus gastro-intestinal ne sont pas capables de dégrader les glycosides de stéviol [99]. Il y a donc un autre acteur pouvant réaliser cette métabolisation ; c'est la flore intestinale et plus exactement les *Bacteroides sp.* [109]. Elles possèdent des β -glucosidases qui hydrolysent les liaisons glycosidiques, permettant la dégradation des glycosides de stéviol en stéviol ou en ses conjugués¹⁹ [115] [116]. L'orientation moléculaire des glycosides est importante, car elle est susceptible d'être affectée par le résidu osidique attaché et par la structure des liaisons covalentes (α vs. β ; 1-2 vs. 1-3 ou 1-6) [99]. Cette flore n'est pas présente dans les parties hautes du système digestif (estomac), mais seulement dans les parties basses [114].

Les chercheurs pensaient que les glycosides étaient métabolisés directement en stéviol, mais un intermédiaire a été découvert en 2014, le stéviolbioside [101]. Toutefois cet intermédiaire est rapidement transformé en stéviol qui lui est stable [109].

Chez l'Homme, la métabolisation est identique chez les deux sexes. Le rébaudioside A et le stévioside sont entièrement hydrolysés en stéviol au bout de 10 à 24 heures [109]. Les rébaudiosides B, D et M sont hydrolysés en stéviol en 24 heures avec une majorité dès 8 heures d'incubation [101]. À forte concentration (2 mg.mL⁻¹ vs. 0,2 mg.mL⁻¹), la métabolisation du rébaudioside A est plus rapide que celle du rébaudioside D et M ; ces derniers contenant plus d'unités osidiques pourraient nécessiter plus de temps pour être dégradés [109]. Dans la même logique, le rébaudioside B devrait être plus rapidement hydrolysé que le rébaudioside A, cependant aucune étude ne traite de cela.

¹⁹ Des études *in vitro* déclarent la présence de conjugués de stéviol tel que l'époxyde de stéviol, mais ces derniers seraient formés à partir de bactéries aérobies [101], ou par la technique de dosage [102].

Comme chaque glycoside est métabolisé en stéviol, un facteur de conversion peut être mis en place pour obtenir l'équivalence de n'importe quel glycoside de stéviol en stéviol (Tableau 16). Ce facteur de conversion est important afin de pouvoir comparer les doses administrées lors d'études toxicologiques ou thérapeutiques. Ce facteur est également utilisé pour les denrées alimentaires.

Tableau 16 : Facteurs de conversion et masse molaire du stéviol et de ses principaux glycosides [117].

Nom trivial	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Facteur de conversion
Stéviol	318,45	1,00
Stévioside	804,87	0,40
Rébaudioside A	967,01	0,33
Rébaudioside C	951,01	0,34
Dulcoside A	788,87	0,40
Rubusoside	642,73	0,50
Stéviolbioside	642,73	0,50
Rébaudioside B	804,87	0,40
Rébaudioside D	1129,15	0,29
Rébaudioside E	967,01	0,33
Rébaudioside F	936,99	0,34

1.3.2. Métabolisation hépatique

Le stéviol ainsi formé est absorbé par les intestins, puis passe dans la circulation sanguine. Logiquement, le stéviol est détecté dans le compartiment sanguin par dosage, mais pas seulement. Deux principaux métabolites sont retrouvés : le stéviol (minoritaire) créé lors de la métabolisation intestinale et le glucuronide de stéviol (majoritaire) qui est un métabolite du stéviol produit à partir d'un mécanisme de détoxification au niveau hépatique. C'est un mécanisme de conjugaison de la phase II appelé glucuroconjugaison [105].

Quelques²⁰ métabolites retrouvés très minoritairement dans le plasma restent non identifiés, ils sont supposés être des métabolites oxydés de stéviol induits par les cytochromes P450 (métabolisme hépatique de la phase I) [105] [107] [110].

1.4.Élimination

Pour déterminer la ou les voies d'excrétion des glycosides de stéviol, il faut une nouvelle fois s'intéresser à ses métabolites. Une première approximation peut être réalisée grâce au profil de distribution évoqué dans la partie 1.2. (Distribution) ; qui révélait une présence de radioéléments au niveau du foie, des intestins et des reins chez le rat. Ce profil oriente vers une élimination dans les fèces et les urines.

²⁰ Deux à trois. [105] [107] [110]

Contrairement à la métabolisation qui est similaire chez l'Homme et le rat, l'élimination est différente. Chez le rat²¹, beaucoup de glucuronides de stéviol sont retrouvés dans les fèces et relativement peu dans les urines ; chez l'Homme c'est l'inverse [105] [111]. Cette différence entre les humains et les rats est probablement due au seuil de poids moléculaire d'élimination des anions organiques, par exemple les glucuronides, par les glomérules du rein. En effet, les anions organiques avec une masse moléculaire supérieure à 600 Da chez l'Homme et 325 Da chez le rat, sont excrétés dans la bile au lieu de passer par un processus de filtration glomérulaire dans les reins [105]. Le glucuronide de stéviol avec un poids moléculaire de 512,9 Da, est donc éliminé par les sécrétions biliaires dans les fèces chez le rat.

En ce qui concerne le stéviol chez l'Homme, il est retrouvé très faiblement dans les urines comparé à son glucuronide. En revanche, il est plus concentré que le glucuronide de stéviol dans les fèces [107]. Ceci signifie qu'avant d'être excrété, le glucuronide de stéviol est retransformé en stéviol.

La voie urinaire semble donc jouer un rôle prédominant dans l'excrétion des glucuronides de stéviol chez l'Homme, tandis que la voie biliaire semble l'être dans l'élimination du stéviol.

Encore d'après Roberts et Renwick [107], la réabsorption de stéviol par le cycle entéro-hépatique est limitée. Ce phénomène est démontré par la diminution des concentrations plasmatiques d'éléments radiomarqués (Figure 22) et surtout par la diminution du taux d'excrétion biliaire qui est très importante durant les douze premières heures suivant l'administration de glycosides de stéviol.

L'ensemble du processus absorption, distribution, métabolisation et excrétion est résumé dans la figure 23.

Les précédentes recherches qu'elles soient *in vitro* ou *in vivo*, ont permis de résoudre la pharmacocinétique des glycosides de stéviol. Elles permettent d'observer que quelque soit le glycoside absorbé, il sera métabolisé de la même façon, c'est à dire en stéviol puis en glucuronide de stéviol. Il reste cependant quelques points à éclaircir comme la numération de tous les métabolites créés ou encore le profil de distribution dans les organes. Ceci permettrait une meilleure prédiction des effets thérapeutiques et toxicologiques lors de la consommation de glycosides de stéviol.

²¹ Etude de Roberts et Renwick [107] sur des rats Sprague-Dawley en accord avec celle de Nakayama et son équipe [108] sur des rats Wistar.

2. Toxicologie

L'évaluation toxicologique précède l'évaluation pharmacologique (clinique et expérimentale), car qu'il y ait ou non un effet thérapeutique, il faut s'assurer au préalable que le composé n'engendre pas un ou plusieurs effets néfastes.

L'évaluation toxicologique comportera les résultats des études sur les composés propres à la stévia, c'est-à-dire les glycosides de stéviol et le stéviol, mais traitera également des risques liés aux produits utilisés pendant les procédés d'extraction²² des glycosides de la plante.

2.1.Toxicologie des glycosides de stéviols (extraits bruts)

Le métabolisme des glucosides de stéviol des rongeurs et particulièrement celui du rat, est similaire²³ à celui de l'Homme ; l'évaluation des risques chez l'Homme peut donc s'appuyer sur les études disponibles chez les rongeurs. Nous venons de voir également que tous les glycosides de stéviol suivent les mêmes voies métaboliques, ce qui signifie que ce qui est valable pour un est valable pour l'ensemble des glycosides.

Face aux nombreuses études toxicologiques, nous traiterons principalement celles respectant les spécifications JECFA [118].

²² Les procédés d'extraction seront détaillés au *chapitre IV : La Stevia rebaudiana B. et l'économie*.

²³ Hormis pour la voie d'élimination [105] [111].

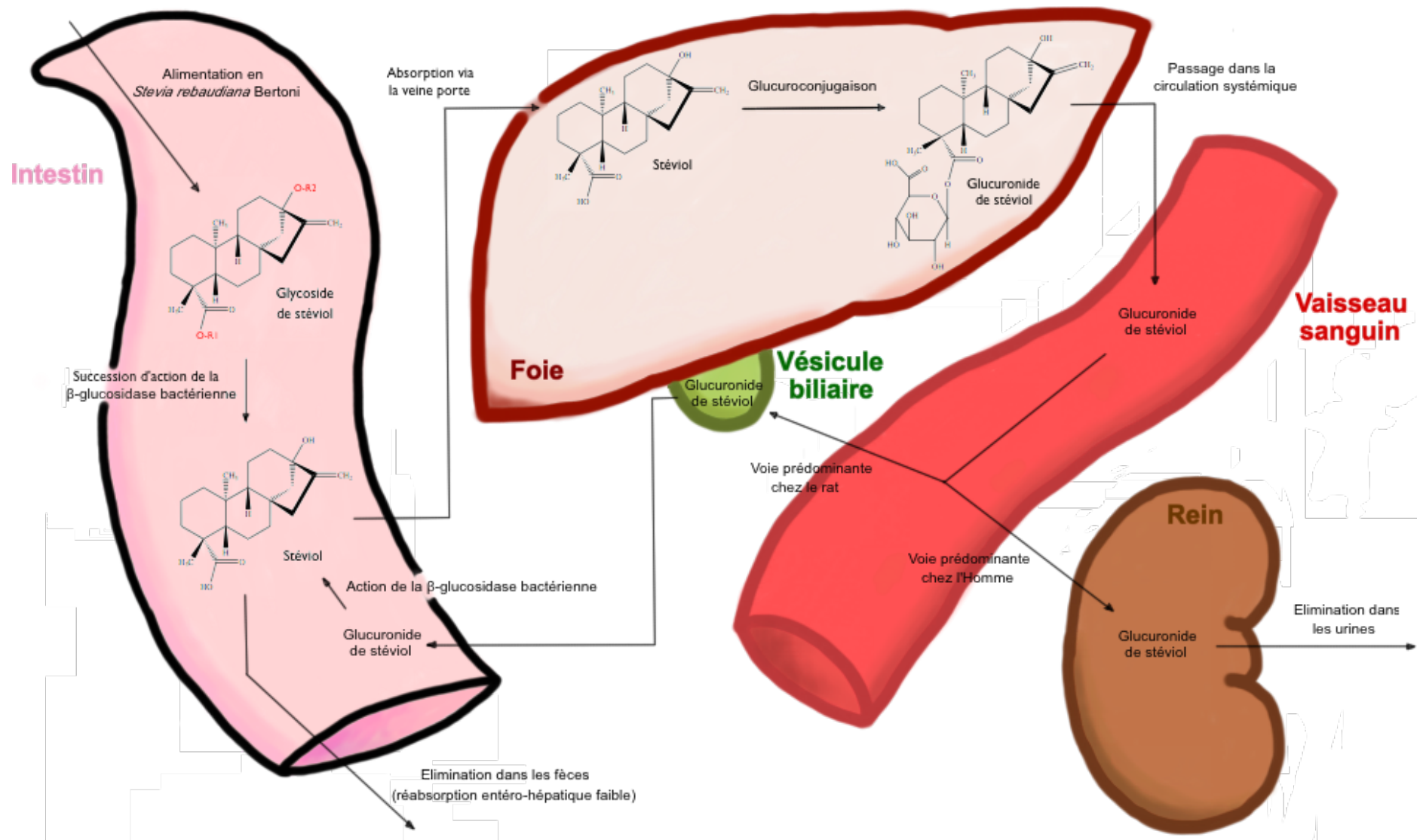


Figure 23 : Schéma représentant l'ensemble du processus de pharmacocinétique suivant une alimentation en *Stevia rebaudiana Bertonii*, chez l'Homme et le rat. Avec R1 et R2 des groupements mono ou polyosidiques.

1.1.1. Toxicité orale aiguë

Sur sept études de toxicité orale aiguë du stéviol et du stéviolside (Annexe 10), une seule respecte les spécifications de la JECFA [117] ; c'est celle de Toskulkao et al. [119].

Cette étude [119] porte sur des hamsters, des souris et des rats et consiste à définir la dose létale pour 50% de la population (DL_{50}) à partir de stéviolside (pur à 96%) et de stéviol (pur à 90%). Cette expérience a duré 15 jours et il en sort une DL_{50} pour le stéviolside supérieure²⁴ à 15 g.kg^{-1} de masse corporelle, valable pour les trois modèles animaux. En ce qui concerne le stéviol, le résultat est différent. En effet, chez les hamsters, des décès ont été observés et une DL_{50} a été fixée entre $5,2 \text{ g.kg}^{-1}$ (mâles) et $6,1 \text{ g.kg}^{-1}$ (femelles). La mort semble être due à une insuffisance rénale, car l'examen histopathologique révèle une dégénérescence des cellules rénales du tube proximal.

1.1.2. Toxicité subchronique

Les études subchroniques respectant les spécifications de la JECFA sont au nombre de quatre et sont rassemblées dans le tableau 17 (les autres sont en Annexe 11). Une étude traite du stéviolside, les autres tests du rébaudioside A.

L'étude 1 (Tableau 17) correspond à l'administration quotidienne de stéviolside pur à 95,6%, chez 6 groupes de rats Fisher 344 (10 individus/sexe/groupe). Le stéviolside ingéré, selon le groupe, correspond entre 0 et 5% du régime alimentaire journalier. Après 13 semaines d'étude, aucun individu n'est décédé et aucune modification de l'alimentation n'est apparue entre les groupes traités et les groupes témoins. Toutefois, en comparaison au groupe témoin, une perte de poids a été observée chez les mâles à la plus haute dose et chez les femelles aux deux plus hautes doses.

Chez les mâles, les investigations biochimiques ont révélé la présence d'urée et de lactate déshydrogénase dans le compartiment sanguin et les examens histopathologiques ont montré une nécrose des hépatocytes. Cependant, ces derniers résultats sont jugés non recevables par l'absence d'une relation dose-effet, par une faible sévérité et par des effets apparaissant seulement chez les rats mâles [117]. Pour cette étude, les experts de l'Autorité Européenne de la Sécurité des Aliments (AESA) considèrent que la plus haute dose correspond à la NOAEL, soit 2500 mg/kg mc/j (ou un équivalent de 942 mg de stéviol/kg mc/j).

²⁴ Aucun décès observé à la dose maximale de l'étude qui est de 15 g.kg^{-1} de masse corporelle.

Tableau 17 : Résumé chronologique des études sur la toxicité subchronique du stéviolside et du rébaudioside A respectant les spécification JECFA [117].

Etude	Evaluation	Dose	NOAEL ²	Effets rapportés	Références
1	Etude de 13 semaines sur des rats Fisher 344 alimentés en stéviolside (pureté = 95,6%)	De 0 à 2500 mg/kg mc/j	2500 mg/kg mc/j La plus grosse dose correspond à la NOAEL ²	- Diminution du poids (aux deux plus hautes doses) - Augmentation du taux d'urée et de lactate déshydrogénase chez les mâles	Aze et al. (1991)
2	Etude de 4 semaines sur des rats Wistar alimentés en rébaudioside A (pureté = 97%)	De 0 à 100 g/kg d'aliment (soit de 0 à 9938 mg/kg mc/j pour les mâles et de 0 à 11728 mg/kg mc/j pour les femelles)	Mâles : 9938 mg/kg mc/j Femelles : 11728 mg/kg mc/j La plus grosse dose correspond à la NOAEL ²	- Gain de poids (seulement au début de l'étude) - Augmentation de la consommation alimentaire (seulement au début de l'étude)	Curry and Roberts (2008) [120]
3	Etude de 13 semaines sur des rats Wistar alimentés en rébaudioside A (pureté = 97%)	De 0 à 50 g/kg d'aliment (soit de 0 à 5828 mg/kg mc/j (semaine 1) et de 0 à 3147 mg/kg mc/j (semaine 13) pour les mâles et de 0 à 5512 mg/kg mc/j (semaine 1) et de 0 à 3704 mg/kg mc/j (semaine 13) pour les femelles)	Mâles : 4161 mg/kg mc/j Femelles : 4645 mg/kg mc/j La plus grosse dose correspond à la NOAEL ²	- Gain de poids (seulement au début de l'étude) - Augmentation de la consommation alimentaire (seulement au début de l'étude) - Aversion alimentaire (à la plus haute dose chez les mâles)	Curry and Roberts (2008) [120]
4	Etude de 13 semaines sur des rats Sprague-Dawley alimentés en rébaudioside A (pureté = 97%)	De 0 à 2000 mg/kg mc/j	2000 mg/kg mc/j La plus grosse dose correspond à la NOAEL ²	RAS ²	Nikiforov et Eapen (2008) [121]

¹ NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) : Dose maximale sans effet néfaste observable

² RAS : Rien A Signaler.

Les études 2 et 3 (Tableau 17) correspondent à l'administration de rébaudioside A pur à 97%, chez 4 groupes de rats Wistar (10 individus/sexe/groupe pour l'étude 2 et 20 individus/sexe/groupe pour l'étude 3). Dans ces deux études, aucun animal n'est décédé et aucun changement biologique n'est apparu (paramètres hématologiques et biochimiques). Les premiers jours sont marqués par un gain de poids et de la prise alimentaire, puis une diminution non pathologique du poids et de la consommation ont été observés, surtout aux plus hautes concentrations. Cela s'explique par deux phénomènes : l'aversion alimentaire et la sensation de satiété qui sont dues au fort goût sucré sans l'apport calorique [113]. Ces phénomènes sont également retrouvés dans l'étude 1 et montrent une similarité entre le rébaudioside A et le stéviolside. Pour ces études, l'AESA [117] considère que les plus hautes doses correspondent aux NOAEL (Tableau 17).

L'étude 4 (Tableau 17) qui s'est focalisée sur des rats Sprague-Dawley, est en accord avec les études de Curry et Roberts [120] en rapportant l'absence de toxicité subchronique du rébaudioside A [113].

1.1.1. Génotoxicité

Le potentiel génotoxique du stéviol et de ses glycosides est un domaine où beaucoup de recherches sont effectuées, car les édulcorants intenses sont souvent controversés²⁵.

En 2008, Brusick [122] rassemble l'ensemble des études sur la génotoxicité du stéviol et de ses composés (principalement le stéviolside). La majorité des études *in vitro* et *in vivo* conduisent à des résultats négatifs (Annexes 12 à 14), soit 26 sur 34 études²⁶. Lors de ces études un arsenal de tests est utilisé tel que le test d'Ames, l'Umu-test, le Rec-test, le test du micronoyau, le test des comètes. Egalement, un large panel de cellules, de bactéries et d'animaux sont utilisés. Grâce à ces diverses études, Brusick conclut que :

- Le rébaudioside A et le stéviolside ne sont pas génotoxiques d'après les études *in vitro*,
- Le stéviol, le rébaudioside A et le stéviolside ne sont pas génotoxiques d'après les études *in vivo* bien menées²⁷ (Tableau 18),
- Le stéviolside n'est pas cancérogène dans les études bien menées chez les rongeurs.
- La consommation des glycosides de stéviol dans des proportions transposables à l'échelle humaine, c'est-à-dire pour une consommation réalisable n'induit aucun risque génotoxique.

²⁵ Polémique autour de l'aspartam et d'autres édulcorants intenses sur internet.

²⁶ Hors études sur *Salmonella typhimurium* de souche TM677. Ajout de deux études de Williams et Burdock qui se trouvent dans le tableau 18.

²⁷ Brusick entend par "bien menée", la robustesse et la fiabilité d'une étude.

Tableau 18 : Évaluation de la génotoxicité *in vivo* du stéviol, du stéviolside et du rébaudioside A [123].

Evaluation	Animal	Plus haute dose testée	Tissu(s) examiné(s)	Résultat	Référence
Stéviol					
Test du micronoyau	Souris MS/Ae	500 mg/kg mc ¹	Erythrocytes de la moelle osseuse	Négatif	Matsui et al. [124]
Test du micronoyau	Souris	200 mg/kg mc ¹	Hépatocytes	Négatif	Oh et al. (1999)
Test du micronoyau	Rat	8000 mg/kg mc ¹	Erythrocyte de la moelle osseuse	Négatif	Temcharoen et al. (2000)
Test du micronoyau	Hamster	4000 mg/kg mc ¹	Erythrocyte de la moelle osseuse	Négatif	Temcharoen et al. (2000)
Test du micronoyau	Souris	8000 mg/kg mc ¹	Erythrocyte de la moelle osseuse	Négatif	Temcharoen et al. (2000)
Test des comètes	Souris BDF1	2000 mg/kg mc ¹	Foie, estomac, colon, rein et testicule	Négatif	Sekihashi et al. (2002)
Stéviolside					
Test du micronoyau	Souris	250 mg/kg mc ¹	Hépatocytes et érythrocytes de la moelle osseuse	Négatif	Oh et al. (1999)
Test des comètes	Souris ddY	2000 mg/kg mc ¹	Estomac, colon, foie, rein, vessie, poumon, cerveau et moelle osseuse	Négatif	Sasaki et al. (2002)
Test des comètes	Souris BDF1	2000 mg/kg mc ¹	Foie, estomac et colon	Négatif	Sekihashi et al. (2002)
Rébaudioside A					
Test du micronoyau	Souris NMRI	750 mg/kg mc ¹	Erythrocytes de la moelle osseuse	Négatif	Williams and Burdock (2009)
UDS	Rat Wistar	2000 mg/kg mc ¹	Hépatocytes	Négatif	Williams and Burdock (2009)

¹ mc : masse corporelle

Il y a tout de même des études rapportant le caractère génotoxique du stéviol et de ses glycosides ; nous allons montrer les raisons pour lesquelles ces études ne sont pas recevables ou transposables à l'Homme.

2.1.3.1. Etudes positives *in vitro*

Malgré la majorité de résultats négatifs des tests de génotoxicité (Annexes 12 à 14), quelques études *in vitro* montrent que le stéviol induit des résultats positifs au niveau de la mutagénicité et des aberrations chromosomiques (Tableau 19).

Urban et al. [123] remettent en cause ces résultats et fournissent des explications :

- Dans trois études, les résultats peuvent être expliqués par l'utilisation de la bactérie *Salmonella typhimurium* de souche TM677 [124] à [126]. Elle n'est pas appropriée à l'évaluation du potentiel toxique chez l'Homme, car elle est déficiente en protéine de réparation de l'ADN.

Tableau 19 : Études *in vitro* positives sur le potentiel génotoxique du stéviol et du stéviolside [123].

Evaluation	Modèle ¹	Commentaire	Référence
Stéviol			
Umu-test	<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002	Souche bactérienne et conditions du test non pertinente pour l'Homme	Matsui et al. [124]
Aberrations chromosomiques	Cellules pulmonaires d'hamster chinois	Effet cytotoxique (50% des cellules sont mortes à la dose la plus élevée) ; résultats contradictoire avec tous les autres tests clastogéniques	Matsui et al. [124]
Mutation génétique	Cellules pulmonaires d'hamster chinois	Effet cytotoxique (97% décès)	Matsui et al. [124]
Mutation plasmidique	Plasmide pSV2-gpt	Conditions du test non pertinente pour l'Homme	Matsui et al. [129]
Mutation directe	<i>S. typhimurium</i> TM677	Souche bactérienne et conditions du test non pertinente pour l'Homme	Matsui et al. [124]
Mutation directe	<i>S. typhimurium</i> TM677	(Voir au-dessus)	Pezzuto [125]
Mutation directe	<i>S. typhimurium</i> TM677	(Voir au-dessus)	Teraï et al. [126]
Stéviolside			
Mutation inverse	<i>S. typhimurium</i> TA98 (S9 ¹)	Problème de contaminant : résultats positifs en contradiction avec tous les autres tests d'Ames. Présence de 500 µg/plat d'impureté dans l'échantillon de stéviolside à plus haute concentration (50 mg/plat). Résultat négatif pour la souche TA100	Suttajit et al. [127]

¹ Un mélange S9 (extrait de foie de rat) a été utilisé soit pendant l'étape de pré-incubation soit pendant l'étude (incubation) et parfois pendant les deux.

- Ensuite, Matsui et al. [124] rapportent un effet mutagène du stéviol sur des cellules de mammifère *in vitro* (cellules pulmonaires d'hamster chinois). Cependant, les doses de stéviol requises pour provoquer un résultat positif sont excessivement cytotoxiques, presque 100% dans l'évaluation de la mutagenèse et plus de 50% dans l'évaluation de l'aberration chromosomique. Ces niveaux de cytotoxicité permettent quasiment d'écarter la validité des résultats. En effet, ces résultats plaident en faveur d'une cytotoxicité plutôt qu'une action génotoxique [122]. De plus, la concentration donnant un résultat positif est cinq fois supérieure à la concentration pratiquée lors d'une étude *in vitro* sur des lymphocytes humains [127]. Cette dernière rapporte que le stéviol n'est pas clastogénique.
- Matsui et son équipe [124] [128] ont rapporté une positivité de l'umu-test et une positivité dans l'apparition de mutations dans un plasmide. Ces résultats sont dus à la spécificité des modèles qui manquent de protéines capables de réparer l'ADN [122]. La prédiction du risque génotoxique chez l'Homme n'est donc pas réalisable.
- La seule étude *in vitro* qui rapporte le caractère mutagène du stéviolside est celle de Suttajit et al. [127]. L'étude porte sur deux souches de *S. typhimurium* dont seule TA98 révèle un résultat positif de génotoxicité. Ce résultat apparaît à la concentration

de stéviolside de 50 mg/boîte, ce qui correspond à une concentration dix fois plus élevée que le maximum recommandé pour un test de ce type selon l'USFDA [129]. Même si le stéviolside est pur à 99%, la quantité d'impureté est de 500 µg/boîte, ce qui pourrait entraîner un caractère mutagène.

2.1.3.2. Etude positive *in vivo*

Une seule étude *in vivo*, parmi un total de douze (Tableau 19) rapporte la génotoxicité du stéviolside. Cette étude menée par Nunes et son équipe [130] consiste à évaluer le potentiel mutagène en réalisant un test des comètes. Ils étudient pendant 45 jours, deux groupes de rats mâles Wistar dont l'un d'eux reçoit une administration *per os* en stéviolside à l'aide d'eau potable (dilution du stéviolside dans l'eau de consommation). Quand on entre dans le détail des paramètres, l'étude se fragilise et les résultats deviennent discutables (remise en cause des résultats par Brusick [122] ainsi que Urban et al. [123]). Tout d'abord, les groupes sont constitués de 5 individus, ce qui est relativement faible et pose un problème en terme d'extrapolation des résultats à l'ensemble d'une population. Ensuite vient la pureté du stéviolside utilisé, qui est seulement de 88,6%. Il y a donc une quantité non négligeable d'impuretés qui peuvent être à l'origine de la génotoxicité. En plus, entre les différents individus, l'alimentation en eau et donc en stéviolside est variable ; il n'y a pas de mesure précise quant à la quantité d'eau absorbée, mais une approximation. Comme un seul groupe a reçu l'alimentation en stéviolside, il n'est pas possible de comparer les résultats avec un autre groupe ayant reçu une alimentation plus ou moins concentrée en stéviolside. Cette étude n'est donc pas suffisamment robuste pour conclure au caractère génotoxique du stéviolside.

Au regard de la prépondérance d'études montrant des résultats de génotoxicité négatifs, plusieurs comités d'experts ainsi que des autorités de la sûreté alimentaire ont conclu que les glycosides de stéviol ne sont pas génotoxiques en utilisation alimentaire à des doses inférieures à 8000 mg/kg masse corporelle (ANZFSAN [131] ; AFSSA²⁸ [132] ; JECFA [89] ; AESA (ou EFSA) [117] et USFDA [91]). Vu le pouvoir sucrant des stéviolsides une telle dose n'est jamais atteinte dans l'alimentation destinée à l'homme.

2.1.4. Toxicité chronique

Dès 1999, le stéviolside est considéré comme non toxique au long cours par la JECFA [105] et aujourd'hui encore. Plusieurs études de toxicité chronique [133] à [135], respectant ou non les

²⁸ Ne concerne que le rébaudioside A.

spécifications de la JECFA, démontrent l'absence d'activité cancérigène des glycosides de stéviol [117]. Même au contraire, chez la souris, le stéviolside a eu une action inhibitrice sur une tumeur de la peau induite par du 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) [136].

2.1.5. Tératogénicité et reproduction

Les études sur la tératogénicité et la reproduction sont résumées en annexes 15 et 16. Plusieurs sortes de modèles animaux ont pu être étudiés comme le rat, l'hamster, le poulet le lapin, le poisson... Cette richesse de modèles permet, à priori²⁹, d'avoir une plus grande vision des potentiels effets tératogènes.

Une des premières études sur ce sujet, a testé une décoction de stévia chez le rat [137]. Elle rapporte une diminution du taux de naissances. Cependant, ces résultats ne sont pas retrouvés dans les études suivantes, notamment celle de Shiotsu [138] qui teste également une décoction de stévia sur des rats. Il ne rapporte aucun effet sur la condition générale, le poids, la consommation d'eau, le taux de naissances et le nombre d'individus par portée. Curry et roberts [120] complètent cette conclusion en rapportant aucun effet sur la morphologie des testicules ; après avoir étudié deux générations de rats alimentés en rébaudioside A (pureté > 97%) Le stéviolside n'induit pas non plus d'effets sur la fertilité et la reproduction chez la souris et le hamster [105]. Le poulet a aussi été étudié et les conclusions rapportent que le stéviol et le stéviolside n'induisent aucun effet sur la mortalité embryonnaire, le poids lors de l'éclosion, la déformation (malformation du squelette, de la tête et du bec) et le développement des gonades [105].

Yamada [133] teste du stéviolside pur à 95,2% chez le rat et ne rapporte aucun effet sur la spermatogénèse. Inversement, Melis [139] affirme qu'il y a une diminution de la fertilité chez les rats mâles à haute dose d'extraits de stévia ; cependant cette haute dose n'est pas transposable à l'échelle humaine. En effet, pour une personne de 65 kg, l'alimentation en stévia correspondrait à 3,47 kg de feuilles sèches par jour, soit environ 34,7 kg de feuilles fraîches par jour [105].

Tout comme pour les études de toxicologie subchronique, à haute concentration, une diminution de l'apport alimentaire ainsi qu'une diminution du poids non pathologique ont été observées [120].

²⁹ Car non connaissance de la pharmacocinétique des glycosides de stéviol chez tous les modèles étudiés.

2.1.6. Potentiel allergène

S. rebaudiana fait partie de la famille des Asteraceae et cette famille est connue pour induire des réactions d'hypersensibilité telles que des allergies respiratoires (ambrosie, *Ambrosia artemisiifolia*), des allergies de contact (marguerite, *Leucanthemum vulgare*) ou encore des allergies alimentaires (*Echinacea*) [140]. Il y a donc une possibilité d'existence d'un pouvoir allergène chez la stévia.

Aujourd'hui, les lactones sesquiterpéniques sont incriminées dans la responsabilité des allergies de contact liées aux *Asteraceae*, mais il n'y a pas de preuves que les extraits de feuille de *S. rebaudiana* en contiennent [140]. De plus, les mécanismes allergiques ainsi que les molécules responsables ne sont pas entièrement connus ; il a donc une différence de pouvoir allergène entre la poudre de feuille de stévia et les glycosides de stéviol (rébaudioside A pur à 97% sur le marché français), car les feuilles contiennent une multitude de composés chimiques.

Deux études chez l'Homme ont rapporté des réactions allergiques chez des individus ayant consommés des produits contenant de la stévia :

- En 2007, Kimata [141] rapporte que deux patients pédiatriques, de 7 mois et 2 ans ont déclenché une réaction anaphylactique (eczéma atopique) après avoir mâché des feuilles de stévia ou bu de l'eau contenant de la poudre de stévia. Cette réaction a été confirmée par un *prick test* positif, puis deux mois après, un nouveau *prick test* a été réalisé et le résultat était négatif. Cependant, ce test n'est pas suffisant pour dire si l'allergie est due directement à la stévia ou si elle provient d'une sensibilisation à une autre plante de la famille des Asteraceae ou a une réaction croisée avec une allergie déjà existante (un des deux enfants est allergique à l'oeuf et l'autre au lait de vache). Ces épisodes ont mené à conduire une étude sur 200 enfants avec ou sans terrain atopique et tout comme les enfants précédents, il y a eu un premier *prick test* puis un second après deux mois d'éviction de stévia. Les résultats montrent que le groupe d'enfants sans antécédent allergique n'a pas développé d'allergie, tandis que les trois autres groupes présentant des terrains allergiques³⁰ ont répondu positivement au test entre 16 et 64% lors du premier contact puis de 6 à 14% après deux mois d'éviction. Il y a donc une diminution de la sensibilité à la stévia au cours du temps et une augmentation du risque allergique à la stévia si un individu possède un terrain atopique [140]. Il est à noter que la poudre de stévia utilisée pour les *prick test* était d'une pureté située entre 80 et 90%, ce qui signifie qu'une part des réponses positives peut être la conséquence des impuretés. De plus, les *prick test* n'étaient pas

³⁰ rhinite allergique, asthme et eczéma atopique.

standardisés (variation des doses d'un patient à un autre) pouvant induire des réponses faussement positives [142].

- En 2012, Esmail et Kabadi [143] ont rapporté des symptômes allergiques chez une femme de 32 ans qui consommait régulièrement de la poudre de stévia. Elle buvait trois fois par jour du café auquel elle ajoutait entre 6 à 8 g de poudre de stévia et ajoutait également de la poudre dans ses desserts. L'allergie s'est manifestée par l'apparition d'un oedème couplé à une hypertension et une hypokaliémie. Après arrêt de la consommation de cette poudre de stévia, l'oedème et les autres symptômes ont disparu, confirmant l'implication de la poudre comme agent allergène. Le problème de ce cas est que ni la provenance, ni la pureté de la poudre de stévia ne sont connues [140]. Nous pourrions tout de même noter que 6 à 8 g de poudre de stévia représente une forte dose d'agent « sucrant » en une seule prise et si cette prise est répétée dans la journée la surconsommation est largement atteinte.

Une étude a eu lieu chez la souris, avec une administration orale de stéviolside de 6,25 à 25 mg/kg mc/j sur une durée de 7 jours. Les chercheurs ont relevé une augmentation de la réponse d'hypersensibilité retardée. Ils concluent que le stéviolside est un immunomodulateur de l'hypersensibilité retardée. Cependant, cette étude ne fournit pas de preuves directes du potentiel allergène du stéviolside. Les auteurs suggèrent que le stéviolside pourrait augmenter les réactions d'hypersensibilité retardées des autres allergènes [144]. Il est à noter que la pureté du stéviolside n'est pas donnée.

Peu d'études existent sur le caractère allergène des glycosides de stéviol. Toutefois, il semble que les extraits bruts de *S. rebaudiana* possèdent un potentiel allergène supérieur à celui des glycosides purs [140], probablement parce que ces extraits bruts contiennent des substances communes à la famille des *Asteraceae*. Malgré la faible probabilité du caractère allergène des glycosides de stéviol ; en l'absence d'études plus robustes, il ne peut pas être déterminé si un glycoside de stéviol avec une pureté réglementaire présente un risque allergique.

2.1.7. Etude à large échelle

Un programme de surveillance des effets indésirables des consommateurs de *Truvia*®³¹ a été mis en place entre 2008 et 2012, soit environ 10 millions de consommateurs. Ce produit contient un mélange d'érythritol (connu pour posséder un potentiel allergène faible [140]), des arômes naturels et des glycosides de stéviol (pur à minimum 97%) extraits des feuilles de stévia. En 2013, Kingston et al. [145] rapportent les résultats des effets indésirables survenus

³¹ Produit issue de l'entreprise *The Truvia Company, LLC*.

lors de cette étude. Les données indiquent que les incidents sont faibles (Tableau 20). De plus, les effets indésirables ne sont pas forcément imputables au *Truvia®*, puisque les consommateurs n'avaient pas de directives particulières à suivre.

Tableau 20 : Résultats d'une étude de 4 ans sur la surveillance de la santé de consommateurs de produits à base de stévia [145].

Système	Prévalence des effets indésirables pour 10 millions d'individus
Gastro-intestinal	0,5
Hématologique	0,01
Cardiovasculaire	0,04
Génito-urinaire	0,04
Respiratoire	0,09
Dermatologique	0,3
Oculaire	0,0
Système nerveux central	0,3
Divers	0,0

2.1.8. Conclusion sur la toxicité

D'après l'ensemble des publications, le stéviol et ses glycosides ne sont pas génotoxiques, ni cancérigènes, ni toxiques pour la reproduction et le développement. La JECFA (2008) a établi une DJA de 4 mg/kg mc/j en équivalent stéviol [118]. Cette même DJA a été annoncée par l'ANZFSAN [131], l'AESA [117], et Santé Canada [146]. Ils reconnaissent que la pureté des extraits à utiliser est très importante. En 2008³², les glycosides de stéviol sont reconnus sûrs par l'USFDA et prennent le statut de "*Generally Recognized As Safe*" (GRAS) [140]. Toutefois, il semble que le potentiel allergène a été minimisé par les autorités de sécurité alimentaire nationales et internationales.

2.2. Risques liés aux procédés d'extraction

Il existe de nombreuses méthodes pour extraire les glycosides de stéviol, toutefois une seule est autorisée selon le règlement UE n°231/2012 [88]. Ce procédé possède l'énorme avantage d'utiliser des solvants connus, qui sont l'eau, le méthanol et/ou l'éthanol. L'eau ne posant pas de problèmes de toxicité, les risques viennent donc des alcools. Étant utilisés depuis longtemps dans le domaine de la chimie, la toxicité de ces deux alcools est connue.

Les fiches toxicologiques établies par l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS) du méthanol et de l'éthanol sont en annexes 17 et 18 [147][148].

Les concentrations d'alcools retrouvées dans les extraits de stévia doivent être en respect avec les normes de l'attribut du produit fini (utilisation en cosmétique, en agro-alimentaire).

³² Seulement à partir de 2013 pour le rébaudioside M.

3. Pharmacologie clinique et expérimentale

Actuellement, le rébaudioside A est commercialisé en France, seulement en tant qu'additif alimentaire. Ce statut suppose qu'il ne possède pas d'activité pharmacologique. Cependant, il posséderait quelques propriétés intéressantes.

Tout comme les parties 1. (Pharmacocinétique) et 2. (Toxicologie), face au nombre important d'études disponibles, seules les plus pertinentes seront traitées.

3.1. Glycosides de stéviol et diabète

Le diabète est une maladie complexe qui touche de plus en plus de personnes dans le monde ; particulièrement le diabète de type 2 ou insulino-résistant qui survient chez les personnes présentant une surcharge pondérale [149], c'est à dire un indice de masse corporel³³ (IMC) supérieur à $24,9 \text{ kg.m}^{-2}$. De plus, ces surpoids peuvent engendrer des dérèglements lipidiques ainsi que des dysfonctionnements hépatiques tels que des effets de lipotoxicité hépatique ou stéatose hépatique. Il existe donc un lien entre diabète, obésité et maladies hépatiques [150]. Les glycosides de stéviol auraient une action hypothétique sur la sécrétion et la sensibilité à l'insuline, c'est pourquoi des études ont été menées principalement sur des sujets présentant un diabète de type 2.

En 2008, une première revue des investigations sur l'homéostasie du glucose montre qu'il n'y a pas de modification des indicateurs du contrôle glycémique ($\text{HbA}_{1\text{C}}$, taux de glucose plasmatique, dosage de l'insuline et du peptide C) et donc, aucun effet pharmacologique des glycosides de stéviol chez des sujets atteints de diabète de type 2. Ces résultats sont valides pour des doses maximales de rébaudioside A de 1500 mg.j^{-1} pendant 3 mois ou 1000 mg.j^{-1} pendant 16 semaines [113]. La même année, Barriocanal et son équipe [151] élargissent cette conclusion aux individus atteints de diabète de type 1.

En 2009, la revue de Chatsudthipong et Muanprasat [105] révèle l'absence d'effet des glycosides de stéviol sur l'absorption et la synthèse du glucose. Cependant, ils indiquent que dans les cas de fortes concentrations plasmatiques en glucose, il existe une possible élévation de la sécrétion et de la sensibilité à l'insuline. L'AESA [117] quant à elle est partagée car les conclusions sont différentes entre les études *in vitro* et *in vivo*. Concernant les études *in vitro*, les glycosides de stéviol auraient une action sur les cellules pancréatiques en stimulant la

³³ $IMC (\text{kg.m}^{-2}) = \frac{\text{masse (kg)}}{\text{taille}^2 (\text{m})}$

sécrétion d'insuline ou les gènes clés intervenant dans la régulation de l'insuline. En ce qui concerne les études *in vivo*, les effets ne sont pas certains car les paramètres de l'homéostasie du glucose ne sont pas en accord ; parfois ils augmentent, diminuent ou ne changent pas. Les résultats ne sont pas assez pertinents pour convenir ou disconvenir de l'impact des glycosides de stéviol sur la glycémie.

Depuis ce rapport de l'AESA, des études ont été menées et révèlent un effet pharmacologique de la stévia non seulement sur la glycémie, mais sur un ensemble de paramètres importants en faveur de la lutte contre le diabète et ses pathologies associées. En 2013, deux études [152] [153] sur des rats diabétiques³⁴ montrent que les feuilles de stévia ont un rôle dans la diminution des dommages hépatiques et rénaux ainsi qu'un rôle hypoglycémiant (Figure 24). Les études montrent également que le rébaudioside A possède des propriétés anti-hyperglycémiques, anti-hyperlipidémiques, anti-péroxydation lipidiques. Le rébaudioside A est également comparé au glibenclamide³⁵ ; à des concentrations de 200 mg/kg mc pour le rébaudioside A et de 600 g/kg mc pour le glibenclamide, les résultats sur la glycémie et le taux d'insuline sont similaires (Figure 25).

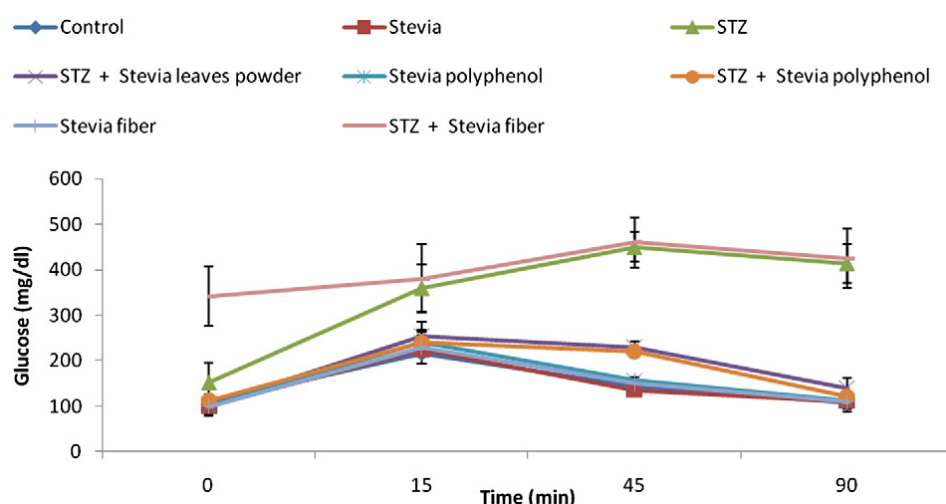


Figure 24 : Evolution de la glycémie pendant les tests de tolérance au glucose chez 8 groupes de rat Wistar après une semaine de traitement [152]. STZ: Streptozotocine.

³⁴ Diabète induit par streptozotocine.

³⁵ Antidiabétique oral de la famille des sulfamides hypoglycémiantes.

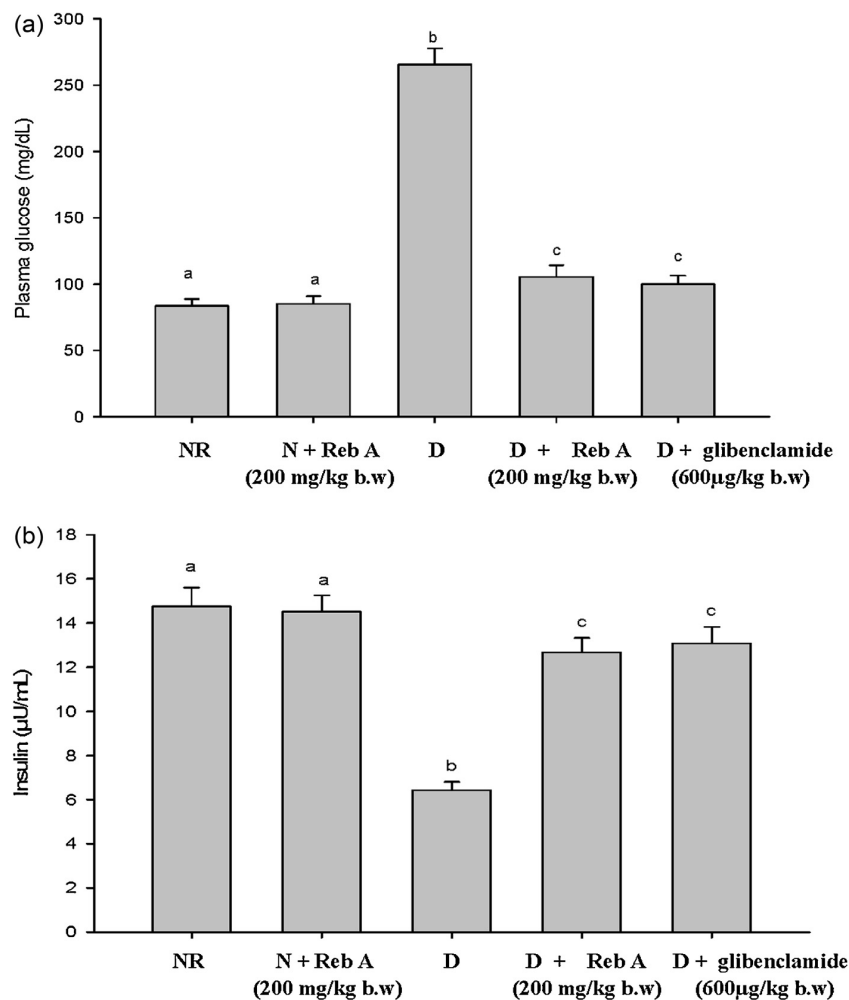


Figure 25 : Evolution de la glycémie et du taux d'insuline chez 5 groupes de rat Wistar [153]. NR/N: Rat normal, D: rat diabétique, reb A: rébaudioside A, b.w: masse corporelle

En 2015, Holvoet et al. [150] ont étudié les effets des glycosides de stéviol sur le métabolisme et le transcriptome de souris obèses. Ils montrent que le stéviol, le rébaudioside A et le stéviol diminuent de manière significative le taux de stéatoses hépatiques (Figure 26) chez les souris obèses insulino-résistantes, sans modification de leur poids.

Ils révèlent également que le stéviol et les glycosides étudiés améliorent le métabolisme hépatique du glucose, le catabolisme des graisses et le stockage et le transport des lipides.

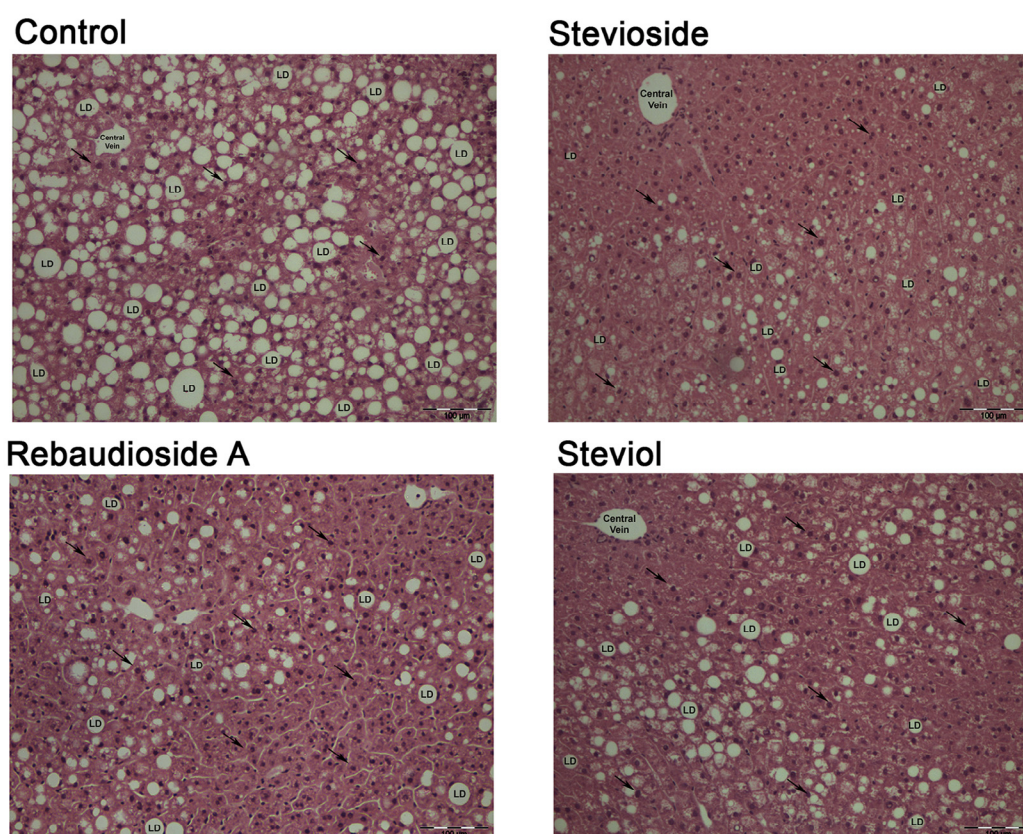
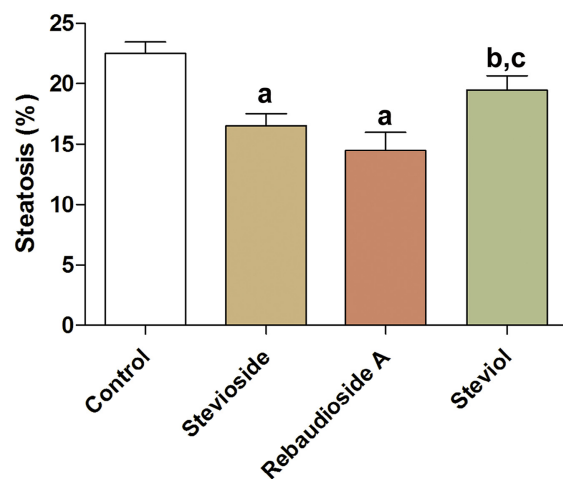


Figure 26 : Amélioration de la stéatose hépatique chez la souris après administration de stéviol, rébaudioside A et stéviol [150]. Le groupe "control" est un groupe témoin correspondant à des souris déficientes en leptine et récepteur LDL. Haut : Pourcentage de graisse dans le tissu hépatique. Bas : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine. LD: goutte lipidique.

Bien que les études les plus récentes révèlent une activité antidiabétique des glycosides de stéviol, l'ensemble des études offre des conclusions hétéroclites ne permettant pas d'affirmer ou d'infirmer la présence de cette activité.

3.2. Glycosides de stéviol et système cardiovasculaire

Des études chez l'Homme et l'Animal malades ont démontré que le stéviolside et les extraits de stévia diminuent la pression artérielle par vasodilatation (diminution de la résistance totale périphérique) et par diurèse (diminution du volume plasmatique) (Figure 27). Ces effets ne sont pas immédiats ; ils sont observables chez l'Homme à partir de 6 semaines lors de la prise orale de stéviolside de 25 mg/kg mc/j [154]. En revanche, les études sur des individus sains n'indiquent pas d'impact significatif du stéviolside sur la pression artérielle. Il y a donc un risque faible de développer une hypotension chez l'Homme sain avec les quantités rencontrées dans un régime alimentaire normal [105].

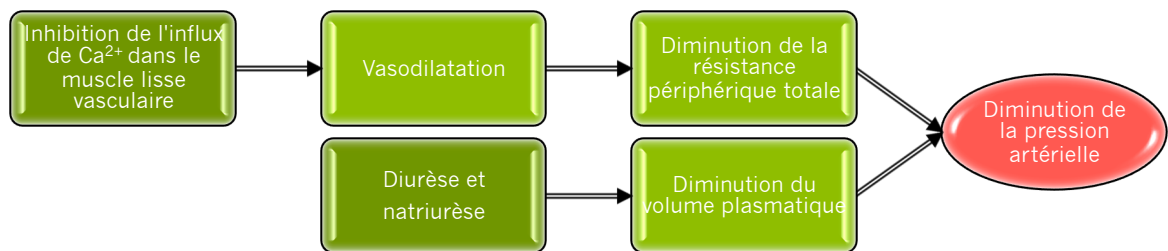


Figure 27 : Actions anti-hypertensives du stéviolside [91].

En ce qui concerne les études *in vitro* rassemblées par l'AESA, elles ne sont pas pertinentes [117]. Dans ces études les glycosides de stéviol sont administrés directement aux modèles cellulaires, alors qu'en réalité ce n'est pas le cas. Ils sont métabolisés avant d'être absorbés (se référer à la partie 1. Pharmacocinétique) et circulent dans le compartiment sanguin sous forme de glucuronide de stéviol majoritairement.

3.3. Glycosides de stéviol et activité anticariogène

La carie dentaire est une maladie chronique qui peut apparaître tout au long de la vie. C'est une maladie infectieuse induite par des micro-organismes oraux qui sécrètent des métabolites acides à partir de glucides retrouvés dans l'alimentation (principalement saccharose, glucose et fructose). Ces métabolites conduisent à une déminéralisation de l'émail dentaire, puis progressivement vers une destruction protéolytique de la structure de la dent. *Streptococcus mutans* est la principale bactérie responsable des caries, suivie de *Lactobacillus casein* et de *Streptococcus sanguis*. Les extraits de feuilles de stévia apportent un goût sucré sans contenir de glucides cariogènes, ils limitent ainsi la formation des caries dentaires [155].

3.4. Glycosides de stéviol et activité antioxydante

Il est connu que les radicaux libres sont naturellement présents dans l'organisme, mais ils peuvent être responsables de nombreuses maladies lorsqu'ils sont présents en grande quantité [156]. Il existe des enzymes à activité antioxydante telle que la superoxyde dismutase (SOD) permettant d'éliminer les radicaux libres.

En 2011, Kim et al. [157] montrent dans une étude *in vitro*, que les extraits aqueux de feuilles de stévia ont une activité antioxydante en inhibant les radicaux libres de type DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyle), hydroxyle ou anion superoxyde (Figure 28). Cette activité peut être expliquée par les taux élevés en acide folique ou vitamine B9 (52,18 mg/100 g masse sèche) et en dérivés de pyrogallol (951,27 mg/100 g masse sèche), qui ont tous deux une activité réductrice. Les extraits contiennent aussi de forts taux de phénols et flavonoïdes, qui s'ajoutent pour augmenter l'activité antioxydante. Muanda et al. [158] et Shivanna et al. (étude *in vivo* en 2013) [152] sont en accord avec l'effet protecteur des extraits de stévia contre les dommages oxydatifs, que ce soit à partir d'extractions à l'eau ou eau-méthanol. L'huile essentielle de stévia ainsi que le rébaudioside A possèdent également une activité antioxydante [153][158].

En plus de son activité antioxydante, la stévia permet d'améliorer l'absorption intestinale de molécules reconnues antioxydantes, telles que l'acide ascorbique (vitamine C) ou les caroténoïdes [159].

3.1. Glycosides de stéviol, activité anti-inflammatoire et anticancérigène

L'inflammation est une réaction immunitaire innée due à une stimulation nocive telle que la présence d'un agent pathogène ou d'une cellule blessée. De plus, des dérèglements de la voie de l'inflammation sont responsables du développement de certains cancers [160], comme le cancer de l'estomac ou le cancer du col de l'utérus.

Yasukawa et al. [136] montrent que le stévioside inhibe une inflammation de la peau induite par du 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). Le TPA est aussi connu pour induire la formation de cancer chez les cellules mammifères, donc le stévioside aurait un effet anti-tumoral [105]. En 2005, Mizushina et al. [161] montrent que l'isostéviol inhibe les DNA

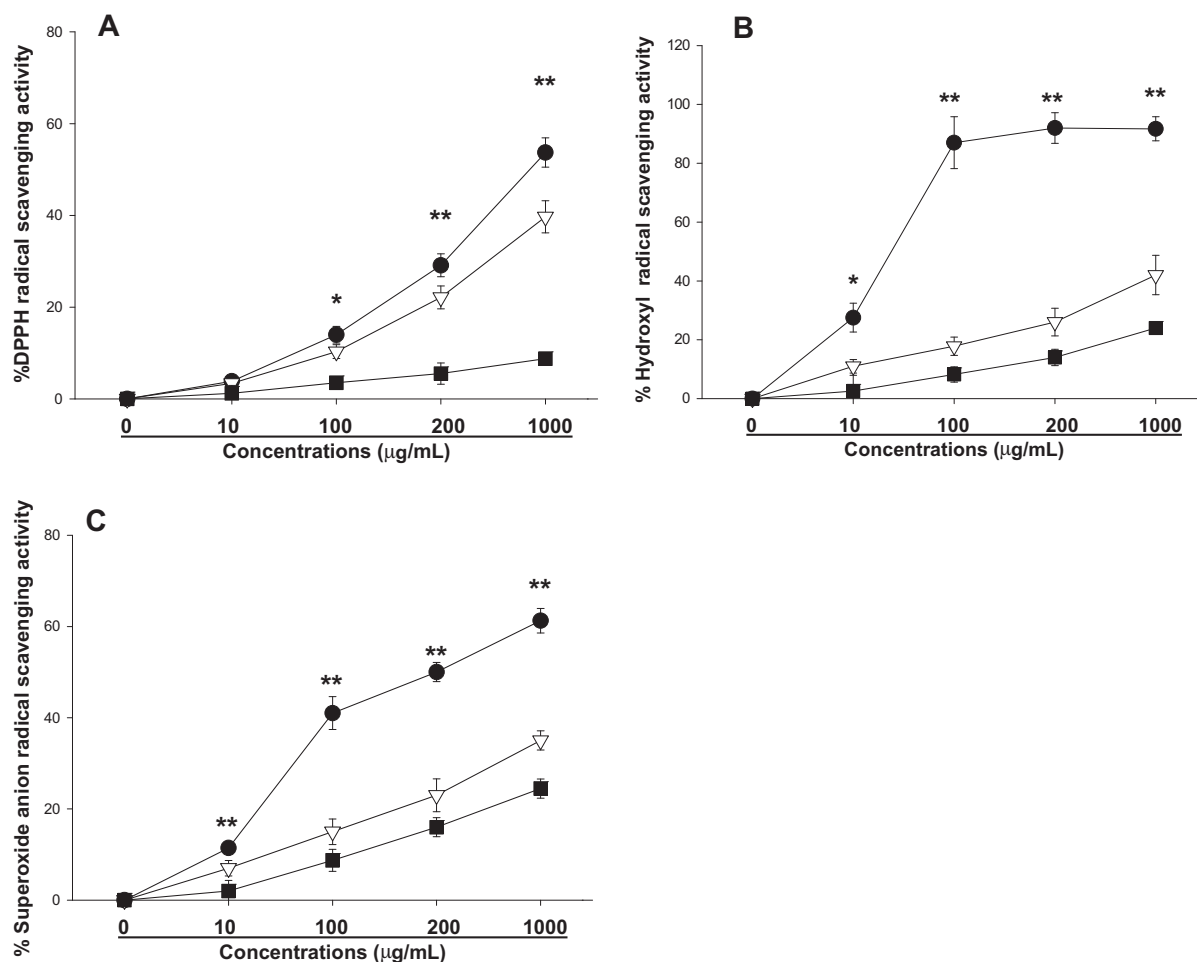


Figure 28 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Stevia rebaudiana* [144]. A: Radical DPPH, B: Radical hydroxyle, C: Radical anion superoxyde, ■ : Extrait aqueux de feuilles de *Stevia rebaudiana*, ● : Extrait aqueux de callus de *Stevia rebaudiana*, ▽ : Acide ascorbique.

polymérase et la DNA topoisomérase II qui sont des cibles thérapeutiques dans les cas de cancer comme dans les cas de maladies inflammatoires. L'isostéviol aurait aussi la capacité de retarder la croissance de plusieurs cancers apparaissant chez l'Homme [105].

L'activité anti-inflammatoire est également retrouvée à partir de l'huile essentielle et des extraits de feuilles de *S. rebaudiana* [158].

3.2. Glycosides de stéviol et activité antimicrobienne

En 2008, Sehar et al. [144] ont mené une étude *in vivo* chez la souris. Ils ont révélé que le stéviol a une activité d'immunomodulation, c'est à dire qu'il intervient dans la régulation du système de défense (stimulation de la phagocytose et stimulation de l'immunité humorale). Les recherches de Muanda et al. [158] sur l'huile essentielle et les extraits de stévia sont prometteuses. En effet, leur évaluation sur plusieurs bactéries et champignons montre qu'ils possèdent une activité antimicrobienne (Tableaux 21 et 22).

Tableau 21 : Activité antimicrobienne *in vitro* de l'huile essentielle et des extraits de *Stevia rebaudiana* [158]. A.n.: *Aspergillus niger* ; B.s.: *Bacillus subtilis* ; C.a.: *Candida albicans* ; E.c.: *Escherichia coli* ; P.a.: *Pseudomonas aeruginosa* ; S.a.: *Staphylococcus aureus*.

Echantillon	Zone d'inhibition (mm)					
	E.c.	C.a.	A.n.	P.a.	B.s.	S.a.
Huile essentielle	10 ± 1	15 ± 1	19 ± 3	N.A. ³	12 ± 2	12 ± 3
Extrait ¹ (eau)	13 ± 1	11 ± 2	N.A.	13 ± 1	12 ± 3	10 ± 1
Extrait ² (eau-méthanol)	21 ± 2	17 ± 1	16 ± 2	15 ± 2	10 ± 2	19 ± 2
Eau distillée	0	0	0	0	0	0
Eau-méthanol	0	0	0	0	0	0
Ampicilline	58 ± 3	N.A. ³	N.A. ³	45 ± 3	55 ± 3	56 ± 3
Gentamicine	55 ± 2	N.A. ³	N.A. ³	45 ± 2	45 ± 2	44 ± 2
Nystatine	N.A. ³	53 ± 1	47 ± 1	48 ± 1	47 ± 1	47 ± 1

¹ Extraction aqueuse.

² Extraction à partir d'un mélange eau-méthanol (50-50 volumique).

³ N.A. : Non Actif.

D'après le tableau 22, l'huile essentielle possède la concentration minimale inhibitrice la plus élevée, ce qui signifie qu'elle a la plus faible activité antimicrobienne par rapport aux extraits.

Tableau 22 : Concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle et des extraits de *Stevia rebaudiana* [158]. A.n.: *Aspergillus niger* ; B.s.: *Bacillus subtilis* ; C.a.: *Candida albicans* ; E.c.: *Escherichia coli* ; P.a.: *Pseudomonas aeruginosa* ; S.a.: *Staphylococcus aureus*.

Echantillon	Concentration minimale inhibitrice (µg/mL)					
	E.c.	C.a.	A.n.	P.a.	B.s.	S.a.
Huile essentielle	> 1000	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
Extrait ¹ (eau)	> 700	> 700	-	> 700	> 700	> 700
Extrait ² (eau-méthanol)	> 500	> 500	> 700	> 500	> 500	> 500

¹ Extraction aqueuse.

² Extraction à partir d'un mélange eau-méthanol (50-50 volumique).

En 2014, Belda-Galbis et al. [162] testent les effets de l'infusion de feuilles de stévia, des extraits bruts de feuille de stévia et des extraits de glycosides purifiés (pureté entre 80 et 90%) sur la *Listeria innocua*. Dans les trois cas, plus la concentration de l'infusion ou des extraits augmente, plus la croissance de la bactérie diminue. Cette même année, Alfajaro et son équipe [163] démontrent l'impact d'une thérapie combinée formée de stévioides et d'extraits de *Sophora flavescens*³⁶ sur un rotavirus de souche G5[P7] chez le porc. Cette association apporte un effet synergique. L'activité anti-rotavirus de *S. flavescens* se retrouve augmentée.

Ces résultats permettent de supposer que le stéviolide pourrait être utilisé pour promouvoir l'immunité contre de nombreuses infections par des micro-organismes tels que des bactéries, champignons, virus. Il pourrait également être utilisé en tant qu'agent conservateur.

³⁶ Dans la médecine traditionnelle chinoise, les racines séchées de *S. flavescens* sont très utilisées et récemment une étude [164] montre qu'un flavone extrait de ces racines (norkurarinol) inhibe la réplication de rotavirus.

La stévia possède donc des effets pharmacologiques plus ou moins avérés, mais néanmoins très intéressants. Les découvertes récentes sont encourageantes et de nombreux domaines sont touchés (Figure 29). La stévia pourrait donc avoir un second rôle en plus de sa propriété édulcorante.

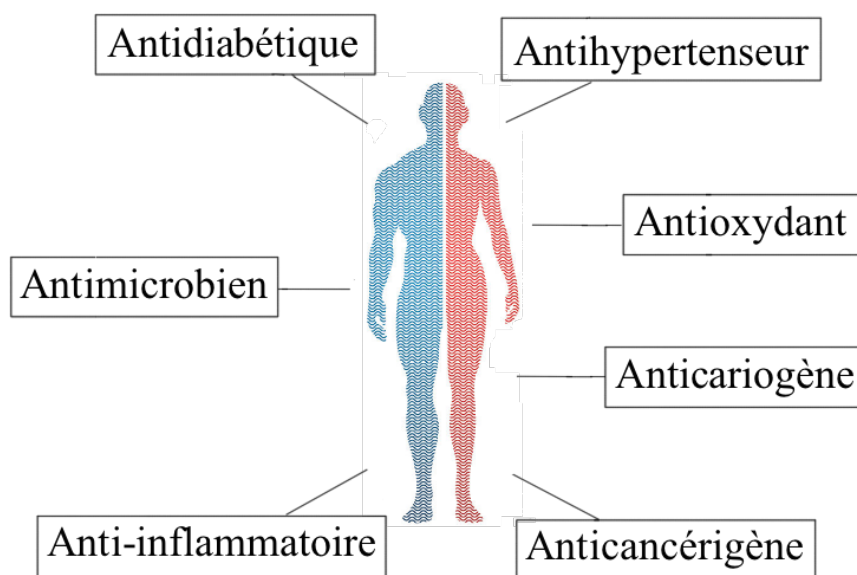


Figure 29 : Potentielles activités des glycosides de stéviol, des extraits de Stevia et de l'huile essentielle de Stevia.

3.3.Conclusion

Après ingestion, les glycosides de stéviol ne sont pas retrouvés dans la circulation sanguine sous leur forme initiale. Ils subissent une première métabolisation au niveau intestinal permettant leur absorption par le tractus digestif, puis une seconde au niveau hépatique qui est une action de détoxification. Ainsi les glycosides de stéviol sont transformés en stéviol, puis en glucuronide de stéviol.

Ce processus est similaire chez le Rongeur et chez l'Homme, seule la voie d'élimination diffère. Le Rongeur peut donc être un modèle animal représentatif de ce qu'il pourrait se produire chez l'Homme. Au vu des études toxicologiques, les glycosides de stéviol ne présentent pas de toxicité orale aiguë, subchronique et chronique, de génotoxicité et de tératogénicité. Certaines études révèlent un caractère toxique, mais ces études sont réfutées à cause d'une robustesse insuffisante ou un non respect des spécifications établies par la JECFA. Les glycosides de stéviol ont même obtenu le statut *GRAS* attribué par l'USFDA.

Les glycosides de stéviol ne présentent pas de pouvoir allergène. La plante entière quant à elle possèderait un caractère allergène. Faisant partie de la famille des *Asteraceae*, famille connue pour son pouvoir allergène, la stévia serait susceptible d'augmenter les prédispositions à être allergique ou serait elle même allergène.

En plus de sa propriété sucrante, les glycosides de stéviol, les extraits de stévia ou encore les huiles essentielles de stévia possèderaient des vertus thérapeutiques. Pour confirmer ce potentiel, il faudrait découvrir les voies métaboliques impliquées et démontrer les propriétés pharmacologiques en menant de nouvelles études cliniques et expérimentales.

Étant officiellement dépourvus d'activité pharmacologique, de quelle manière la Stevia et ses glycosides de stéviol sont autorisés sur le territoire Européen? Et pourquoi est-elle sous la lumière des projecteurs ces dernières années? Ces questions trouveront des réponses dans le chapitre suivant.

QUATRIÈME CHAPITRE :

Stevia rebaudiana ET L'ÉCONOMIE

La première commercialisation des glycosides de stéviol comme édulcorant remonte à 1971 par l'entreprise Japonaise *Morita Kagaku Kyogo*. À cette époque, peu de personnes s'intéressaient à la stévia. Aujourd'hui, l'engouement pour cette plante étant grandissant, de nombreuses entreprises se sont mises à la cultiver et à en extraire ses glycosides. Nous allons voir pourquoi la stévia intéresse de plus en plus les populations ainsi que les industriels. Dans ce chapitre, nous aborderons les thèmes de droit et d'économie.

1. Droit

La France est un pays d'échanges et ses échanges s'accroissent depuis la création de l'Union Européenne (UE). Face à la mondialisation, des produits du monde entier circulent dans l'UE, notamment en France, avec des qualités plus ou moins appréciables en fonction de la réglementation du pays exportateur. Il est donc important de légiférer rigoureusement la qualité des produits afin d'en assurer leur sécurité sur notre territoire.

1.1.Qu'est ce qu'un édulcorant ?

Les glycosides de stéviol sont autorisés en France et classés comme édulcorant. Pour comprendre ce qu'est un édulcorant, il faut au préalable savoir ce qu'est un additif alimentaire.

Selon le règlement n°1333/2008 [165] qui remplace la directive 89/107/CEE [166], un additif alimentaire est défini comme "*toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi et non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive, et dont l'adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires, dans un but technologique, au stade de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage a pour effet, ou peut raisonnablement être estimée avoir pour effet, qu'elle devient elle-même ou que ses dérivés deviennent, directement ou indirectement, un composant de ces denrées alimentaires*". Cela signifie qu'un additif alimentaire n'est pas considéré comme un aliment, mais comme une substance ajoutée à un aliment afin d'en modifier ses propriétés : le goût, la couleur, l'aspect...

Selon la dernière réglementation en vigueur sur les additifs alimentaires, leur classification comprend vingt-six catégories [165], dont les édulcorants font partis (Tableau 23). Pour entrer dans cette classification, chaque substance doit répondre à des évaluations scientifiques approfondies en terme de sécurité [167].

Tableau 23 : Exemples d'additifs alimentaires et de leurs fonctions [168].

Additif alimentaire	Fonction technologique	Exemples
Colorant	Colorant, pigment décoratif, colorant de surface	Noir brillant (noir PN), Bleu patente V, jaune de gardénia...
Exaltateur d'arôme	Exaltateur d'arôme, activateur d'arôme	Succinates (mono- et disodique), Chlorure de potassium, Glutamates (monosodique L-, monopotassium L-...)
Agent moussant	Agent moussant, agent fouettant, agent d'aération	Gomme xanthane, anhydride carbonique, cellulose microcristalline...
Conservateur	Agent de conservation, agent de conservation antimicrobien, agent antimycoses, agent de contrôle bactériologique, fongistatique, agent antimoissure et antifilant, antimicrobien synergique	Sorbates (sodium, potassium, calcium), acide acétique, diphényle, nisine...
Édulcorant	Édulcorant, édulcorant intense, édulcorant de charge	Saccharine - Aspartam - Glycosides de stéviol
Épaississant	Épaississant, agent affermissant, liant, agent de texture, synergiste épaississant	Acide tanique, phosphate trisodique, alginates (sodium, potassium, ammonium...)...

Un édulcorant est donc un additif alimentaire non glucidique³⁷ dit "sucrant", c'est-à-dire une substance que l'on ajoute à des denrées alimentaires pour apporter un caractère sucré (lors de la fabrication de la denrée ou en édulcorant de table³⁸) [165]. Il peut également être défini au travers du considérant 5 de la directive 94/35/CE [169] : *"considérant que l'utilisation d'édulcorants en remplacement du sucre se justifie pour la fabrication de denrées alimentaires à valeur énergétique réduite, de denrées non cariogènes et d'aliments sans sucres ajoutés pour prolonger la durée de vie en étalage par le remplacement du sucre, ainsi que pour la production de produits diététiques"*. En d'autres termes, un édulcorant peut être utilisé pour apporter un goût sucré ou pour augmenter la durée de conservation des denrées alimentaires.

Il y a plusieurs façons de classer les édulcorants, en fonction de leur nature (origine synthétique ou naturelle), de leur apport énergétique (calorique ou non calorique), ou la plus courante, selon leur pouvoir sucrant. Cette dernière comprend deux catégories :

- Les édulcorants de masse : également appelés édulcorants de charge ou polyols, ce sont des sucres-alcool obtenus par hydrogénation du saccharose ou du fructose. Ils sont caractérisés par un pouvoir sucrant faible, proche de celui du saccharose et un apport calorique inférieur ou égale au saccharose. Étant non cariogènes, ils sont utilisés dans les confiseries. Il n'y a pas de recommandation particulière concernant la

³⁷ Les monosaccharides, disaccharides ou oligosaccharides et les denrées alimentaires contenant ces substances qui sont utilisées pour leurs propriétés édulcorantes ne sont pas considérées comme des additifs alimentaires [165].

³⁸ On entend par "édulcorant de table" toute préparation à partir d'édulcorants autorisés susceptible de contenir d'autres additifs et/ou ingrédients alimentaires et destinée à être vendue au consommateur final en tant que substitut de sucre [165].

consommation des polyols mais une limite à ne pas dépasser (entre 20 et 50 g/j) au risque d'apparition d'inconforts digestifs tels que des flatulences ou des diarrhées. À titre d'exemple, nous retrouvons dans ce groupe le sorbitol (E420), le mannitol (E421), l'isomalt (E953) et le xylitol (E967) [167].

- Les édulcorants intenses : Ce sont des substances très diverses au niveau de leurs structures ou de leurs origines (Aspartame origine synthétique, dérivé de deux acides aminés ; rébaudioside A origine naturelle, dérivé du stéviol). Leur point commun provient de leur pouvoir sucrant qui est très élevé, de plusieurs dizaines à plusieurs milliers de fois supérieur à celui du sucre traditionnel (saccharose). De plus, ils possèdent très peu ou pas de calories [170]. Chaque édulcorant intense possède une DJA permettant d'assurer la sécurité et l'absence d'effet toxicologique du produit lors de sa consommation temporaire ou régulière. De manière non exhaustive, nous retrouvons dans cette catégorie l'acésulfame K (E950), l'aspartame (E951), la saccharine (E954) et les glycosides de stéviol (E960) [167].

1.2.Réglementation

Dans cette partie, tout ce qui est décrit concerne le droit européen.

1.2.1. Réglementation des édulcorants

Comme tous les additifs alimentaires, les édulcorants sont soumis aux procédures d'autorisations harmonisées à l'échelle européenne. Dans un premier temps, ils sont soumis à une évaluation par l'AESA et dans un second temps, la Commission Européenne leur donne ou non une autorisation de circulation sur le marché européen [170].

Lors de l'autorisation, la Commission indique les aliments dans lesquels l'édulcorant peut être ajouté et les doses maximales autorisées. Les critères concernant les glycosides de stéviol sont présentés dans un tableau en annexe 19. Ainsi, l'édulcorant entre dans la liste officielle des édulcorants autorisés et seuls ceux présents sur cette liste peuvent être ajoutés dans les denrées alimentaires³⁹ [88] (directives techniques spécifiques 94/35/EU pour les édulcorants). Cependant, l'autorisation de circulation n'est pas illimitée dans le temps. Une réévaluation systématique des édulcorants et de tous les additifs alimentaires est effectuée par l'AESA. La dernière réévaluation a débuté avec les colorants, conformément à la demande faite par la Commission Européenne et continuera avec les autres additifs alimentaires. Les édulcorants quant à eux seront réévalués au 31 décembre 2020. Toutefois, il peut exister de fortes suspicions sur l'innocuité de certains additifs alimentaires. Si plusieurs études scientifiques

³⁹ Système d'autorisation et de contrôle similaire pour tous les additifs alimentaires.

remettent en cause la sécurité du produit et à la demande de plusieurs états membres ou agences sanitaires nationales, alors l'AESA peut avancer la date de réévaluation. C'est le cas notamment avec un édulcorant très controversé et connu de tous, l'aspartame⁴⁰ [170].

1.2.2. Réglementation de la commercialisation

1.2.2.1. Les glycosides de stéviol

Les glycosides de stéviol sont autorisés comme édulcorant en France et en Europe depuis décembre 2011, ils relèvent donc de la réglementation relative aux additifs alimentaires. Tout d'abord, la France a autorisé seulement l'utilisation du rébaudioside A, d'une pureté minimum de 97% en 2009 [171]. Puis la disposition de cet arrêté ministériel du 26 août 2009 a été remplacée deux ans après par le règlement (UE) n°1131/2011, autorisant l'utilisation d'autres glycosides de stéviol dans la composition de l'édulcorant E960 [46]. La composition de ces extraits purifiés doit être [88] :

- À minima 75% de stéviolside et/ou rébaudioside A,
- À minima 95% de stéviolside, rébaudioside A, B, C, D, E et F, stéviolbioside, rubusoside et dulcoside A sur la base de la matière sèche.

Il est stipulé que les industriels doivent indiquer la quantité de glycosides présents en équivalent stéviol afin que le consommateur puisse s'y retrouver (quantification de la DJA).

Les extraits de stévia conformes aux recommandations JECFA peuvent être utilisés comme excipients (masquage de goût, édulcorant) dans les produits pharmaceutiques [88] [172]. Toutefois, les glycosides de stéviol ne sont pas répertoriés dans la pharmacopée européenne. Les glycosides de stéviol peuvent également entrer dans des formulations cosmétiques [173].

La France s'est montrée pionnière en Europe dans l'usage du rébaudioside A en tant qu'édulcorant, puisque c'est seulement en 2011 que l'Union Européenne autorise l'usage le rébaudioside A et d'autres glycosides de stéviol [46] [171].

1.2.2.2. La plante

Contrairement aux glycosides, la commercialisation de la plante entière *S. rebaudiana* à des fins alimentaires n'est pas autorisée en France et en Europe. Pourtant, il a été vu dans le

⁴⁰ Dans son avis publié le 10 décembre 2013, l'EFSA conclut que la DJA actuelle de 40 mg/kg de poids corporel par jour est protectrice pour la population générale (à l'exception des personnes souffrant de phénylcétonurie) [170].

chapitre I (Botanique, agronomie et historique), *S. rebaudiana* est un aliment consommé depuis des siècles en Amérique du Sud. Cependant, elle n'était pas consommée de manière significative en Europe avant 1997 ; elle relève donc des dispositions du règlement (CE) n°258/97 [174] relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. *Stevia rebaudiana* peut seulement être vendue comme [29] :

- Plante d'ornement au consommateur final,
- Matière première aux professionnels pour extraire les glycosides de stéviol.

Toutefois, suite à une demande d'autorisation préalable, la plante peut être utilisée dans les compléments alimentaires.

2. Épidémiologie et économie

2.1.Définition et données épidémiologiques

2.1.1. Surpoids et obésité

Le surpoids et l'obésité sont le résultat d'une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle liée à une absorption énergétique (calories) qui n'est pas suffisamment dépensée. Cet état physique représente un risque pour la santé en termes de morbi-mortalité tels que des troubles cardio-vasculaires, diabète et cancer.

Il fût un temps où ce problème concernait seulement les pays développés, mais à présent les taux de surpoids et d'obésité augmentent énormément dans les pays à faible ou moyen revenu, surtout en milieu urbain [175 à 177]. Nous retrouvons un fort pourcentage de personnes obèses (Figure 30) dans les pays développés comme l'Allemagne, l'Australie, le Canada, l'Espagne, les États-Unis d'Amérique et le Royaume Uni ; ainsi que les pays en voie de développement tels que l'Argentine, l'Égypte, le Kazakhstan, la Lybie et le Venezuela. L'obésité est donc une pathologie mondiale. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2014, plus de 1,9 milliards d'adultes (18 ans et plus) étaient en surpoids, et sur ce total 600 millions étaient obèses. Ce qui signifie qu'en 2014, 39% de la population mondiale était en surpoids et 13% était obèse [175].

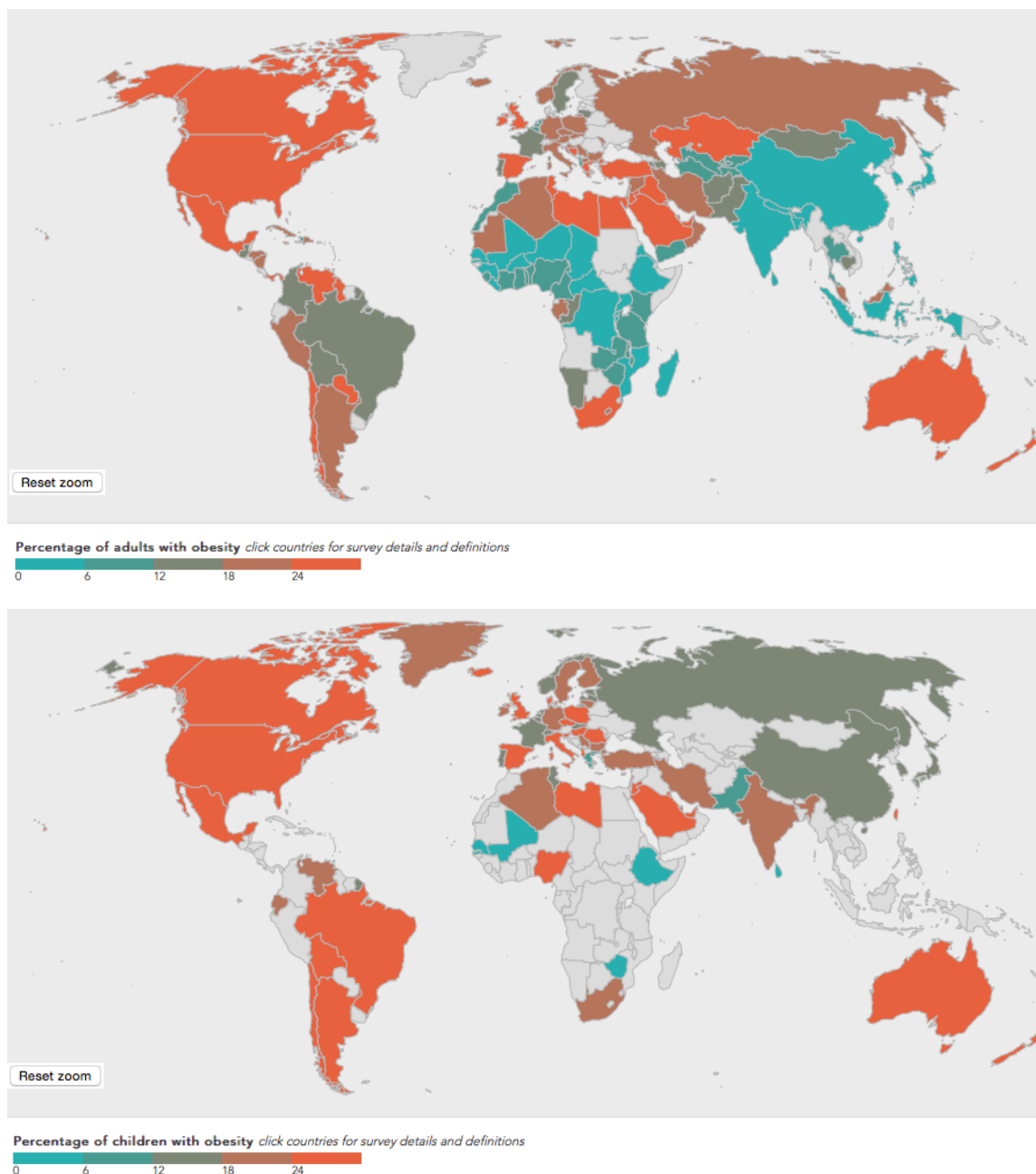


Figure 30 : Surcharge pondérale dans le monde. (haut) pourcentage d'adultes obèses [177] ; (bas) pourcentage d'enfants obèses [176]. Les pays en gris n'ont pas de données disponibles.

Un autre fait alarmant est que le taux d'enfants en surcharge pondérale ne cesse d'augmenter à travers le monde (Figure 31). Les cartes (Figure 30) montrent le pourcentage de personnes adultes et enfants atteints d'obésité dans le monde. Plus le pays est de couleur rouge vif, plus le pourcentage de personnes obèses est élevé. Il est observé, pour la majorité des pays entrant dans l'étude, que le pourcentage d'enfants obèses est au moins égal au pourcentage d'adultes obèses, voire plus élevé. Par exemple, en Europe, l'Espagne compte 24,4% d'hommes et 21,4% de femmes obèses contre 32,3% de garçons et 29,5% de filles obèses. Ce constat est le même pour l'Angleterre, l'Argentine, le Brésil, l'Inde, l'Italie et le Pérou. Face à cette "pandémie" d'obésité, il est nécessaire que les organismes publics et privés réagissent.

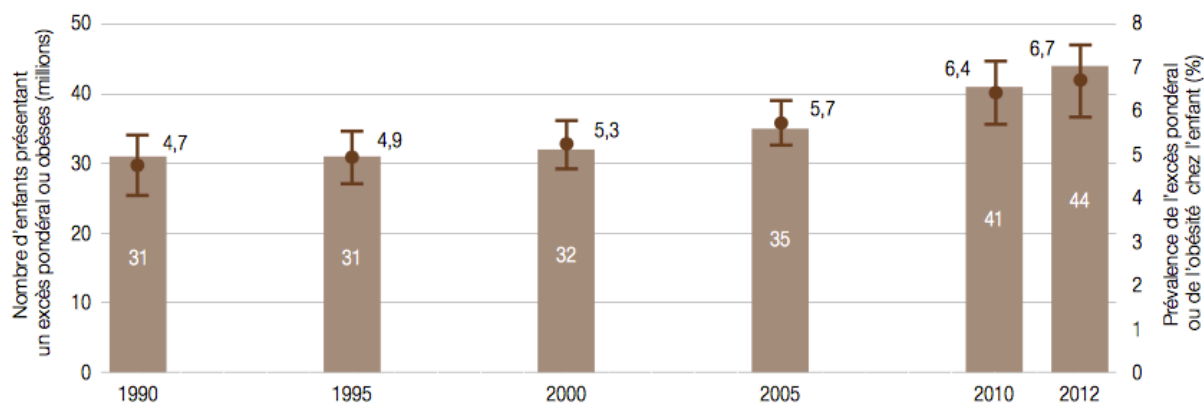


Figure 31 : Nombre d'enfants souffrant d'un excès pondéral ou obèses et prévalence du surpoids et de l'obésité chez l'enfant à l'échelle mondiale, 1990-2012 [178].

Afin de contrôler son poids, il existe des moyens simples de mesurer l'obésité tels que l'indice de masse corporelle⁴¹ (IMC), la mesure du tour de taille ou encore l'indice d'adiposité corporelle⁴² (IAC).

2.1.2. Diabète

Le diabète se définit comme une pathologie apparaissant lorsque le pancréas, plus particulièrement les cellules bêta des îlots de Langerhans, ne produisent pas, ou pas suffisamment, d'insuline (diabète insulino-dépendant ou non) ou que l'insuline n'est pas correctement utilisée par l'organisme (diabète non insulino-dépendant).

L'insuline est une hormone précieuse permettant de réguler la concentration de sucre dans le sang, appelée glycémie. Elle diminue la glycémie en facilitant le stockage et l'utilisation du sucre, à l'inverse du glucagon. Une action amoindrie de cette hormone entraîne des hyperglycémies qui surviennent plus fréquemment et durent plus longtemps dans le temps. Ces hyperglycémies provoquent des atteintes graves de nombreux systèmes organiques, notamment les nerfs et les vaisseaux sanguins [179]. Malheureusement, un diabète mal contrôlé conduit inévitablement vers ces troubles.

Selon les estimations de l'OMS [179], en 2012, le diabète a été la cause directe de 1,5 millions de décès et en 2014, 9% de la population adulte était diabétique, soit environ 387 millions de personnes. Ce nombre pourrait s'élever à 592 millions en 2035, selon la fédération

⁴¹ Indice (sans unité) correspondant au poids de la personne (kg) divisé par le carré de sa taille (m). Le résultat doit être compris entre 18,5 et 24,9 pour être classé en tant que personne à corpulence normale. Un résultat supérieur à 24,9 est signe de surpoids et un résultat supérieur à 29,9 celui d'une obésité.

⁴² Indice (pourcentage) mesuré à l'aide du tour de hanche (cm) et de la taille (m). Le résultat n'est pas le même en fonction de l'âge et du sexe.

internationale du diabète (FID) [180]. La FID a publié d'autres statistiques sur le diabète qui sont présentées en annexe 20.

Le diabète peut être surveillé, contrôlé et traité pour limiter les effets néfastes qu'il occasionne mais cela représente un coût élevé et demande une éducation du patient. En France, l'accès aux soins est pris en charge en partie par la sécurité sociale, mais ce n'est pas le cas dans de nombreux autres pays. C'est pourquoi 80% des décès suite au diabète se produisent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire.

2.2.Données économiques

2.2.1. Coûts directs

Ce sont des coûts (matériel ou service) engendrés directement par la pathologie. Ils comprennent pour les patients les soins médicaux, les médicaments et les autres fournitures. Toutefois, ils englobent aussi les dépenses personnelles comme un relèvement des cotisations ou primes d'assurance maladie et d'assurance vie.

Pour le secteur de la santé, les coûts directs représentent ceux des services hospitaliers et des prestations médicales, les examens de laboratoire et la prise en charge quotidienne des patients. Ces coûts peuvent être relativement faibles ou au contraire élevés (consultation dans un service de soins de santé primaire contre hospitalisation de longue durée suite à des complications engendrées par la pathologie initiale) [181].

2.2.2. Coûts indirects

Les coûts indirects sont le résultat d'une diminution de la productivité du patient. Ayant une pathologie type obésité ou diabète, les patients peuvent être moins efficaces au travail ou dans le pire des cas, ne peuvent plus être en mesure de travailler. Les congés maladies, les incapacités, les mises à la retraite anticipée et les décès prématurés sont autant de causes de perte de productivité.

Contrairement aux coûts directs, les coûts indirects sont plus difficiles à estimer. Selon l'OMS [181], pour le diabète, la perte de productivité pourrait être aussi élevée voire plus, que celui des coûts directs.

2.2.3. Coûts immatériels

À la différence des coûts directs et indirects, le coût immatériel n'est pas "chiffable". C'est un coût subjectif qui se mesure en désagréments diminuant la qualité de vie (douleur, anxiété, inconfort, estime...).

2.2.4. Coût de l'obésité

Le coût du surpoids et de l'obésité provient de deux sources. Tout d'abord, pour éviter l'apparition de pathologies associées (diabète, pathologies cardio-vasculaires, affections respiratoires...), il existe des interventions directes visant à réduire la charge pondérale (anorexigènes, interventions chirurgicales et consultations). Ces interventions représentent le premier coût. Deuxièmement, la chronicité d'un poids corporel supérieur à la normale entraîne l'apparition de pathologies associées. Ces pathologies génèrent également de grosses dépenses.

En France, d'après un rapport d'office parlementaire [182], le coût de l'obésité correspondrait à 2% de la dépense de santé. Cependant, cette étude date de 1992 et à cette époque l'obésité était encore peu développée. Sachant que l'obésité a doublé depuis, les dépenses doivent être probablement à plus de 4% de la dépense de la santé. Ce chiffre de 4% semble faible, toutefois, sur la base du dernier résultat de dépenses connu de l'assurance maladie, elle aboutirait à chiffrer ce coût à 5,6 milliards d'euros⁴³. D'après la haute autorité de santé (HAS), l'impact économique minimal du surpoids et de l'obésité serait de 2 à 7% des dépenses de santé [183].

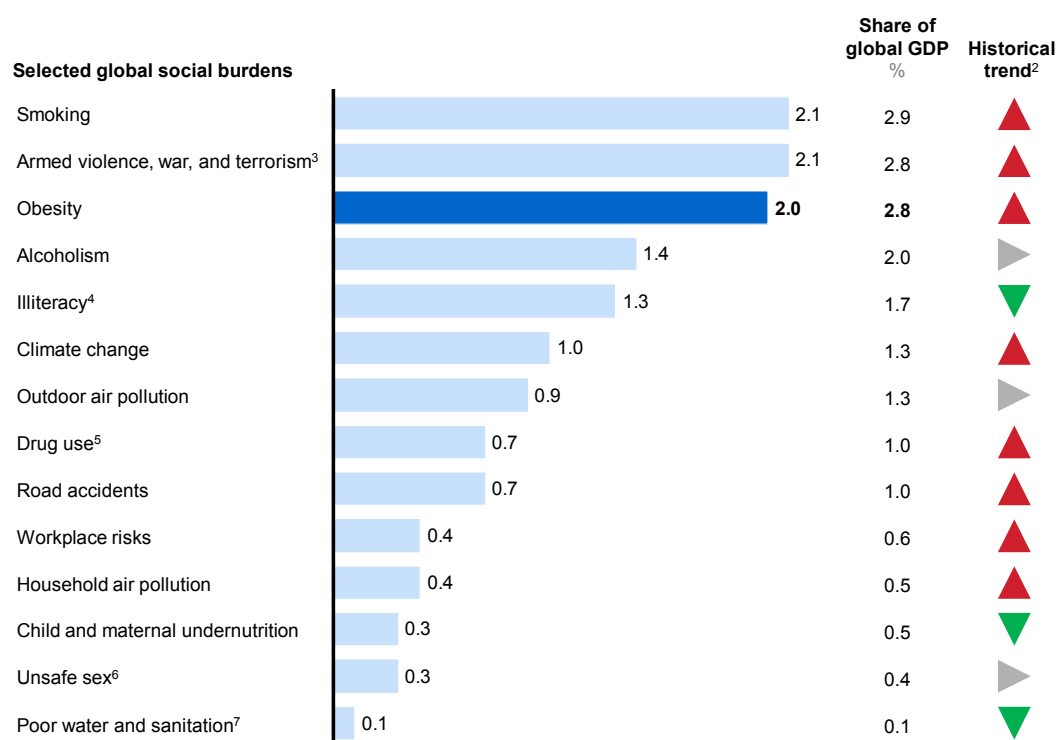
Une étude menée par Emery et al. [184] cherche à estimer le coût de l'obésité en France (étude sur 4 651 individus). Elle révèle que la consommation moyenne de soins et de biens médicaux d'un patient obèse en 2002 s'élève à près de 2.500 €, ce qui représente un montant deux fois plus élevé que pour celui d'un individu de corpulence normale (1.263 €). L'étude révèle également que du point de vue de l'Assurance maladie, c'est-à-dire en tenant compte des montants remboursés, le surcoût d'un patient obèse est estimé à 407 € en moyenne. En considérant en plus le coût des indemnités journalières, le chiffre atteint en moyenne 631 €. En extrapolant ce résultat au niveau national, Emery et al. estiment que :

- les dépenses de santé liées à l'obésité atteignent 2,6 milliards d'euros,
- les montants remboursés (Assurance maladie) liés à l'obésité sont de 2,1 milliards d'euros et atteignent 3,3 milliards d'euros si l'on intègre les indemnités journalières.

⁴³ Sans prendre en compte les financements complémentaires de l'État et des mutuelles.

Une étude menée en Suisse par Schneider et Venetz [185] estime les coûts totaux directs et indirects des maladies en lien avec le surpoids et l'obésité, à quelques 8 milliards de francs suisse en 2012. Depuis 2002, ces coûts se sont donc quasiment multipliés par trois. Toutefois, il convient de noter que davantage de pathologies liées au surpoids et à l'obésité ont été prises en compte dans l'étude actuelle par rapport aux études précédentes.

En 2001, aux États-Unis d'Amérique, les coûts du surpoids et de l'obésité étaient estimés à 117 milliards de dollars, soit environ 10% des dépenses de santé. L'Allemagne quant à elle, évalue le coût à 8% de la dépense de santé [182]. Pour aller plus loin, une estimation du cabinet de conseil McKinsey Global Institute [186], indique que l'impact économique de l'obésité à travers le globe coûterait, en 2012, environ 2.000 milliards de dollars, soit 2,8% du PIB mondial. Cela place l'obésité au troisième rang (Figure 32) des "fardeaux sociaux mondiaux" générés par l'Homme.



¹ Basé sur le *DALY* 2010 et sur les indicateurs économiques de la banque mondiale en 2012 ; ² Basé sur le développement de 1990 à 2010 du *DALY* ; ³ Budget militaire inclus ; ⁴ Illettrisme fonctionnel inclus ; ⁵ Crime et emprisonnement inclus ; ⁶ Comprenant les maladies sexuellement transmissibles et excluant les grossesses non désirées ; ⁷ Temps pour accéder à une source d'eau potable exclu.

Figure 32 : Estimation du coût annuel mondial et des investissements pour la lutte des fardeaux sociaux au niveau mondial en 2012¹ [186].

2.2.5. Coût du diabète

2.2.5.1. En France

2.2.5.1.1. Données de l'étude ENTRED

Une grande étude nommée ENTRED a été menée entre 2007 et 2010 en France (métropole et départements d'outre-mer) sur 10 705 patients traités par des médicaments antidiabétiques [187]. Les objectifs de cette étude sont multiples, dont l'estimation du coût des soins liés au diabète. Les coûts portaient sur le remboursement des soins ambulatoires (honoraires médicaux, kinésithérapie, soins infirmiers, biologie, pharmacie, dispositifs médicaux, transport et autres dépenses de médecine de ville) et des soins hospitaliers (hospitalisation en établissements publics ou privés anciennement sous dotation globale et établissements privés, y compris les honoraires).

En 2007, tous diabétiques confondus, le remboursement moyen annuel était estimé à 5 300 euros par personne (4 890 euros pour les diabétiques de type 2) ; 10% des patients concentraient 50% des remboursements et un tiers concentraient 80% des remboursements, ce qui correspondait à un remboursement moyen inférieur à 600 euros pour le 1er décile et respectivement de 9 300 et 25 000 euros pour les 9e et 10e déciles. De plus, le montant des remboursements augmentait avec l'âge, atteignant 8 700 euros chez les personnes de 85 ans et plus.

Le montant total des remboursements aux personnes diabétiques traitées pharmacologiquement, extrapolé à tous les régimes de l'Assurance maladie et à la France entière était estimé à 12,5 milliards d'euros en 2007. L'hôpital représentait le plus gros poste de dépenses, soit 37% des dépenses totales (4,7 milliards d'euros en 2007). Les médicaments représentaient 27% des dépenses totales (3,4 milliards d'euros), suivis des soins infirmiers (8,4%), des honoraires médicaux (7,8%), des dispositifs médicaux (7,7%), des transports (2,9%), de la biologie (2,8%) et des dentistes (1,0%).

2.2.5.1.2. Données de l'Assurance maladie

L'assurance maladie a publié un état des lieux sur les médicaments remboursables en 2009 [188]. Ce document est fondé sur les données du régime général en France métropolitaine hors sections locales mutualistes, soit environ 80% des médicaments remboursés. Il indique que le montant remboursé des antidiabétiques a augmenté de 5,9% en 2009 par rapport à 2008, pour atteindre 716,9 millions d'euros. La croissance du nombre de prescriptions

(+4,9%) correspondrait d'une part à l'évolution de la maladie et d'autre part à un effet de structure⁴⁴ très élevé (+7,7%), partiellement compensé par des baisses de prix (-4,5%), le développement des génériques (-1,6%) et les conditionnements trimestriels (-1,%).

L'effet de structure est principalement lié au développement des analogues du GLP-1, des inhibiteurs de la DPP-4 et des associations fixes à base de ces classes thérapeutiques. Parmi les insulines, le développement des analogues lents de l'insuline explique également la croissance des dépenses [187].

2.2.5.1.3. Données de l'Inspection générale des affaires sociales

Dans un rapport publié en 2012 [189], l'Inspection générale des affaires sociales estime que les nouveaux médicaments antidiabétiques (glitazones, inhibiteurs de la DPP-4 et analogues du GLP-1) représentent 15% des traitements prescrits et environ 50% des dépenses d'assurance maladie de médicaments antidiabétiques hors insuline. Il est aussi décrit dans ce rapport que les prescripteurs français se dirigent plus que les autres prescripteurs européens, vers des nouvelles molécules au détriment des anciennes molécules génériques.

Un autre rapport publié en 2010 [190] sur la maîtrise des dépenses des dispositifs médicaux, indique les montants remboursés en 2009. Pour les consommables et les matériels d'autocontrôle du diabète, leurs coûts étaient respectivement de 334,2 millions d'euros (+23,1% par rapport à 2006) et de 27,9 millions d'euros (+22,0%). Le coût des consommables pèse plus de dix fois celui des matériels d'autocontrôle, cela s'explique par leur utilisation qui peut être de plusieurs fois par jour et non réutilisable. Par exemple, les bandelettes (coût estimé entre 0,32 à 0,80 € l'unité) sont utilisées au moins quatre fois par jour [191] ; sachant qu'en 2009, 1 003 821 patients diabétiques ont été remboursés d'un dispositif d'auto-mesure de la glycémie, cela représente une forte dépense. De plus, le traitement complet d'un patient diabétique ne se limite pas seulement à des bandelettes, mais à un ensemble de médicaments et dispositifs médicaux.

Toutes les données précédentes ne sont pas actualisées de 2015, les coûts du diabète sont donc encore plus élevés car depuis les dix dernières années, le nombre de personnes traitées pour un diabète a augmenté en moyenne de 5%/an [192]. D'ailleurs pour financer et subvenir aux besoins des coûts des traitements des maladies encourues, une loi, vulgairement appelée "taxe

⁴⁴ L'effet structure correspond au déplacement de la prescription vers des traitements plus coûteux.

sucre" a été mise en place en 2012 [193]. Concernant les boissons contenant du sucre ajouté, cette loi instaure une contribution aux coûts de la prise en charge du diabète⁴⁵.

2.2.5.2. Dans le monde

De nombreux pays sont touchés par la "pandémie" de diabète et cela représente un coût s'élevant à des milliards de dollars. Aux États-Unis d'Amérique, le coût direct du diabète et de ses complications a été de 44 milliards de dollars en 1997 [181] et de 245 milliards de dollars en 2012 [194]. L'OMS a également estimé les coûts pour d'autres pays comme l'Argentine, le Brésil et le Mexique dont les dépenses s'élèvent respectivement à 0,8, 3,9 et 2,0 milliards de dollars. Ces derniers chiffres sont beaucoup plus faibles que ceux observés aux États-Unis d'Amérique, mais ils s'élèvent à mesure que la prévalence du diabète augmente, notamment au Brésil [176] [177].

D'après des études en Inde, une famille indienne à faible revenu dont un membre adulte souffre de diabète consacre 25% de ses ressources à la prise en charge du malade. Aux États-Unis d'Amérique, ce chiffre est de 10% pour les familles ayant un enfant diabétique. De manière générale, les coûts directs du diabète représentent entre 2,5 et 15% des budgets annuels de santé, selon la prévalence locale et la sophistication des traitements disponibles [181].

Les coûts indirects du diabète, plus difficilement estimables, seraient beaucoup plus élevés (en %) que les coûts directs dans les pays en développement selon l'OMS [181]. Par exemple, sur 25 pays d'Amérique latine, le coût de la perte de productivité serait cinq fois supérieur à celui des soins. En effet, leur accès au soin est moindre par rapport à des pays plus riches, donc il y a moins de dépenses directes ; mais en contrepartie il y a plus de complications car la pathologie n'est pas traitée, ce qui entraîne une diminution d'activité (perte de revenus) et donc un coût indirect important.

2.2.6. Le marché de la stévia

2.2.6.1. La solution apportée par les édulcorants

Face à ces deux pathologies d'envergure mondiale que sont l'obésité et le diabète, il semble urgent de trouver des solutions pour limiter leur propagation. Plusieurs facteurs sont responsables de ces deux pathologies, tel que la sédentarité, la diminution de l'activité physique, le niveau socio-économique ou encore, et particulièrement, l'alimentation. En effet,

⁴⁵ Des lois similaires ont été mis en place dans d'autres pays comme la Finlande et la Bulgarie.

ce dernier joue un rôle principal puisque c'est la source de l'apport énergétique (glucides, lipides et protéines).

En s'intéressant aux glucides et plus précisément aux sucres rapides (responsables communs entrants dans les deux pathologies), une des solutions pouvant être apportée est de diminuer son apport. Toutefois, en plus d'apporter des calories, les sucres rapides offrent à l'organisme un certain plaisir, qui peut se transformer en une addiction chez l'individu. Les industriels de l'agro-alimentaire l'ont compris et n'utilisent pas seulement ces sucres pour la texture, la conservation ou le goût de leurs produits, mais également pour le rôle addictif qu'ils procurent. C'est pour toutes ces fonctions qu'ils sont retrouvés dans de nombreux produits alimentaires.

Depuis plusieurs années et encore plus aujourd'hui, une partie de la population mondiale a pris connaissance des problèmes d'obésité et de diabète et souhaite modifier son alimentation. Pour répondre à cette nouvelle demande, les industriels ont le choix de :

- diminuer ou supprimer la part de sucre ajouté dans leur produit, au détriment du goût,
- substituer le sucre ajouté par des édulcorants moins ou non caloriques, sans modification du goût du produit.

Face à la demande de la population et à l'enjeu sanitaire, les édulcorants se présentent comme une solution contre l'obésité et le diabète. Ces problèmes étant retrouvés à travers le monde, la commercialisation d'un édulcorant répondant aux critères attendus représente un enjeu économique de taille. C'est pourquoi il existe de nombreux édulcorants ayant chacun des caractéristiques particulières [167] [170] [195].

2.2.6.2. Les différents édulcorants

Il a été décrit dans la partie 1.1 (Qu'est ce qu'un édulcorant ?), les types d'édulcorants disponibles tels que les édulcorants de masse et les édulcorants intenses. Aujourd'hui, il est autorisé dans l'Union Européenne, pas moins de 20 édulcorants différents [88] [196] (Tableau 24). Les derniers entrés en vigueur sont les glycosides de stéviol (2011) ou encore l'advantame (2014).

Ces édulcorants peuvent être utilisés dans les denrées alimentaires seuls ou mélangés à d'autres édulcorants. Il n'est pas rare d'observer des associations d'édulcorants dans l'alimentation.

Tableau 24 : Référence et nom des édulcorants autorisés en France [88] [168] [196].

Référence	Nom
E420 (i) et (ii)	Sorbitol et sirop de sorbitol
E421	Mannitol
E950	Acésulfame de potassium
E951	Aspartame
E952 (i), (ii) et (iii)	Acide cyclamique et ses sels de Na et de Ca
E953	Isomalt
E954 (i), (ii), (iii) et (iv)	Saccharine et ses sels de Na, K et Ca
E955	Sucralose
E957	Thaumatococine
E958	Glycyrrhizine
E959	Dihydrochalcone de néohespéridine
E960	Glycosides de stéviol
E961	Néotame
E962	Sel d'aspartame-acésulfame
E963	Tagatose
E965 (i) et (ii)	Maltitol et sirop de maltitol
E966	Lactitol
E967	Xylitol
E968	Érythritol
E969	Advantame

Note: l'alitame (E956) et le sirop de polyglycitol (E964) ont été interdits à la commercialisation sur le sol européen.

À côté des édulcorants cités ci-dessus, il existe des produits sucrants pouvant être utilisés afin d'apporter un goût sucré. Ils ne sont pas considérés comme des additifs alimentaires, mais comme des ingrédients à part entière. Nous retrouvons dans cette catégorie, le glucose, le fructose, le miel, le sirop d'érable, l'inuline et bien d'autres.

2.2.6.3. Le marché de la stévia et des édulcorants

2.2.6.3.1. Aspect portefeuille

Un édulcorant a une seule propriété : apporter une saveur sucrée à un aliment. Malgré cette unique propriété, il en existe beaucoup. S'il y en a autant en circulation, c'est que le marché est demandeur. En effet, face au contexte sanitaire mondial (2. Données épidémiologiques et économique sur l'obésité et le diabète), il est urgent de trouver un édulcorant capable de répondre aux besoins de chacun. Idéalement, ce serait un édulcorant peu coûteux, non calorique, facilement et rapidement produit, stable dans le temps et à la chaleur, sûr et sans arrière goût (similaire à celui du saccharose). Un tel édulcorant existe dans le commerce, par exemple l'acésulfame de potassium [88] [197] ; cependant un dernier critère entre en jeu, c'est le caractère naturel. Depuis quelques années, un nouveau besoin s'est formé dans la population, celui de se tourner vers une alimentation plus "verte", c'est-à-dire plus naturelle, subissant moins de transformation et sans ajout de composants issus de la chimie de synthèse. La stévia, plus précisément les glycosides de stéviol, s'ancrent dans cette catégorie. Les

glycosides sont considérés comme des "édulcorants d'origine naturelle" car ils ne sont pas obtenus par synthèse chimique, mais par extraction des feuilles de stévia.

Malgré les nombreux critères d'attente que remplit la stévia, elle ne répond pas entièrement à la demande ; elle possède un arrière goût amer et de réglisse qui ne convient pas à tous et dirige de nombreuses personnes vers d'autres édulcorants. C'est la raison pour laquelle les industriels de la stévia tentent de masquer ce goût.

Il existe plusieurs voies exploitables de masquage de l'amertume, comme fabriquer des extraits plus purs ou se tourner vers des glycosides de stéviol mineurs. Actuellement, la voie la plus répandue est d'établir un mélange saccharose-stévia. Par exemple, en 2010, l'entreprise *PureCircle* s'est associée à une entreprise du sucre nommée *NordZucker* (sous le nom de *NP Sweet*), pour créer un mélange saccharose-stévia [198]. Ce mélange est intéressant pour dissimuler l'arrière goût de la stévia, de plus cela propose une alternative aux denrées "tout sucre" ou "zéro calorie". Mais d'un point de vue de santé publique, le produit final contient une part de saccharose non négligeable, qui constitue un apport calorique et entretient des pathologies type obésité et diabète.

Une solution de masquage pourrait venir d'un nouveau glycoside de stéviol ayant obtenu le statut *GRAS* récemment : le rébaudioside M ou encore appelé rébaudioside X [199]. D'après Prakash et al. [55], il serait plus intéressant d'un point de vue gustatif. Comparé au rébaudioside A, il apporterait un goût légèrement plus sucré et beaucoup moins amer (Figure 33). De plus, le rébaudioside M associé au rébaudioside A, B, ou D (à concentration de 3:1 à 6:1) ou à l'érythritol (100:1 à 50:1), offre un profil gustatif encore plus intéressant (Figure 34).

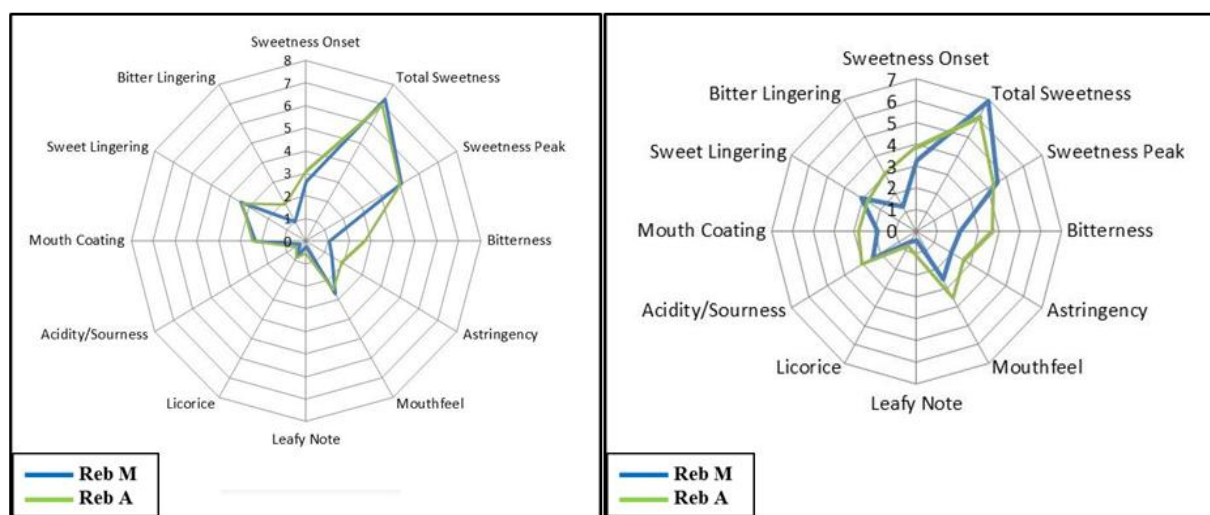


Figure 33 : Comparaison des attributs sensoriels du rébaudioside A et du rébaudioside M dans l'eau (gauche) et dans de l'eau acidifiée (droite) [55].

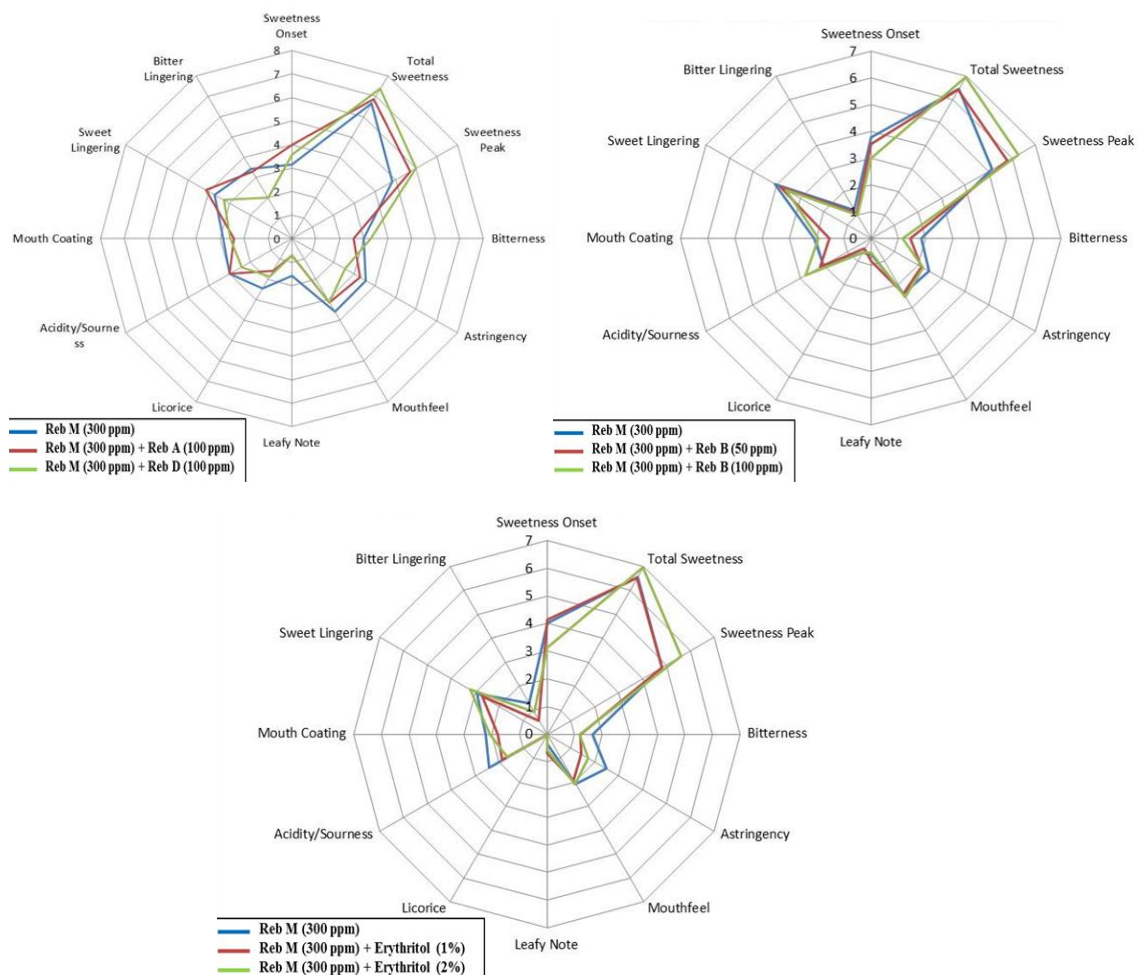


Figure 34 : Comparaison des attributs sensoriels de différents mélanges composés de rébaudioside M, (gauche) comparaison rébaudioside M au M+A et M+D ; (droite) comparaison rébaudioside M à différentes concentrations de mélange rébaudiosides M+B ; (bas) comparaison rébaudioside M à différentes concentrations du mélange rébaudiosides M+érythritol [55].

2.2.6.3.2. Estimations économiques

D'un point de vue économique le marché du "goût sucré" représenterait environ 80 milliards de dollars. Ce marché est réparti en trois catégories : le sucre (82%), le sirop de fructose (9%) et les édulcorants intenses (9%) [200]. Ce marché est en expansion, sauf pour le sucre (largement majoritaire sur le marché) qui tend à diminuer sa part de vente au profit des édulcorants.

Suite à une controverse sur certains édulcorants⁴⁶ et une attirance pour des produits naturels non caloriques, les parts cédées par le sucre se répercuteraient sur la stévia. Selon l'OMS, la stévia pourrait remplacer d'ici quelques années, 20% du sucre, soit un potentiel de plusieurs milliards de dollars [198] [200].

⁴⁶ Principalement l'aspartame.

Le cabinet *Zenith International*, a évalué les ventes mondiales de stévia⁴⁷ à 4 670 tonnes en 2014 (Figure 35), soit une augmentation de +14% par rapport à 2013 et de +33,5% par rapport à 2010 [201] [202]. Cette augmentation des ventes est expliquée par l'obtention du statut *GRAS* des glycosides de stéviol en 2008 et leur autorisation aux États-Unis d'Amérique (2008) [91], dans l'Union Européenne (2011) [46] et au Canada (2012) [203]. Les ventes devraient encore progresser avec l'entrée récente de la stévia sur le marché de l'Inde et de l'Indonésie [204].

Zenith International estime qu'en 2016, les ventes de stévia s'élèveront à 6 250 tonnes, et à 7 150 tonnes en 2017 ; ce qui représenterait des valeurs de 490 et 578 millions de dollars respectivement [201] [202].

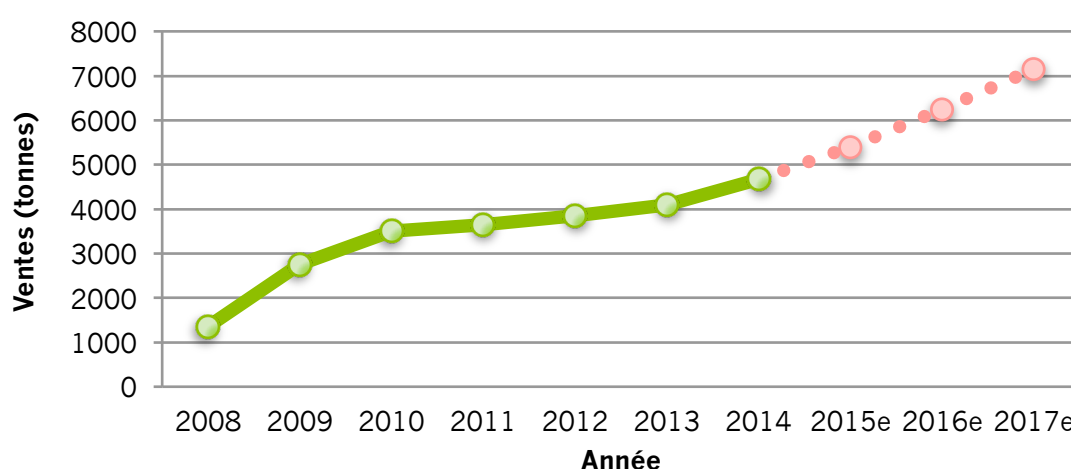


Figure 35 : Évolution des ventes mondiales de stévia, 2008-2013 [44] [201] [202]. (En vert) données réelles ; (En rouge) estimations.

De 2009 à 2013 dans le monde, le nombre de produit contenant de la stévia a augmenté chaque année. Selon l'analyste BASCH [205] cette augmentation serait presque de 57% annuellement (Figure 36). Toutefois, de nombreuses estimations sont retrouvées concernant la quantité en circulation. En 2013, ces estimations varient de 1 100 à 1 600 produits retrouvés [205] [206]. Certains parlent même de plus de 6 000 produits, comprenant médicaments, nourriture et boissons [200]. Ce dernier chiffre semble être relativement élevé contrairement aux estimations précédentes.

Il est retrouvé parmi ces produits : céréales, barres énergétiques, jus de fruit et majoritairement des boissons de type soda [206].

⁴⁷ Comprenant des extraits bruts et des produits purs [201].

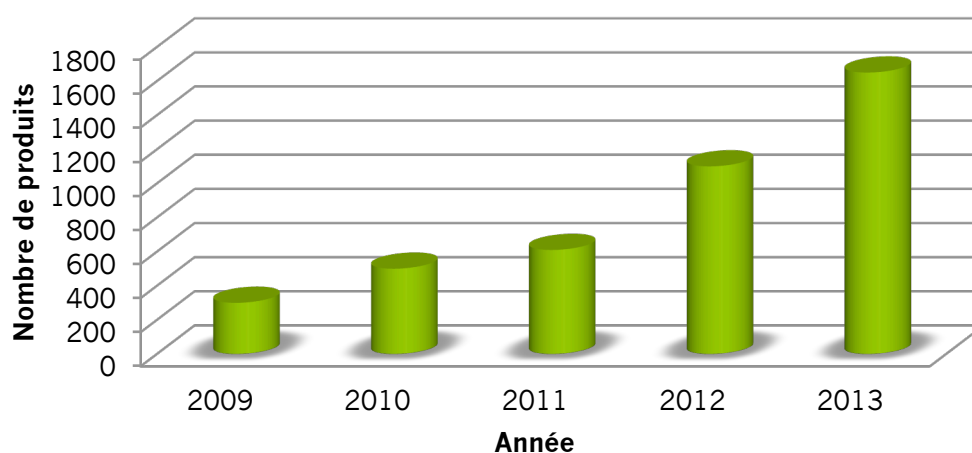


Figure 36 : Évolution du nombre de produits contenant des glycosides de stéviol dans le monde [205].

2.2.6.3.3. Acteurs économiques

Le marché du "goût sucré" étant évalué à 80 milliards de dollars [200], il est compréhensible que de nombreuses entreprises s'y intéressent. En ajoutant que la stévia a gagné en attractivité, beaucoup d'entreprises se sont lancées dans sa production ou son utilisation. Le tableau 26 présente les entreprises productrices de glycosides de stéviol dans le monde. Parmi ces entreprises, une grande partie se situe en Asie et notamment en Chine (plus de 400 entreprises). Cette forte proportion d'entreprises asiatiques vient du fait que des pays comme la Chine et le Japon interdisent l'usage de produits à base d'édulcorants de synthèse, ce qui fait que la stévia s'impose comme une alternative [207]. D'ailleurs, au Japon, la stévia est utilisée dans l'alimentation depuis plus de 40 ans [200].

La Chine est leader dans la production et l'extraction des glycosides de stéviol avec 80% de la production mondiale. Les États-Unis d'Amérique et le Japon quant à eux, sont les leaders de la consommation, avec environ 60% d'absorption de la production mondiale [208]. Ce dernier chiffre est également retrouvé dans une estimation de *Zenith International* (Tableau 25).

Tableau 25 : Évolution du marché mondial de la stévia en fonction de la localisation géographique [201] [209].

Découpage géographique	Marché en 2010 (%)	Marché en 2013 (%)
Asie (Pacifique)	36	33
Amérique du Nord	30	30
Amérique du Sud	24	25
Europe	9	11
Autres	1	1

Tableau 26 : Classement géographique, non exhaustif, des entreprises productrices de glycosides de stéviol dans le monde en 2013 [44].

Continent	Pays	Nom des entreprises
Afrique	Afrique du Sud	Globaltrade
	Cameroun	Che and Sons
Amérique du Nord	Canada	Ferlow Brothers
	États-Unis d'Amérique	NuSci Institute Daimoku Power PharmBrand USA LLC
Amérique du Sud	Argentine	QuFu Natural Green Project Co.
	Brésil	Stevia Comercial Exportadora
	Paraguay	SteviaLand International Agrolife
Asie	Chine	Shandong Shengwang Group Pharmaceutical Ganzhou Julong High-tech Industrial Co. GLG Life Tech Corp. Ministry of Ningbo Dekang Biochem Co. et plus de 400 autres entreprises
	Corée du Sud	KOTRA Daepyeong Ginseng Korea Macrocare Tech
	Inde	Golden Trees Bio Tech Pvt. Ltd. Biosweet Ventures GoGreen Pvt. Ltd.
	Japon	Morita Kagaku Kogyo Co. Tokiwa Phytochemical Co. Tama Biochemical Co.
	Singapour	Allspices (SG) pte Jal Innovation (s)
	Taiwan	Kasmac Industries Co.
Europe	Allemagne	B&S Naturwelten UG Mangostan-Gold Eco-Nature
	Belgique	Plant and Warmth
	Pologne	PHZ Libra Trade Lukasz Kirzynski Agrol
Océanie	Australie	Lancer Biomed Pvt. Ltd.

D'après les résultats présentés dans le tableau 25, le marché de l'Amérique du Nord reste stable, tandis que l'Europe a gagné 2%. La raison de cette progression vient de la nouvelle autorisation de circulation des glycosides sur le sol européen en 2011. En 2009, l'Europe avait émis une autorisation (avec réévaluation en 2011) des glycosides de stéviol en tant qu'édulcorant [171], mais à cette période la stévia suscitait quelques réticences ; depuis la réévaluation, les suspicions se sont dissipées et le marché a grimpé. La diminution de 3% de l'Asie ne provient pas d'une diminution de l'attraction pour la stévia, mais du fait que d'autres régions se sont mises rapidement à demander de la stévia. Malgré cette perte, le marché asiatique se porte bien car les quantités de stévia sont en expansion chaque année (Figure 35). L'Amérique du Sud pèse lourd dans le marché en se situant à la troisième place. Cette forte

consommation de stévia provient en partie du Brésil car l'utilisation d'édulcorants de synthèse est interdite [207].

2.2.6.3.4. Investissements et associations

Les entreprises de la stévia peuvent être divisées en trois catégories, de manière successive :

- les producteurs de stévia,
- les producteurs de glycosides de stéviol,
- les distributeurs de produits finis.

Une collaboration existe entre les différents acteurs car les distributeurs ont besoin des producteurs de glycosides de stéviol, qui eux ont besoin des producteurs de stévia. À ce jour, la demande en glycosides de stéviol est tellement forte que certains distributeurs s'associent avec des producteurs (client exclusif) ou que des distributeurs créent leur propre branche de production. Par exemple, le géant *Coca-Cola company* s'est associé avec *BU* afin de développer de nouvelles boissons, moins caloriques à base de stévia. C'est également le cas d'une autre firme de boisson, *PepsiCo* qui s'est associée à *Senomyx* [205].

Il arrive également que les groupes agro-alimentaires financent la recherche pour obtenir de meilleures variétés ou de meilleurs procédés d'obtention de glycosides de stéviol ; c'est le cas en 2013 du groupe *Cargill Inc.* qui a investi 5,3 millions de dollars dans les techniques de fermentation de stévia, en partenariat avec *Evolva Holding* [208].

En 2011, l'*International Stevia Council* a lancé un programme de standardisation de fabrication d'extrait de stévia nommé *Proficiency Testing Program*, dans le but de faciliter au plus grand nombre la production de glycosides de stéviol. Ce programme se concentre sur la qualité et les méthodes analytiques [198].

2.2.6.3.5. La stévia en France

La France, grand pays culinaire, est attirée par ce nouvel édulcorant d'origine naturelle qu'est la stévia. Entre 2009 et 2012, ses ventes ont représenté plus d'un tiers du marché des édulcorants de table [210]. Toutefois, en matière de plantation, la France ne connaît pas encore de réelles cultures de stévia. Nous en retrouvons dans les départements de l'Hérault, du Lot-et-Garonne et du Tarn. Ces cultures, lancées en 2011, sont encore au stade d'expérimentation afin de maîtriser la croissance de la plante dans des conditions climatiques françaises, plus précisément les climats océaniques et continentaux. Dans le but de développer et sélectionner une variété de stévia compétitive, une collaboration entre la filière Aquitaine

Stevia Innovation et l'institut national de recherche agronomique (INRA) a été réalisée [207] [211].

Le retard dans la culture de la stévia fait qu'aujourd'hui, 100% de la stévia commercialisée en France provient d'importation. En revanche, côté production d'extraits de stévia, il n'y a pas de retard. Des entreprises françaises se sont formées dans l'extraction des glycosides de stéviol, telles que *Stevia Natura* ou *Proviasud*. Ces entreprises ont l'avantage d'offrir ces glycosides avec une traçabilité aux normes Européennes ; plus claire que certains pays n'ayant pas la même législation en terme de qualité.

Les capacités industrielles françaises n'étant pas capable de concurrencer, à grande échelle, les groupes internationaux, des fusions ont été réalisées. Par exemple, l'entreprise française *Stevia Natura* a décidé de fusionner avec l'entreprise *Stevia International Europe*. Cette fusion a pour objectif de devenir n°1 du secteur en Europe, tant au niveau de la production de glycosides de stéviol, qu'au niveau de sa commercialisation [212].

Des industriels du sucre, observant les nouvelles exigences du marché en matière d'édulcorants, s'associent avec des groupes produisant et commercialisant la stévia. C'est le cas de l'entreprise sucrière française *Tereos* qui s'est associée en 2010 à *PureCircle*, leader mondial de la stévia (production et commercialisation) [198].

2.2.6.3.6. Abus et confusion

La Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) a constaté que des promoteurs de *S. rebaudiana* confondaient 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'une ne sont pas automatiquement applicables à l'autre car ces deux produits sont bien différents. Le public n'étant pas toujours averti qu'il existe deux types de produits, et il en découle beaucoup de confusion [29].

Il ne faut également pas confondre les stévioides et les glycosides de stéviol. Les glycosides de stéviol comprennent un ensemble de molécules dont le stévioid fait partie. Tout comme la confusion précédente, il ne faut pas automatiquement associer les conclusions de l'un à l'autre.

En Conclusion

Les pathologies comme l'obésité et le diabète sont de plus en plus nombreuses en France et dans le monde, engendrant des coûts de traitement de plus en plus élevés. Consommé en trop grande quantité, le saccharose apparaît en ligne de mire de ces fléaux et la population commence à en prendre conscience.

Les autorités ont également observé cette tendance ; elles agissent dans le bon sens en autorisant la circulation d'édulcorants non caloriques et en mettant en place des limitations à l'usage du sucre (publicité, taxes).

Les industriels du sucre et des édulcorants s'adaptent en fonction de la demande de la population, des données de santé et de la législation en vigueur. Ils suivent de près ces paramètres car ils influent directement le marché du "goût sucré". Étant un marché à fort enjeu financier de nombreuses entreprises se sont lancées dans la course à l'édulcorant idéal. Il y a donc beaucoup d'investissements et de recherches dans ce domaine. Des associations, fusions et autres collaborations sont nombreuses dans le but de répondre à la demande.

Sans discréditer les autres édulcorants, les glycosides de stéviol extraits de la stévia semblent être un bon candidat pour répondre à la plus large demande (industriels de l'agro-alimentaire, consommateurs). Leur gain d'attractivité provient principalement de leur origine qui n'est pas synthétique, mais naturelle. Bien qu'ils offrent un intense goût sucré, ils diffèrent de celui du saccharose par un arrière goût amer, de réglisse. Les glycosides de stéviol ne peuvent donc pas se substituer intégralement au saccharose sans apporter un goût supplémentaire. Les industriels tentent de masquer cet arrière goût (mélange saccharose - glycosides de stéviol) ou de le supprimer (sélection de glycoside(s) de stéviol dépourvu(s) d'arrière goût), mais à ce jour la seule méthode efficace est le masquage.

CONCLUSION

CONCLUSION

La stévia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) possède un pouvoir sucrant, non par un seul composé, mais grâce à un ensemble de molécules : les glycosides de stéviol. Ils possèdent une structure commune constituée d'un noyau stéviol et différent au niveau des unités osidiques. Ils possèdent de nombreux avantages tels qu'un indice glycémique de zéro, soit un apport nul en glucides et en calories et un fort pouvoir sucrant. Ils représentent une solution aux pathologies liées au sucre.

D'abord autorisés en France en 2009, puis dans toute la zone Euro en 2011, ils sont référencés en tant qu'édulcorant sous le numéro E960 et sont soumis aux réglementations européennes n°1131/2011 et 231/2012 qui encadrent son usage dans les denrées alimentaires et sa composition. Pour obtenir ce statut, les glycosides de stéviol ont du faire l'objet d'études poussées, notamment au niveau toxicologique. Ces études sont nombreuses et la majorité d'entre elles concluent à une innocuité des glycosides de stéviol. Ils ont également obtenu le statut de *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) par l'USFDA. Toutefois, ces études ont été soumises à controverse dans certains cas précis.

Les études pharmacologiques sur les extraits de stévia révèlent la présence d'activités anticariogène, antioxydante et antimicrobienne. Une activité antihypertenseur serait également présente mais seulement chez les individus hypertendus. Une activité antidiabétique ne peut pas être affirmée car les études sont contradictoires, bien que les plus récentes sont en faveur de ce potentiel. Enfin, les activités anti-inflammatoire et anticancérigène sont existantes, non lors d'une alimentation mais sous une forme d'administration particulière. À ce jour, en Europe, les glycosides de stéviol sont seulement utilisés en tant qu'additif alimentaire ; de nouvelles études sont nécessaires pour affirmer que la stévia a un avenir dans le domaine médical, en plus du domaine de l'agroalimentaire.

Concernant l'impact sur l'obésité et le diabète, il n'y a pas de diminution de ces pathologies depuis la commercialisation des glycosides de stéviol. Seulement en circulation depuis 2011 sur le sol européen, cette durée est supposée trop courte pour pouvoir observer des effets sur la population.

Au niveau financier, le marché de la stévia représente des milliards d'Euro, que ce soit à économiser pour le domaine public ou à bénéficier pour le domaine privé. Les coûts directs et indirects des pathologies liées à l'excès de sucre font que l'incitation dans la production et l'utilisation des glycosides de stéviol ne serait pas perdue. En effet, le traitement des pathologies liées à une surconsommation de sucre s'est élevé à 12,5 milliards d'Euro en 2007 rien que pour le diabète en France, auxquels s'ajoutent tous les coûts indirects.

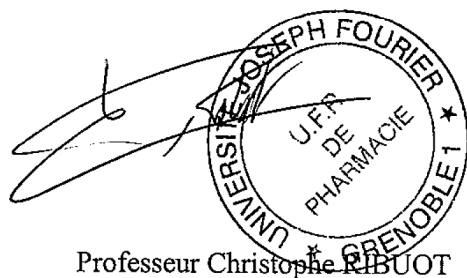
L'attractivité des glycosides de stéviol provient principalement de son origine non synthétique. Toutefois, ce critère est commercial et non sanitaire car une substance d'origine naturelle n'est pas toujours meilleure pour la santé. En effet, le saccharose a une origine naturelle (cane à sucre, betterave), mais consommé en quantité excessive il devient néfaste. La stévia peut devenir encore plus intéressante si ses propriétés antidiabétiques ou autres sont avérées et représentera toujours une bonne alternative à une surconsommation de saccharose ; elle est donc attendue tant au niveau sanitaire qu'au niveau économique.

Les édulcorants entretiennent l'attirance pour le goût sucré et donc la tentation d'un individu à continuer de se diriger vers des produits sucrés. La substitution du sucre par la stévia représente une des solutions, mais elle doit être complétée par une éducation de la population, une modification de l'alimentation, une activité physique et une responsabilisation personnelle. L'éducation et la baisse d'une consommation de sucre représentant une meilleure alternative que la substitution.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

GRENOBLE, le 10/10/2015

LE DOYEN



Professeur Christophe RIBAUT

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE



Docteur Serge KRIVOBOK

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 : Liste non exhaustive des composants chimiques présents dans les feuilles de *Stevia rebaudiana*.
- Annexe 2 : Structure des 15 glycosides de stéviol - Figure 1 : Hétérosides possédant la partie aglycone stéviol - Figure 2 : Hétéroside ne possédant pas la partie aglycone identique au stéviol.
- Annexe 3 : Séquence des amorces pour l'analyse de la transcription et conditions PCR utilisées.
- Annexe 4 : Formule des acides aminés d'après.
- Annexe 5 : Modèle général de l'homéostasie des acides aminés.
- Annexe 6 : Graphique 3D et surface de réponse montrant les effets de la température, du temps de contact et du débit sur la quantité de rébaudioside A extrait des feuilles de Stévia.
- Annexe 7 : Graphique 3D et surface de réponse montrant les effets de la température, du temps de contact et du débit sur la quantité de rébaudioside A extrait des feuilles de Stévia.
- Annexe 8 : Influence de la polarité du solvant sur l'extraction du rébaudioside A à partir des feuilles sèches de *Stevia rebaudiana* variété ms007 et ms012.
- Annexe 9 : Description d'un procédé d'extraction des glycosides de stéviol au dioxyde de carbone supercritique et diagramme d'un montage.
- Annexe 10 : Résumé des études sur la toxicité orale aiguë du stéviol, des glycosides de stéviol et des extraits de stévia ne respectant pas les spécifications de la JECFA.
- Annexe 11 : Résumé des études sur la toxicité subchronique du stéviol et des extraits de stévia ne respectant pas les spécifications de la JECFA.
- Annexe 12 : Résumé des études sur la génotoxicité du stéviol ou des extraits de stévia contenant du stéviol.
- Annexe 13 : Résumé des études sur la génotoxicité du stéviol selon les tests standards.
- Annexe 14 : Résumé des études sur la génotoxicité du stéviol et de ses composés pour des mutations directes chez TM677.
- Annexe 15 : Résumé des études de toxicité sur la reproduction et le développement des glycosides de stéviol respectant les spécifications de la JECFA.

Annexe 16 : Résumé des études de toxicité sur la reproduction et le développement des glycosides de stéviol ne respectant pas les spécifications de la JECFA.

Annexe 17 : Fiche toxicologique du méthanol.

Annexe 18 : Fiche toxicologique de l'éthanol.

Annexe 19 : Tableau résumant les types de denrées alimentaires ainsi que les doses maximales d'emploi pour les glycosides de stéviol.

Annexe 20 : Statistiques concernant la pathologie du diabète, sous différentes formes graphiques.

Annexe 1 : Liste non exhaustive des composants chimiques présents dans les feuilles de *Stevia rebaudiana* [44].

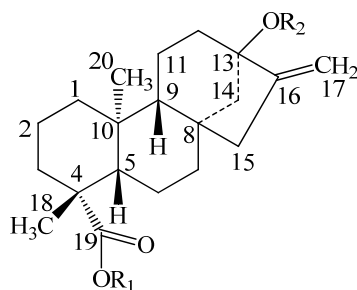
Famille	Composé	Rendement ^a (%m)
Diterpènes <i>ent</i>-kaurène	Dulcoside A	0,03
	Rébaudioside A (Rébiana)	1,43
	Rébaudioside B	0,44
	Rébaudioside C (Dulcoside B)	0,4
	Rébaudioside D	0,03
	Rébaudioside E	0,03
	Rébaudioside F	ND ^b
	Rébaudioside M (Rébaudioside X)	ND ^b
	Stéviolbioside	0,04
	Stévioside	2,18
Labdanes	Austroinuline	0,06
	6-O-Austroinuline	0,15
	Jhanol	0,006
	Stérébine A	0,001
	Stérébine B	0,0009
	Stérébine C	0,0003
	Stérébine D	0,0004
	Stérébine E	0,002
	Stérébine F	0,003
	Stérébine G	0,0002
	Stérébine H	0,0002
Flavonoïdes	Apigénine 4'-O-glucoside	0,01
	Kaempferol 3-O-rhamnoside	0,008
	Luteoline 7-O-glucoside	0,009
	5,7,3'-Trihydroxy 3,6,4'-triméthoxyflavone	0,01
Stérols	Stigmastérol	Trace
	Stigmastérol β -D-glucoside	Trace
Triterpènes	Acétate de β -amyrine	Trace
	Lupéol	Trace
	Esters de lupéol	Trace
Autres composants organiques	Chlorophylle A	0,00041
	Caroténoïdes	0,00007
	Pigments totaux	0,00075
	Tanins	7,8

^a : Le rendement est à titre indicatif, car il varie selon la culture, le type d'extraction...

^b : Non déterminé

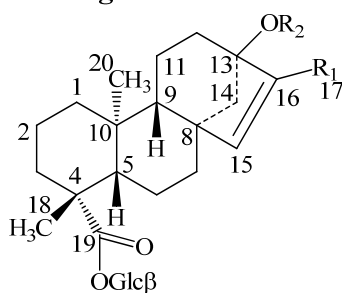
Annexe 2 : Structure des 15 glycosides de stéviol - Figure 1 : Hétérosides possédant la partie aglycone stéviol - Figure 2 : Hétéroside ne possédant pas la partie aglycone identique au stéviol [58].

Figure 1



Compound	R ₁	R ₂
1	Glcβ1	Glcβ1-2Glcβ1-
2	Glcβ1	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
3	H	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
4	H	Glcβ1-2Glcβ1-
5	Glcβ1	Glcβ1-
6	Glcβ1	Rhaα1-2Glcβ1-
7	Glcβ1	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
8	Glcβ1-2Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
9	Rhaα1-2Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
10	Glcβ1-	Glcβ1-6Glcβ1-2Glcβ1-
12	Glcβ1	Xylβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-
13	Glcβ1	Glcβ1-2(Xylβ1-3)Glcβ1-
14	Glcβ1	Xylβ1-2Glcβ1-
15	Glcβ1	Glcβ1-2Glcα1-4(Glcβ1-3)Glcβ1-

Figure 2



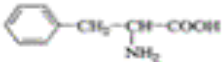
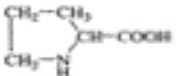
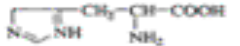
Compound	R ₁	R ₂
11	CH ₃	Glcβ1-2Glcβ1-

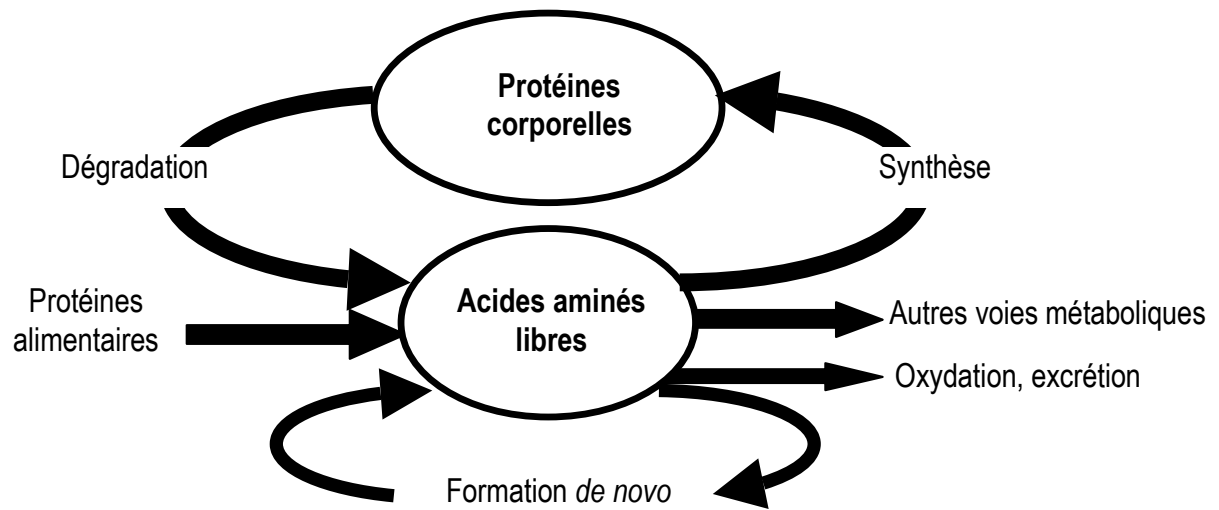
Glcβ: β-D-glucopyranosyl; Glcα: α-D-glucopyranosyl;
Rhaα: α-L-rhamnopyranosyl; Xylβ: β-D-Xylopyranosyl

Annexe 3 : Séquence des amorces pour l'analyse de la transcription et conditions PCR utilisées [69].

ADN complémentaire	Amorces (F : sens normal, R : sens inverse) (5'-3')	Conditions de la PCR
SrDXS	F : GATCTACAAAAGTTACCGGTTC R: TCCTCTACGGTAAGTAAGACTTC	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (29 cycles)
SrDXR	F : TTGAGCTATCTATCTCCAACAC R: TATCTGTTTCAGCAAGAAGAGTC	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (35 cycles)
SrMCT	F : AGACAAGATTCTGTTTTTAGTG R: GAGTTGTAACCTTGATGTTAGT	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (30 cycles)
SrCMK	F : AATCTATATCGCAAGAAGACTG R: CTTCCAGACATAAAAACAGAAT	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (31 cycles)
SrMDS	F : GAGCCTGGATACCCTCTCATC R: CCTCTTTATGCGGGCTTAACT	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (29 cycles)
SrHDS	F : AAAAGGTTGATTGATGTAAGTAT R: TAATAAGATAACCATCTCCAAGTC	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (30 cycles)
SrHDR	F : AAACAATTTGATGTCATTGATAA R: GGTTCCTTCTACTAGTTTTCCAA	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (30 cycles)
SrIDI	F : TATGAGTTACTCCTTCAGCAAC R: AGGTAGTCAAGTTCATGTTCTC	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (31 cycles)
SrGGDPS	F : AGTTCATGACGACCTTCCATGCA R: ATATGAATATACTCCAAGTGGTC	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (40 cycles)
SrCPPS1	F : CGACTCGAGACAAGATATTACT R: CTATAAAGGCTGTTATGTCCTC	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (32 cycles)
SrKS1-1	F : GAGAGAAGCTATATGGACAAGAG R: GATGTCCTTCACAGTATCAAGA	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (33 cycles)
SrKO1	F : GTTGAAGGAGAAGAAACCTTAC R: CAACATATAAGCTCTCCACATC	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (32 cycles)
SrUGT85C2	F : GAGAATCACTCTTGAGATCCAT R: TAATACTAGGCTCCAACCTCATC	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (31 cycles)
SrUGT74G1	F : CATGAACTGGTTAGACGATAAG R: TTATTACTCCTCTTTCCTCCTC	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (31 cycles)
SrUGT76G1	F : AACGTCAGTCAAACCCAATG R: CATAACAGCGAGCGGACCAT	94°C, 30 s, 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (30 cycles)

Annexe 4 : Formule des acides aminés d'après [71].

Nom	Symbole	Structure
Glycine	Gly (G)	$\text{H}-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$
Alanine	Ala (A)	$\text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$
Valine	Val (V)	CH_3 $\quad \quad \quad \text{CH}-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2$
Leucine	Leu (L)	CH_3 $\quad \quad \quad \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{NH}_2$
Isoleucine	Ile (I)	CH_3-CH_2 $\quad \quad \quad \text{CH}-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{NH}_2$
Phénylalanine	Phe (F)	
Tyrosine	Tyr (Y)	
Tryptophane	Trp (W)	
Sérine	Ser (S)	$\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \text{OH} \quad \text{NH}_2$
Thréonine	Thr (T)	$\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \text{OH} \quad \text{NH}_2$
Cystéine	Cys (C)	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$
Méthionine	Met (M)	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
Proline	Pro (P)	
Acide glutamique	Glu (E)	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
Glutamine	Gln (Q)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
Acide aspartique	Asp (D)	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
Asparagine	Asn (N)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
Lysine	Lys (K)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
Arginine	Arg (R)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
Histidine	His (H)	



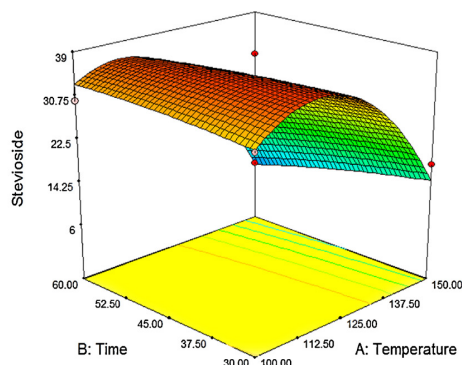
Annexe 6 : Graphique 3D et surface de réponse montrant les effets de la température, du temps de contact et du débit sur la quantité de rébaudioside A extrait des feuilles de Stévia [83]. (a) Évolution du temps et de la température à débit optimal constant ; (b) Évolution du débit et de la température au temps optimal constant ; (c) Évolution du débit et du temps à température optimale constante.

Design-Expert® Software

Stevioside
38.6712
3.27494

X1 = A: Temperature
X2 = B: Time

Actual Factor
C: Flow rate = 4.00

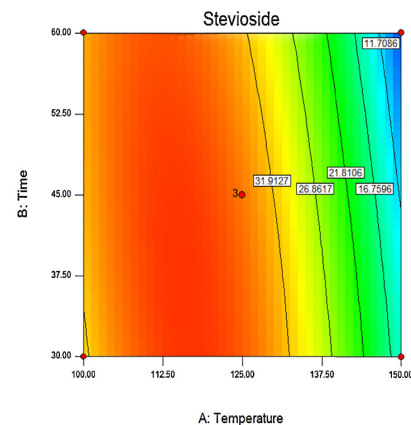


Design-Expert® Software

Stevioside
38.6712
3.27494

X1 = A: Temperature
X2 = B: Time

Actual Factor
C: Flow rate = 4.00

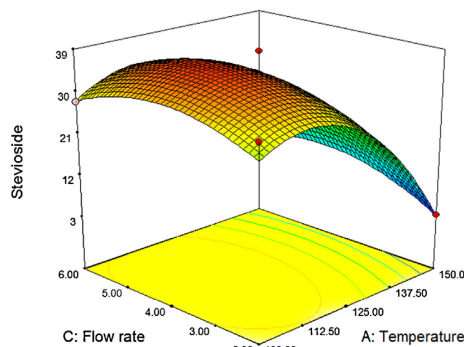


Design-Expert® Software

Stevioside
38.6712
3.27494

X1 = A: Temperature
X2 = C: Flow rate

Actual Factor
B: Time = 45.00

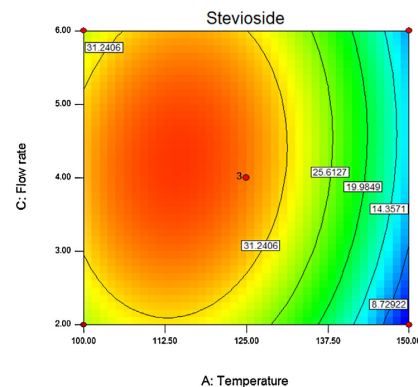


Design-Expert® Software

Stevioside
38.6712
3.27494

X1 = A: Temperature
X2 = C: Flow rate

Actual Factor
B: Time = 45.00

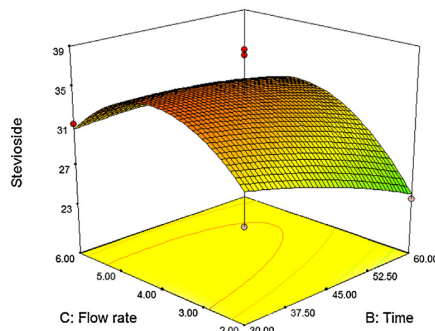


Design-Expert® Software

Stevioside
38.6712
3.27494

X1 = B: Time
X2 = C: Flow rate

Actual Factor
A: Temperature = 125.00

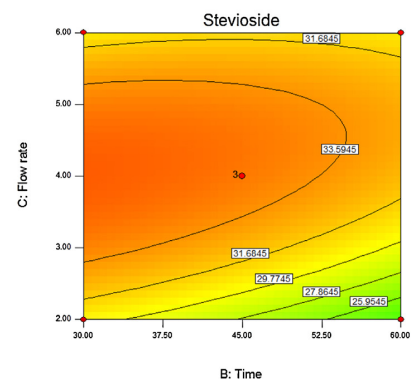


Design-Expert® Software

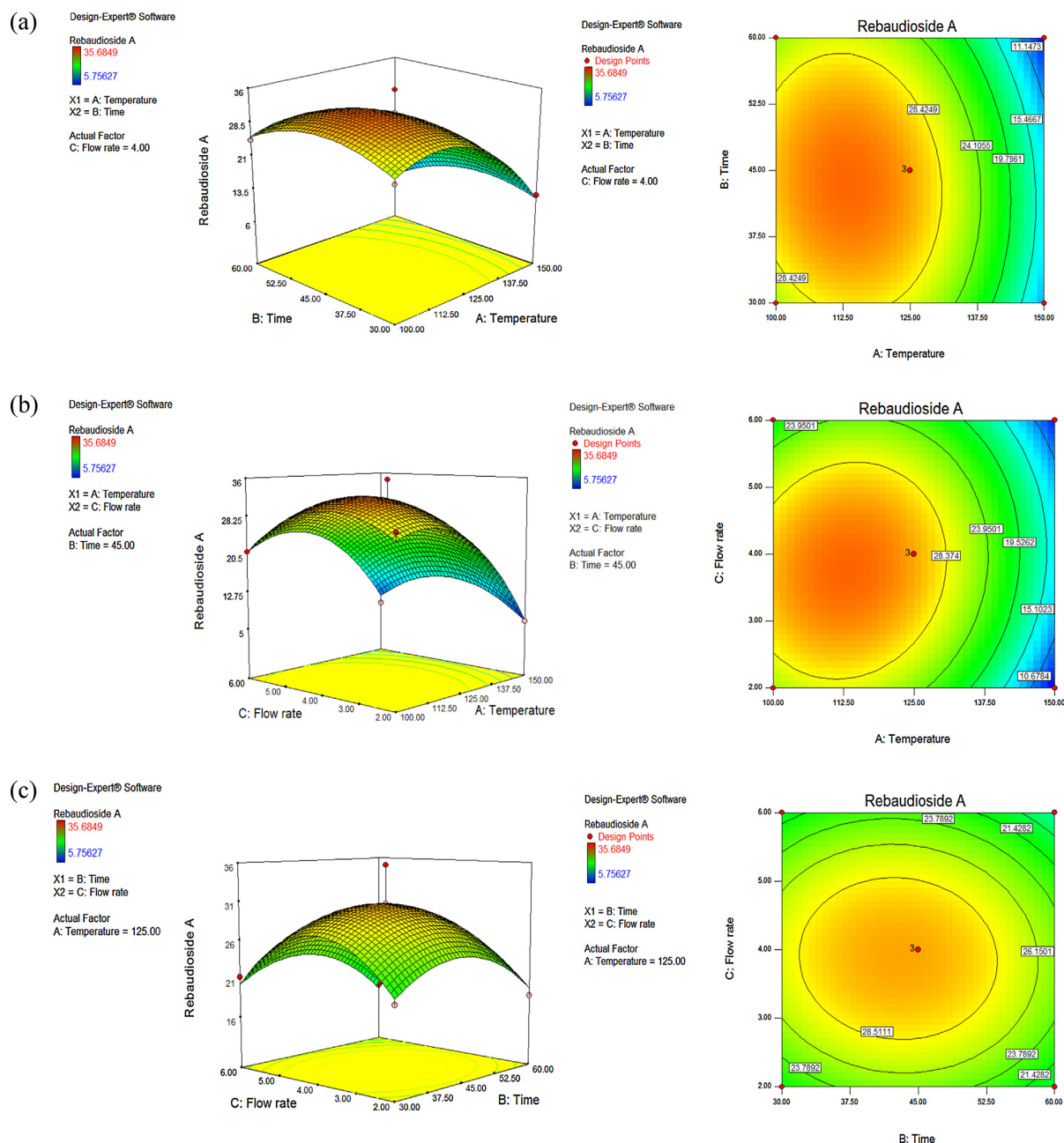
Stevioside
38.6712
3.27494

X1 = B: Time
X2 = C: Flow rate

Actual Factor
A: Temperature = 125.00



Annexe 7 : Graphique 3D et surface de réponse montrant les effets de la température, du temps de contact et du débit sur la quantité de rébaudioside A extrait des feuilles de Stévia [83]. (a) Évolution du temps et de la température à débit optimal constant ; (b) Évolution du débit et de la température au temps optimal constant ; (c) Évolution du débit et du temps à température optimale constante.



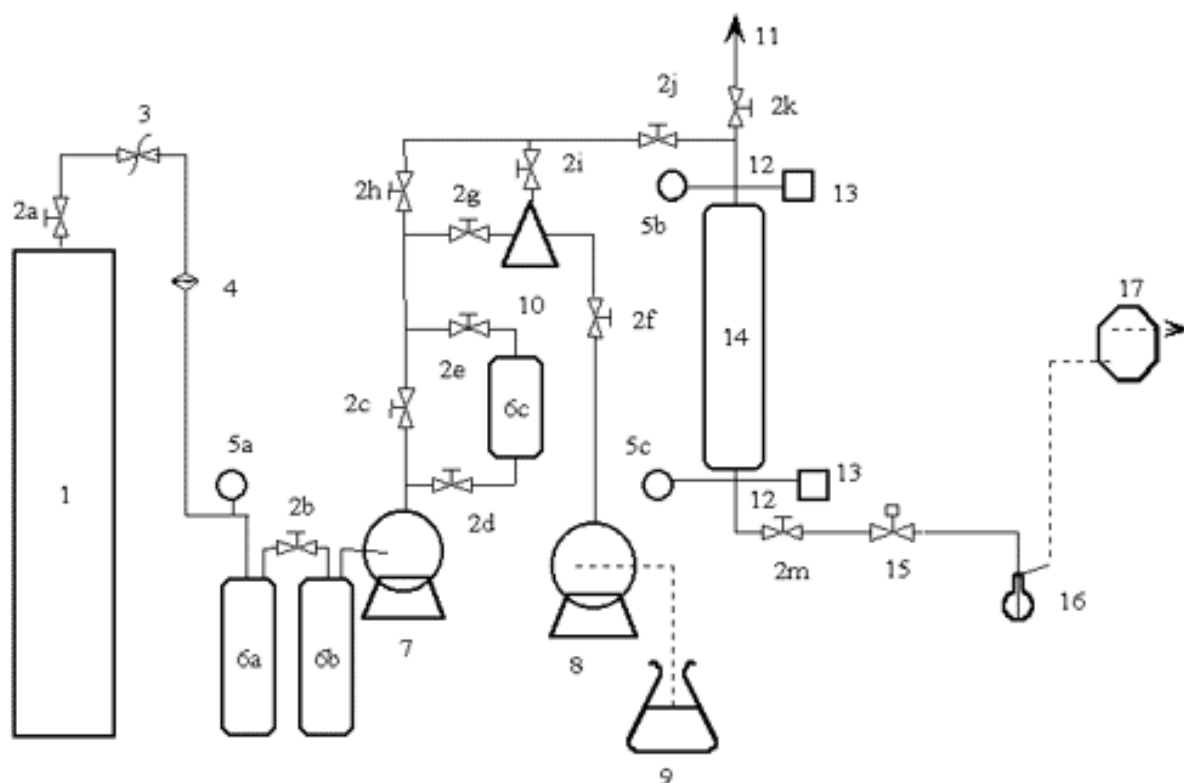
Annexe 8 : Influence de la polarité du solvant sur l'extraction du rébaudioside A à partir des feuilles sèches de *Stevia rebaudiana* variété ms007 et ms012 [95].

Solvant	Indice de polarité	Rendement en rébaudioside A (g/100 g feuilles sèches)	
		ms007	ms012
n-Hexane	0,1	0,007	- ¹
éther	0,1	0,003	- ¹
Acétone 100%	5,4	1,22	1,20
Acétone 70%	6,5	1,40	1,35
Éthanol absolu	5,2	1,81	1,72
Éthanol 75%	6,2	1,53	1,46
Éthanol 50%	7,1	1,20	1,11
Méthanol absolu	6,6	1,84	1,72
Méthanol 75%	7,2	1,70	1,59
Méthanol 50%	7,8	1,42	1,35
Eau	9,0	1,16	1,10

¹ Absence de formation de cristaux.

Annexe 9 : Description d'un procédé d'extraction des glycosides de stéviol au dioxyde de carbone supercritique et diagramme d'un montage [86] [100].

Pasquel et al. réalisent une extraction de ce type avec le montage ci-dessous : Tout d'abord, des feuilles de stévia séchées, broyées et pré-traitées sont placées dans la cellule d'extraction. Ensuite, augmentation de la température du système à 30°C, puis ouverture des vannes 2a, 2b, 2c. Quand la pression du système atteint 200 bars côté solvant et cosolvant, ouverture des valves 2f, 2g et 2i pour que l'ensemble se mélange puis ouverture des valves 2j, 2m et 15. A ce moment, le CO₂ est dans son état supercritique et rentre en contact avec les feuilles de stévia. L'extraction à lieu dans la cellule d'extraction et l'extract est collecté dans un flacon de récupération.



- (1) Réservoir du solvant ; (2) Valves ; (3) Valves de rétention ; (4) Filtre ; (5) Manomètre ; (6) Réservoir ; (7) Pompe (solvant) ; (8) Pompe (co-solvant) ; (9) Réservoir du co-solvant ; (10) Mélangeur ; (11) Valve de secours ; (12) Thermocouple ; (13) Affichage de la température ; (14) Cellule d'extraction ; (15) Valve micrométrique ; (16) Flacon de récupération ; (17) débit sortant.

Annexe 10 : Résumé des études sur la toxicité orale aiguë du stéviol, des glycosides de stéviol et des extraits de stévia ne respectant pas les spécifications de la JECFA [117].

Study	Dose	Reference
Stevioside in mice and rats.	LD ₅₀ = 15g/kg bw in mice; 8.2 g/kg in rats	Mitsuhashi, 1981
Stevioside, RebA, Reb B and steviolbioside in mice.	2 g/kg bw LD ₅₀ ≥ 2 g/kg bw	Medon <i>et al.</i> , 1982
Stevia extract (20% stevioside) in mice.	LD ₅₀ = 17 g/kg bw	Mitsuhashi, 1981
Stevia extracts (20.4% stevioside - 41.4% stevioside) in mice and rats.	LD ₅₀ = 17g/kg bw to > 42 g/kg bw in mice; LD ₅₀ = 17 g/kg bw in rats	Akashi and Yokoyama, 1975; Lee <i>et al.</i> , 1979
Steviol (90%)	LD ₅₀ values of >15 g/kg bw in mice and rats; 5-6 g/kg bw in hamsters	Toskulkao <i>et al.</i> , 1997
Isosteviol to mice, rats or dogs.	LD ₅₀ ≥ 500 mg/kg bw	Bazotte <i>et al.</i> , 1986

Annexe 11 : Résumé des études sur la toxicité subchronique du stéviolside et des extraits de stévia ne respectant pas les spécifications de la JECFA [117].

Study	Dose	NOAEL	Reported Effects	Reference
Short-term and subchronic				
90-day study in rats with stevioside (85%)	0, 1500, or 2500 mg/kg bw/day (0, 3, or 5%)	2500 mg/kg bw/day (5%)	► NSD <u>Highest dose NOAEL</u>	Xili <i>et al.</i> , 1992
1-month study in rats (by gavage) with stevioside (purity not stated)	Up to 2500 mg/kg bw/day	2500 mg/kg bw/day	► NSD <u>Highest dose NOAEL</u>	Mitsuashi, 1981
13-week study in rats with <i>Stevia</i> extract (53.1% stevioside)	0, 112, 590, and 2988 mg/kg bw/day in male, or 0, 115, 629, and 3026 mg/kg bw/day in female (0, 0.28, 1.4, or 7%)	2988 mg/kg bw/day for males, and 3036 mg/kg bw/day for females (7%)	► NSD <u>Highest dose NOAEL</u>	Akashi and Yokoyama, 1975
56-day study in rats with <i>Stevia</i> extract (50% stevioside)	0, 1250, or 2500 mg/kg bw/day	2500 mg/kg bw/day	► NSD <u>Highest dose NOAEL</u>	Lee <i>et al.</i> , 1979
Chicken fed with <i>Stevia</i> extract (content NR) from 1 st day to 42 nd day of age	0.0425 or 0.085%	NR	► ↓ body weight (with the lowest conc of 0.0085%)	Wood <i>et al.</i> , 1996
15-day in rabbits (non-oral routes) with stevioside	2.22 g (total)	NR	► NSD	Pomaret and Lavieille, 1931

Annexe 12 : Résumé des études sur la génotoxicité du stéviolside ou des extraits de stévia
contenant du stéviolside [122].

Test	Response	LED/HNED ^a	Conditions	Comment	Citation
Reverse mutation in <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	Negative in all strains	Data not available	Tests conducted both with and without S9	Company sponsored testing program	Tama Biochemical Co, Ltd., Safety of stevia (Tama Report 1-20, 1981) cited in Medon et al. (1982)
SCEs in human fetal cells, <i>in vitro</i>	Negative	Data not available	Test conditions not available	(See above)	(See above)
Chromosome aberrations in cultured rat cells, <i>in vitro</i>	Negative	Data not available	Test conditions not available	(See above)	(See above)
Forward mutation in <i>S. typhimurium</i> TM677	Negative	Data not available	Tested both with and without S9 induced by Arochlor 1254	SOT Abstract for 1982 meeting presentation	Medon et al. (1982) , SOT abstract publications
Reverse mutation in Ames strains TA98 and TA100	TA100 reported negative TA98 reported positive, without S9	TA100 = 50 mg/plate (HNED) TA98 = 50 mg/plate (LED)	Pre-incubation method used S9 produced from rats induced with combination of phenobarbital and 5,6-benzoflavone	Stevioside was 99% pure TA98 showed a four-fold increase; however, a 1% impurity would be 500 ug/plate at the high concentration	Suttajit et al. (1993)
Chromosome aberrations in human lymphocytes, <i>in vitro</i>	Negative	10 mg/ ml	Study conducted with and without S9 from rats induced by phenobarbital and 5,6 benzoflavone	No data were provided for this study in the publication	(See above)
Reverse mutation in Ames strains plus <i>E. coli</i> WP ₂ uvrA/pKM101	Negative in all strains tested	5 mg/plate for all strains and treatment conditions	Pre-incubation method used, standard Ames strains plus TA102 and TA104	Stevioside purity was 83%, no toxicity was seen in the test at the highest concentration tested	Matsui et al. (1996a)
Umu-test	Negative	5 mg/ml	Performed according to the methods of Oda et al. (1985)ck.	S9 used was from rats treated with a combination of phenobarbital and 5,6 benzoflavone	(See above)
Rec-assay	Negative	10 mg/paper disk	Performed according to the methods of Hirano et al. (1982)	Used S9 from rats treated with Arochlor 1254	(See above)
Chromosome aberrations in CHL cells, <i>in vitro</i>	Negative	12 mg/ml	Treatments were for 6, 24 and 48 h without S9 and for 6 h with S9, maximum concentrations set at >50% toxicity	Used S9 from rats treated with Arochlor 1254	(See above)
Reverse mutation in Ames strains TA98 and TA100	Negative results in both strains for all treatment conditions	50 mg/plate	Pre-incubation method used, all S9s induced by a combination of Phenobarbital and 5,6-benzoflavone	Compared S9s from rat, mouse, hamster and guinea pig	Klongpanichpak et al. (1997)
Mouse lymphoma forward mutation assay	Negative	5000 µg/ml	Micro-titer method used, 3 h exposures with and without S9 plus 24 h treatment without S9	No toxicity observed at the maximum concentration under either treatment condition	Oh et al. (1999)
Mouse micronucleus assay, <i>in vivo</i>	Negative	250 mg/kg	Single dose with 24 harvests of bone marrow and hepatocytes	ICR mice treated at only one dose, no toxicity reported	(See above)
Comet assay, <i>in vivo</i>	Negative results in all tissues examined	2000 mg/kg oral administration to ddY mice	Tissues examined for DNA damage at 3 and 24 h post exposure	Organs included glandular stomach, colon, liver, kidney, bladder, lung, brain and bone marrow	Sasaki et al. (2002)
Comet assay, <i>in vivo</i>	Negative results in all tissues examined	2000 mg/kg administration to BD F ₁	Tissues examined for DNA damage at 3 and 24 h post exposure	Organs included stomach, colon and liver	Sekihashi et al. (2002)
Comet assay, <i>in vivo</i>	Positive in all tissues examined	4 mg/ml in drinking water	Blood cells examined weekly, spleen, liver and brain tissues examined at exposure termination	Wistar rats given stevia extract for 45 days in their drinking water. No DNA effects were seen before week five	Nunes et al. (2007)

^a LED: lowest concentration tested that shows a clearly positive response according to the criteria of the specific test; HNED: highest concentration tested for a study with negative results.

Annexe 13 : Résumé des études sur la génotoxicité du stéviol selon les tests standards [122].

Test	Response	LED/HNED ^a	Conditions	Comment	Citation
Reverse mutation in Ames strains TA98 and TA100	Negative	20 mg/plate	Pre-incubation modification using S9 from rats induced by a combination of phenobarbital and 5,6-benzoflavone	Steviol was prepared by periodate oxidation of stevioside followed by acid hydrolysis and recrystallization	Suttajit et al. (1993)
Chromosome aberrations, <i>in vitro</i>	Negative	200 µg/ml	Studies conducted in human lymphocyte cultures with and without S9	No actual data provided to support author's conclusions	(See above)
Reverse mutation in Ames strains plus <i>E. coli</i> WP ₂ <i>uvrA</i> /pKM101	Negative	5000 µg/plate	Pre-incubation modification using S9 from rats induced by Kanechlor KC-400	Negative in all standard strains plus strains TA102 and TA104	Matsui et al. (1996a)
Umu-test	Positive	2500 µg/plate	Performed according to methods of Oda et al. (1985) with S9 from rats induced by a combination of phenobarbital and 5,6-benzoflavone	Approximate two-fold increase at the high concentration considered a weak positive	(See above)
Rec-assay	Negative	10 mg/paper disk	Performed according to methods of Hirano et al. (1982)	Used S9 from rats induced by PCBs	(See above)
Chromosome aberrations, <i>in vitro</i>	Positive	1000 µg/ml	Studies conducted in CHL cells, Cells sampled at 6, 24 and 48 h without S9 and at 6 h with S9	Used S9 from rats induced by PCBs Positive response only with S9	(See above)
Gene mutation in mammalian cells, <i>in vitro</i>	Positive	400 µg/ml	Studies conducted in CHL cells and assessed by resistance to diphtheria toxin	Used S9 from rats induced by PCBs Positive response only with S9 at highly toxic treatments (3% survival)	(See above)
Mouse micronucleus assay, <i>in vivo</i>	Negative	500 mg/kg	MS/Ae mouse strain used, compound administered i.p. with 24 and 48 h harvests	Toxicity seen at 1000 mg/kg	(See above)
Reverse mutation in Ames strains TA98 and TA100	Negative	2000 µg/plate	Pre-incubation method using S9 from animals induced by a combination of phenobarbital and 5,6-benzoflavone	Authors compared S9s from rat, mouse, hamster and guinea pig All tests negative	
Klongpanichpak et al. (1997)					
Gene mutation in mammalian cells, <i>in vitro</i>	Negative	341 µg/ml	Study conducted in mouse lymphoma cells L5178Y at the TK gene (with and without S9)	Toxicity did not exceed a RTG of 40%	Oh et al. (1999)
Mouse micronucleus assay, <i>in vivo</i>	Negative	200 mg/kg	Single oral dose with only a 24 h harvest of liver hepatocytes	No harvest at 48 h	(See above)
Micronucleus assay, <i>in vivo</i>	Negative	4 gm/kg For hamsters and 8 gm/kg for rats and mice	Study conducted using single oral dose in mice, rats, hamsters (both sexes), bone marrow cells harvested at 24, 30, 48 and 72 h post exposure	Toxicity seen in all species at high dose with females appearing to be more sensitive	Temcharoen et al. (2000)
Comet assay, <i>in vivo</i>	Negative	2 gm/kg	Mice were exposed by a single oral dose and tissues collected at 3 and 24 h post exposure	Stomach, colon, liver, kidney, and testis tissues evaluated for DNA damage	Sekihashi et al. (2002)
Comet assay, <i>in vitro</i>	Negative	500 µg/ml	Studies conducted in TK6 and WTK1 cell cultures both with and without S9		(See above)
Plasmid mutagenesis	Positive	Not reported	Induction of <i>xgprt</i> mutants in plasmid pSV2- <i>gpt</i> in the presence of S9	Mutants analyzed and shown to be small deletions which was offered as an explanation why steviol was not mutagenic in the Ames strains	Matsui et al. (1989)

^a LED: lowest concentration tested that shows a clearly positive response according to the criteria of the specific test; HNED: highest concentration tested for a study with negative results.

Annexe 14 : Résumé des études sur la génotoxicité du stéviol et de ses composés pour des mutations directes chez TM677 [122].

Test	Response	LED/HNED ^a	Conditions	Comment	Citation
Forward mutation in <i>S. typhimurium</i> TM677	Steviol-positive negative compounds were isosteviol, dihydrosteviol A&B, ent-kaurenoic acid, steviol-16a,17-epoxide	LED for steviol was 100 µg/ml HNED for the other compounds was 10 mg/ml	Pre-incubation suspension assay, S9 mix from rats treated with Arochlor 1254	Authors tested S9s from animals induced by Arochlor as well as phenobarbital (marginal response) and 3-methylcholanthrene (no response)	Pezzuto et al. (1985)
Forward mutation in <i>S. typhimurium</i> TM677	Steviol-positive 19-0-B-D glycopyranosyl steviol-positive negative compounds were ent-kaurenoic acid and steviol acetate	LED for Steviol was 100 µg/ml and for glycopyranosyl steviol ug/ml, negative compounds tested up to 7500 µg/ml	Pre-incubation suspension assay, S9 mix from rats treated with Arochlor 1254	Authors showed that 13-hydroxy group is essential, acylation at this site blocks mutagenicity Authors suggest epoxide not the active mutagenic agent	Pezzuto et al. (1986)
Forward mutation in <i>S. typhimurium</i> TM677	15-Oxosteviol- positive (-S9), 15a-hydroxysteviol-negative	LED for 15-oxosteviol was 150 µg/ml HNED for 15a-hydroxysteviol was 7500 µg/ml	Pre-incubation suspension assay, S9 mix from rats treated with Arochlor 1254	15-Oxosteviol was not identified as a metabolite using mass spectral analysis but was hypothesized to be a short-lived derivative of 15a-hydroxysteviol, known metabolite	Compadre et al. (1988)
Forward mutation in <i>S. typhimurium</i> TM677	15-Oxosteviol- negative	122 µg/ml	Pre-incubation suspension assay, without and with S9 mix from rats treated with Arochlor 1254	15-Oxosteviol was not mutagenic in 4 trials leading the authors to conclude that the data of Compadre et al. (1988) was a technical artifact of selective toxicity	Procinska et al. (1991)
Forward mutation in <i>S. typhimurium</i> TM677	Steviol-positive	Not reported	Pre-incubation suspension assay, without and with S9 mix from rats treated with Arochlor 1254	Sequence analysis of steviol-induced mutants indicated that mechanism for steviol involves DNA synthesis disruption	Matsui et al. (1996a)
Forward mutation in <i>S. typhimurium</i> TM677	15-Oxosteviol and 5 other derivatives of steviol were positive in the presence of S9	Not reported	Pre-incubation suspension assay, without and with S9 mix from rats treated with Arochlor 1254	Results in this manuscript contradicts other tests with 15-oxosteviol, because it was positive only with S9	Terai et al. (2002)

^a LED: lowest concentration tested that shows a clearly positive response according to the criteria of the specific test; HNED: highest concentration tested for a study with negative results.

Annexe 15 : Résumé des études de toxicité sur la reproduction et le développement des glycosides de stéviol respectant les spécifications de la JECFA [117].

Reproductive and developmental toxicity				
Preliminary reproductive study in rats with steviol glycoside preparation (RebA ≥ 97%); F ₀ females from 14 th to 21 st day of lactation, F ₁ juveniles from day 14 until day 35 of age.	0, 25 000, 37 500, or 50 000 mg/kg diet (0, 4711, 8021, 9484 mg/kg bw/day during the first 4 days, or 0, 6291, 10 045, 11 386 mg/kg bw/day during day 17 to 20 of lactation		► ↓ body weight gains and food consumption at conc higher than 25000 mg/Kg in F ₁ generation	Curry <i>et al.</i> , 2008
Two-generation repro/develp study in rats with steviol glycosides preparation (RebA ≥ 97%). F ₀ males: 17 weeks; F ₀ females: Pre-mating, 10 weeks; Mating, up to 3 weeks; Gestation, days 1 to 20 after conception; Lactation, days 1 to 21 after parturition (total of approximately 20 weeks)	0, 7500, 12 500, or 25 000 mg/kg diet (0, 586, 975, 2048 mg/kg bw/day, males); 0, 669, 1115, 2273 mg/kg bw/day, pre-mating females; 0, 648-713, 1119-1169, 2263-2381 mg/kg bw/day, gestation; and 0, 715-1379, 1204-2388, and 2602-5019, lactation.	25 000 mg/kg diet (2 048 and 2 567 mg /kg bw/day for males from F ₀ and F ₁ ; 2273 mg/kg bw/day (F ₀) and 2768 mg/kg bw/day (F ₁) during the pre-mating , 2322 mg/kg bw/day (F ₀) and 2124 mg/kg bw/day (F ₁) during the gestation, and 3811 mg/kg bw/day (F ₀) and 4091 mg/kg bw/day (F ₁) during the lactation, for females.	► NSD <u>Highest dose NOAEL</u> (for reproductive performance in the F ₀ and F ₁ adult rats, for survival, growth, and general condition of the F ₁ and F ₂ offspring, and for sexual maturation of the F ₂ offspring).	Curry <i>et al.</i> , 2008
Teratology study in rabbits with steviol glycosides preparation (RebA ≥ 97%) from day 6 to 28 of gestation.	0 , 350, 700 and 1400 mg/kg bw/day	1400 mg/kg/day	► ↓ body weight and food consumption ► disturbed clinical appearance and death in the high-dose group. <u>Highest dose NOAEL</u> (rabbits are susceptible to disturbances of the alimentary tract).	Charles Rivers Laboratories, 2008
Fertility study in rats with stevioside (95.98%) before and during mating for a	0, 100, 480, 2100 mg/kg bw/day for males, and 0, 120, 530, 2100 mg/kg bw/day for females (0, 0.15, 0.75, or 3%)	2100 mg/kg bw/day (3%)	► delayed increase in body weight in early period of administration in highest dose.	Mori <i>et al.</i> , 1981
total period of 60 days (males); for 14 days before mating and 7 days during gestation (females).			<u>Highest dose NOAEL</u> (based on fertility and development of fetuses).	
Repro./Develp. toxicity study in rats with stevioside (95.6%) between day 6 to 15 of gestation.	0, 250, 500, or 1000 mg/kg bw/day	1000 mg/kg bw/day	► NSD <u>Highest dose NOAEL</u> (for both pregnant rats and fetuses).	Usami <i>et al.</i> , 1995; Tanaka <i>et al.</i> , 1991 (unpublished report)

↓ = decreased; ↑ = increased; NOAEL = no observed adverse effect level; NR = not reported; NSD = no significant differences

Annexe 16 : Résumé des études de toxicité sur la reproduction et le développement des glycosides de stéviol ne respectant pas les spécifications de la JECFA [117].

Reproductive and developmental toxicity				
Repro./develop. study 0.69% crude <i>Stevia</i> extract (20% stevioside), 0.35% refined <i>Stevia</i> extract (40 to 55% stevioside), or 0.15% crystallized stevioside (93 to 95% purity) in rats for 21 days prior to mating	83.4, 80.0, or 84.9 mg/kg bw/day of stevioside for male rats, and 96.2, 101.7, or 101.2 mg/kg bw/day of stevioside for female rats, respectively	NR	► NSD	Akashi and Yokoyama, 1975
3-generation study in hamster with stevioside (90%)	0, 500, 1000, or 2500 mg/kg bw/day	2500 mg/kg bw/day	► NSD	Yodyingyuad and Bunyawong, 1991
Developmental toxicity study in zebrafish with stevioside, rebaudioside A, rubusoside, steviol monoside, and steviol glucuronide.	Up to 200 µM	NR	Highest dose NOAEL (regard to growth and reproduction) ► NSD, except for steviol: developmental delays, pericardial edema, circulatory defects and lethality at the highest conc.	Crawford <i>et al.</i> , 2008
Developmental toxicity study in hamster with steviol (90%) on days 6 to 10 of gestation	0, 250, 500, 750, or 1000 mg/kg bw/day	250 mg/kg bw/day (for both maternal and developmental toxicity)	► ↑ mortality rate ► ↓ maternal body weight ► ↑ pathological effect in kidneys (dilation and hyaline formation of convoluted tubules) ► ↓ foetal weight and numbers of live fetuses	Wasuntarawat <i>et al.</i> , 1998
Aqueous <i>S. rebaudiana</i> in mice and rats	up to 2000 mg/kg bw	NR	► ↓ fertility (contraceptive effects)	Mazzei-Planas and Kuc, 1968; Nunes and Pereira, 1988
<i>Stevia</i> extract rats before mating (males and females) and during mating (females)	0-5000 mg/kg bw/day	NR	► NSD	Shiotsu (1996)
<i>Stevia</i> extracts (= 2.6 % stevioside) in rats for 31 days.	10 mL extract/kg bw/day (0, 5, 25 and 100 %) (equal to 0, 13, 65 and 260 mg/kg bw/day of stevioside)	NR	► NSD	Sinchomi and Marcorities (1989)
Aqueous <i>S. rebaudiana</i> in rats for 60 days	0-0.667 g dried leaves/mL, 2 mL/rat twice a day (2.668 g of dry <i>Stevia</i> leaves per day; 14.58 g dried leaves/kg bw/day)	NR	► ↓ absolute and relative seminal vesicle weights	Oliveira-Filho <i>et al.</i> , 1989
<i>Stevia</i> extracts in rats for 60 days	0-6.778 mg/kg bw/day	NR	► ↓ final weight of testes, seminal vesicle and cauda epididymidis ► ↓ fructose content of the accessory sex glands, the epididymal sperm concentration, and testosterone level	Melis, 1999
<i>Stevia Rebaudiana</i> in combination with an aqueous extract of Aegle marmelos (6%) in rats for 60 days prior mating	0, 8.5, 41, and 433 mg <i>Stevia</i> extract/kg bw/day (0, 0.2, 1, or 10%)	433 mg <i>Stevia</i> extract/kg bw/day	NSD	Saenphet <i>et al.</i> , 2006

↓ = decreased; ↑ = increased; NOAEL = no observed adverse effect level; NR = not reported; NSD = no significant differences

FICHE TOXICOLOGIQUE

FT 5

Méthanol

Fiche établie par les services techniques et médicaux de l'INRS

CARACTÉRISTIQUES

UTILISATIONS [1 à 5]

- Matière première pour la fabrication de l'aldéhyde formique et de l'acide acétique.
- Agent de méthylation en synthèse organique pour la fabrication de nombreux dérivés méthyliques : méthacrylate, téréphtalate, amines, éthers-oxydes, halogénures...
- Solvant dans l'industrie des peintures, vernis, encres, colorants, adhésifs, films.
- Agent d'extraction en chimie organique (purification des essences, des huiles, des graisses, de produits pharmaceutiques).
- Constituant de carburants spéciaux.
- Constituant du méthylène-Régie, dénaturant des alcools.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES [1 à 8]

Le méthanol est un liquide mobile, incolore, volatil, d'odeur plutôt agréable quand il est pur. Les données relatives au seuil de détection olfactive sont discordantes, les chiffres de 5 900, 1 500, 100 et 3 ppm ayant été trouvés par les différents expérimentateurs.

Le méthanol est miscible à l'eau, le mélange se faisant avec dégagement de chaleur et contraction, et à la plupart des solvants organiques (alcools, éthers, cétones...).

Il dissout les graisses et un grand nombre de matières plastiques et de sels minéraux ; c'est, à cet égard, un meilleur solvant que l'éthanol.



F - Facilement inflammable



T - Toxique

MÉTHANOL

R 11 – Facilement inflammable.
 R 23/24/25 – Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.
 R 39/23/24/25 – Toxique: danger d'effets irréversibles très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.
 S 7 – Conserver le récipient bien fermé.
 S 16 – Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer.
 S 36/37 – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.
 S 45 – En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).

200-659-6 – Étiquetage CE.

Selon la directive 67/548/CEE
et l'arrêté du 20 avril 1994 modifié.

CH₃-OH

Numéro CAS
67-56-1

Numéro CE (EINECS)
200-659-6

Numéro INDEX
603-001-00-X

Synonyme
Alcool méthylique



MÉTHANOL

DANGEREUX

H 225 – Liquide et vapeurs très inflammables.
 H 331 – Toxique par inhalation.
 H 311 – Toxique par contact cutané.
 H 301 – Toxique en cas d'ingestion.
 H 370. – Risque avéré d'effets graves pour les organes.

Les conseils de prudence P sont sélectionnés selon les critères de l'annexe 1 du règlement CE n° 1272/2008.

200-659-6

Selon le règlement CE n° 1272/2008
intégrant les critères du SGH.

(*) Mise à jour partielle de l'édition 2003.

Ses principales caractéristiques physiques sont les suivantes.

Masse molaire	32,04
Point de fusion	- 97,8 °C
Point d'ébullition	64,5 °C
Densité (D ₄ ²⁰)	0,7915
Densité de vapeur (air = 1)	1,11
Pressions de vapeur	3,8 kPa à 0 °C 12,3 kPa à 20 °C 34,4 kPa à 40 °C
Indice d'évaporation (oxyde de diéthyle = 1)	6,3
Point d'éclair en coupelle fermée	12 °C
Limites d'explosivité dans l'air (% en volume)	
limite inférieure	6,7 %
limite supérieure	36,5 %
Température d'auto-inflammation	464 °C
Coefficient de partage octanol/eau ; log Pow	0,74

À 20 °C et 101,3 kPa, 1ppm = 1,33 mg/m³.

En France, le méthanol dénaturé par le procédé général doit contenir 3,5 % de méthylène-Régie (mélange complexe qui donne un goût et une odeur désagréables, obtenu par carbonisation du bois et contenant 65 % de méthanol, des cétones et des impuretés pyrogénées) et 1 % de 2-propanol. Des procédés spéciaux de dénaturation peuvent être autorisés pour des usages particuliers.

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES [2, 4 à 7, 9]

Dans les conditions normales d'emploi, le méthanol est un produit chimiquement stable. Il possède les propriétés générales des alcools primaires (réactions d'oxydation, de déshydrogénation, de déshydratation et d'estérification). La mobilité de son groupe hydroxyle étant la plus élevée de la série, sa capacité réactionnelle est particulièrement grande.

Une oxydation brutale (par exemple combustion) le transforme en dioxyde de carbone et eau, alors qu'une oxydation ménagée conduit à l'aldéhyde formique, puis à l'acide formique.

Le méthanol peut réagir vivement avec les oxydants puissants tels que les mélanges nitro-chromiques ou sulfo-chromiques, l'acide nitrique, les perchlorates, les peroxydes, les hypochlorites alcalins, le brome, le chlore et, d'une manière générale, tous les composés organiques ou minéraux riches en oxygène et instables.

La réaction avec les métaux alcalins donne un méthylate avec dégagement d'hydrogène et peut être brutale. La plupart des autres métaux sont insensibles au méthanol, à l'exception du plomb, de l'aluminium et du magnésium.

Récipients de stockage

Le stockage du méthanol s'effectue généralement dans des récipients en acier. L'aluminium et certaines matières plastiques sont à éviter.

Le verre est utilisable pour de petites quantités ; dans ce cas, les récipients seront protégés par une enveloppe métallique plus résistante, convenablement ajustée.

VALEURS LIMITES D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE

Des valeurs limites d'exposition professionnelle contraignantes dans l'air des locaux de travail ont été établies en France pour le méthanol (art. R. 4412-149 du Code du travail) (voir tableau ci-dessous).

PAYS	VLEP		Court terme	
	Moyenne pondérée sur 8 h			
	ppm	mg/m ³	ppm	mg/m ³
France (VLEP réglementaire contraignante)	200	260		
Union européenne	200	260		
États-Unis (ACGIH)	200		250	
Allemagne (Valeurs MAK)	200	270		

MÉTHODES DE DÉTECTION ET DE DÉTERMINATION DANS L'AIR

■ Prélèvement au travers d'un tube rempli de deux plages de gel de silice SKC™ (SKC 226-15, breveté). Désorption par 5 ml d'eau déionisée. Dosage par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme [10, 11].

■ Prélèvement au travers d'un tube rempli de gel de silice. Désorption par l'eau déionisée. Dosage de l'espace de tête (*head-space*) par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme [28].

■ Prélèvement au travers de deux tubes connectés en série remplis d'Anasorb 747. Désorption par un mélange diméthylformamide/sulfure de carbone. Dosage par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme [29].

■ Utilisation d'appareils à réponse instantanée équipés des tubes réactifs colorimétriques Draeger (Méthanol 25/a) et Gastec (Méthanol n° 111, 111L et 111LL), mais les tubes colorimétriques ne sont pas sélectifs : tous les alcools et d'autres solvants peuvent réagir et donner une réponse semblable.

INCENDIE – EXPLOSION [1 à 4, 7, 8]

Le méthanol est un liquide facilement inflammable (point d'éclair : 12 °C en coupelle fermée) dont les vapeurs peuvent former des mélanges explosifs avec l'air (dans les limites de 6,7 à 36,5 % en volume). Les solutions aqueuses peuvent aussi s'enflammer aisément.

D'autre part, les oxydants puissants peuvent réagir vivement avec le méthanol.

Les feux de méthanol se caractérisent par des flammes importantes très peu visibles à la lumière du jour, un faible dégagement de fumées et un rayonnement thermique intense.

Les agents d'extinction préconisés sont les mousses spéciales pour liquides polaires, les poudres, le dioxyde de carbone. En général, l'eau n'est pas recommandée car elle peut favoriser la propagation de l'incendie. On pourra toutefois l'utiliser sous forme pulvérisée pour éteindre un feu peu important ou pour refroidir les récipients exposés au feu et disperser les vapeurs.

PATHOLOGIE – TOXICOLOGIE

TOXICOCINÉTIQUE – MÉTABOLISME

[12 à 15, 18, 23 à 25]

Absorption

Chez l'homme, comme chez l'animal de laboratoire, le méthanol peut être absorbé par ingestion, par inhalation ou par voie percutanée. Des essais sur volontaires ont notamment montré que :

- après une ingestion unique de méthanol, la concentration sanguine du produit est maximale après une heure environ (47 à 76 mg/l pour une dose de 70 à 84 mg/kg) ;
- lors d'une exposition à des concentrations de 80 à 215 ppm, le taux de rétention pulmonaire est voisin de 55 % quels que soient le temps d'inhalation et l'importance de la ventilation pulmonaire ;
- l'absorption percutanée peut conduire à des taux sanguins supérieurs à ceux obtenus pour une exposition à 200 ppm.

Distribution

Le produit absorbé diffuse rapidement dans l'eau totale de l'organisme, la concentration maximale étant la concentration plasmatique. La demi-vie plasmatique est voisine de 24 heures.

Métabolisme

La métabolisation du produit intervient essentiellement dans le foie. La première étape qui conduit à l'aldéhyde formique est, chez l'homme et chez le singe, régie principalement par l'alcool-déshydrogénase, enzyme non spécifique qui a une plus grande affinité pour l'éthanol et le butanol ; chez ces espèces, le système catalase-peroxydase, dont le rôle est prédominant chez la souris, le rat, le cobaye, le lapin et le chien, n'intervient que très faiblement. La deuxième étape, catalysée par la formaldéhyde-déshydrogénase, mène à l'acide formique. La troisième étape enfin, qui mène au dioxyde de carbone, est contrôlée par la voie métabolique des composés à un atome de carbone (système sous la dépendance d'un dérivé de l'acide folique) ; c'est l'étape limitante de cette biotransformation. Ceci explique l'accumulation des formiates dans l'organisme en cas d'administration massive ou répétée de méthanol.

Élimination

L'élimination du méthanol et de ses métabolites se fait dans l'air expiré (méthanol et dioxyde de carbone) et dans l'urine (méthanol et formiates). En raison de sa grande réactivité chimique et de son oxydation rapide en acide formique, l'aldéhyde formique n'est jamais mis en évidence. Chez les singes ayant reçu 6 g/kg de méthanol par voie intrapéritonéale, on retrouve dans l'air expiré 49 % du

produit administré, sous forme de dioxyde de carbone et 35 % sous forme inchangée, et dans les urines 16 % sous forme de méthanol et d'acide formique.

La concentration urinaire en méthanol, bien corrélée avec la concentration sanguine, est un bon indicateur de l'impregnation de l'organisme. L'administration d'éthanol qui réduit l'oxydation du méthanol par compétition au niveau de l'alcool-déshydrogénase provoque une augmentation marquée de la méthanolurie.

Surveillance biologique [27]

Le dosage urinaire du méthanol en fin de poste de travail et/ou fin de semaine peut être utilisé pour la surveillance biologique de l'exposition. Des valeurs guides ont été établies (voir Recommandations § II).

D'autres paramètres ont également été proposés : le dosage sanguin du méthanol en fin de poste, ainsi que les dosages sanguins en fin de poste et urinaires en début de poste de fin de semaine de travail de l'acide formique ; ils ne présentent pas d'avantages par rapport au dosage du méthanol urinaire.

Mécanisme d'action

L'existence chez l'homme et chez le singe d'une phase de latence précédant l'apparition des effets toxiques spécifiques du méthanol suggère que ceux-ci ne sont pas dus au produit lui-même, mais à ses métabolites. Le mécanisme de la toxicité oculaire n'est pas encore éclairci : l'aldéhyde formique a souvent été considéré comme responsable de cette toxicité, mais sans qu'on ait une preuve directe et sans que ce métabolite ait pu être détecté au niveau des organes lésés. Le rôle de l'acide formique est en revanche démontré dans l'acidose métabolique dont le développement coïncide avec son accumulation (mais d'autres anions organiques doivent également intervenir) et dans les effets toxiques sur le système nerveux central (augmentés chez les animaux déficients en acide folique qui oxydent mal les formiates, diminués par administration d'acide folique). Son implication est aussi possible dans les effets oculaires, car des modifications de l'électrorétinogramme ont pu être produites chez le singe par perfusion intraveineuse d'acide formique (et non d'aldéhyde formique).

TOXICITÉ EXPÉRIMENTALE

Toxicité aiguë [12 à 18]

La plupart des animaux de laboratoire sont peu sensibles à l'action du méthanol. Chez la souris, le rat, le cobaye, le lapin, le chat et le chien, les DL50 par voie orale sont comprises entre 6 et 14 g/kg ; chez le lapin, la DL50 par voie percutanée est voisine de 16 g/kg ; la CL50 par inhalation est de 65 000 ppm pour une exposition de 4 heures chez le chat, de 100 000 ppm pour une exposition de 1,5 heure chez la souris.

Pour toutes ces espèces et quelle que soit la voie d'administration, les symptômes observés traduisent essentiellement une action au niveau du système nerveux central : somnolence suivie d'une excitation, ataxie, paralysie partielle, narcose, convulsions et troubles respiratoires (tachypnée). En cas d'inhalation, y est associée une irritation des muqueuses des voies aériennes supérieures. La mort peut survenir par défaillance respiratoire. L'examen anatomo-pathologique révèle des œdèmes et des lésions

dégénératives multiples du tissu myocardique, des parenchymes hépatique et rénal et du système nerveux (fibres optiques et cellules ganglionnaires, système nerveux central).

Mais cette symptomatologie, l'horaire de son développement et les doses toxiques pour ces espèces diffèrent nettement de ce que l'on observe chez l'homme. En revanche, les études réalisées sur singes Rhésus ont montré que cette espèce était, à ces points de vue, beaucoup plus proche de l'homme :

- on observe chez ce singe, en plus des effets narcotiques propres à tous les alcools, deux types d'actions qui caractérisent chez l'homme la toxicité du méthanol : d'une part, des troubles visuels avec anomalies du fond d'œil pouvant entraîner une cécité totale et, d'autre part, le développement d'une acidose métabolique sévère ;
- il existe une période de latence asymptomatique de 8 à 12 heures ;
- la sensibilité de cette espèce est plus grande que celle des non-primates : DL50 par voie orale voisine de 2 à 3 g/kg, concentration de 1000 ppm létale pour certains animaux.

Localement, chez le lapin, le méthanol n'est que faiblement irritant pour la peau et pour l'œil. Le produit pur provoque une rougeur de la conjonctive chez tous les animaux, une opacité cornéenne modérée et réversible pour 50 % d'entre eux. Une solution aqueuse à 25 % est sans effet.

Toxicité subaiguë, chronique [12, 14]

Des rats ont reçu pendant 6 mois 1 % de méthanol dans leur eau de boisson sans qu'apparaisse d'atteinte particulière, clinique ou biologique. L'administration orale quotidienne, pendant un mois, de 10 ou 100 mg/kg détermine, en revanche, chez ces animaux des modifications hépatiques (dégénérescence focale du cytoplasme, gonflement de cellules, modifications d'activité de certaines enzymes microsomales). Des expériences réalisées sur un très petit nombre de chiens ont montré que ces animaux supportaient relativement bien des expositions répétées à des vapeurs de méthanol : ni modification du comportement, ni altération de la vision, ni perte de poids, ni modification biologique ou histologique après 100 jours d'exposition, 3 minutes, 8 fois/jour, à 10 000 ppm comme après 379 jours d'exposition, 8 heures/jour à 450-500 ppm.

Les souris survivent en état de narcose après 6 à 7 jours d'exposition, 3,5 à 4 heures/jour, à 48 000 ppm ; dans des conditions voisines (3,5 à 4 heures/jour à 54 000 ppm), elles succombent si cette exposition est répétée 13 à 15 jours.

Effets génotoxiques [16]

Le méthanol n'est pas mutagène pour les souches classiques de *Salmonella typhimurium* dans les conditions du test d'Ames, avec ou sans activation métabolique [12]. Il en est de même pour l'urine de souris ayant reçu par voie orale 1 g/kg par jour de produit, 5 jours consécutifs [19].

En revanche, le méthanol induit des mutations ponctuelles sur des cellules de lymphome de souris en culture [20].

In vivo, le méthanol augmente la fréquence des aberrations chromosomiques chez la sauterelle [14] et chez la souris [19, 21]. Chez cet animal, la réponse est dose-dépendante et se retrouve aussi bien par administration

orale que par administration intrapéritonéale ; elle s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des échanges de chromatides sœurs et de celle des micronoyaux dans les cellules de la moelle osseuse.

Effets sur la reproduction [16, 22]

L'exposition de rates gestantes à 20 000 ppm de méthanol, 7 heures par jour, pendant toute la durée de la gestation ou seulement entre le 7^e et le 15^e jour de la gestation, provoque une légère toxicité maternelle et une forte incidence de malformations congénitales chez les nouveau-nés (côtes surnuméraires ou rudimentaires, malformations des systèmes urinaire ou cardio-vasculaire). Dans les mêmes conditions, la dose de 5 000 ppm est sans effet [22].

TOXICITÉ SUR L'HOMME

Toxicité aiguë [12 à 15, 18, 25, 26]

Rares par inhalation ou par voie percutanée, les intoxications aiguës par le méthanol sont au contraire fréquentes par ingestion, celle-ci pouvant être accidentelle, mais étant le plus souvent provoquée par la consommation d'alcool frelaté.

Le délai d'apparition de la symptomatologie est variable, de 10 à 48 heures selon la dose ingérée. Le tableau associe :

- des signes non spécifiques :
 - une dépression du système nerveux central, responsable d'un syndrome ébrieux (vertiges, ataxie, céphalées, agitation) puis de troubles de conscience plus ou moins profonds, qui s'accompagnent parfois de convulsions, d'une dépression respiratoire, d'un collapsus cardio-vasculaire,
 - des signes d'irritation digestive (nausées, vomissements, douleurs digestives parfois) ;
- des signes propres à l'intoxication par le méthanol :
 - une acidose métabolique marquée, avec respiration rapide et ample, type Kussmaul ; son intensité est souvent importante, avec un pH artériel inférieur à 7, un taux de bicarbonates effondré et, parfois, une élévation des lactates,
 - des troubles visuels qui peuvent s'installer tardivement, au bout de 2 à 4 jours ; il s'agit d'une névrite optique rétro-bulbaire. On observe :
 - une mydriase bilatérale, avec abolition du réflexe photomoteur ; la mydriase était décrite comme signe typique de l'intoxication au méthanol dans les premières observations ; il apparaît maintenant qu'elle n'est pas constamment retrouvée,
 - une baisse progressive de l'acuité visuelle, pouvant aboutir à une cécité complète,
 - un rétrécissement concentrique du champ visuel.

Il existe une grande variabilité entre individus en ce qui concerne la résistance au méthanol. Dans les intoxications les plus graves, la mort peut survenir par défaillance respiratoire. Après une intoxication sévère, la récupération peut être totale, mais les séquelles oculaires sont relativement fréquentes (amputation du champ visuel, cécité complète).

L'intoxication par voie respiratoire est la plus fréquente dans l'industrie. La symptomatologie est voisine de celle qui vient d'être décrite, avec les mêmes signes neurologiques, digestifs, visuels et biologiques. On observe également une irritation des muqueuses nasales et oculaires

avec, en cas d'exposition massive ou prolongée, trachéite, bronchite, blépharospasme. Des essais sur volontaires ont montré que les concentrations suivantes étaient considérées comme tolérables chez l'homme : 1000 ppm pour une exposition de 1 heure, 500 ppm pour 8 heures, 200 ppm pour 8 heures/jour pendant 5 jours.

La projection de liquide dans l'œil peut entraîner conjonctivite, lésions superficielles de la cornée et chémosis.

Toxicité chronique [14, 15, 23 à 25]

Les études épidémiologiques réalisées sur des ouvriers exposés à des vapeurs de méthanol de façon chronique ne permettent pas de fixer avec précision les seuils d'action de ce produit. Il semble toutefois que, pour des expositions à long terme :

- des concentrations de 1200 à 1800 ppm puissent entraîner des troubles visuels analogues à ceux des intoxications aiguës (organes cibles : nerf optique et rétine) ;
- des concentrations de 200 à 300 ppm puissent provoquer des céphalées tenaces et récidivantes ;
- la concentration de 25 ppm soit sans effet.

L'absorption simultanée de produit par voie cutanée augmente évidemment les risques. Le contact répété ou prolongé avec le liquide peut donner des signes d'irritation cutanée : dermatose, érythème, desquamation.

RÉGLEMENTATION

Rappel : les textes cités se rapportent essentiellement à la prévention du risque en milieu professionnel et sont issus du Code du travail et du Code de la sécurité sociale. Les rubriques « Protection de la population » et « Protection de l'environnement » ne sont que très partiellement renseignées.

Il existe également une réglementation économique et fiscale du méthanol qui n'est pas traitée dans le cadre de cette fiche (voir avec le ministère chargé des Finances, Direction générale des impôts).

HYGIÈNE ET SÉCURITÉ DU TRAVAIL

1. Mesures de prévention des risques chimiques (agents chimiques dangereux)

- Articles R. 4412-1 à R. 4412-58 du Code du travail.
- Circulaire DRT n° 12 du 24 mai 2006 (non parue au JO).

2. Aération et assainissement des locaux

- Articles R. 4222-1 à R. 4222-26 du Code du travail.
- Circulaire du ministère du Travail du 9 mai 1985 (non parue au JO).
- Arrêtés des 8 et 9 octobre 1987 (JO du 22 octobre 1987) et du 24 décembre 1993 (JO du 29 décembre 1993) relatifs aux contrôles des installations.

3. Prévention des incendies et des explosions

- Articles R. 4227-1 à R. 4227-41 du Code du travail.
- Articles R. 4227-42 à R. 4227-54 du Code du travail.
- Décret 96-1010 modifié du 19 novembre 1996 (JO du 24 novembre 1996) relatif aux appareils destinés à être utilisés en atmosphère explosible.

4. Valeurs limites d'exposition professionnelle

- Article R. 4412-149 du Code du travail.
- Directive 2006/15/CE de la Commission du 7 février 2006 (JOCE du 9 février 2006).

5. Maladies de caractère professionnel

- Articles L. 461-6 et D. 461-1 et annexe du Code de la sécurité sociale : déclaration médicale de ces affections.

6. Maladies professionnelles

- Article L. 461-4 du Code de la sécurité sociale : déclaration obligatoire d'emploi à la Caisse primaire d'assurance maladie et à l'inspection du travail ; tableau n° 84.

7. Classification et étiquetage

a) du méthanol **pur** :

Le règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 (JOUE du 31 décembre 2008), dit « Règlement CLP », introduit dans l'Union européenne le nouveau système général harmonisé de classification et d'étiquetage ou SGH. La classification et l'étiquetage du méthanol harmonisés selon les deux systèmes (Directive 67/548/CEE et règlement) figurent dans l'annexe VI du règlement. La classification est :

- selon la directive 67/548/CEE ou l'arrêté du 27 juin 2000 (JO du 251 juillet 2000) modifiant l'arrêté du 20 avril 1994 (JO du 8 mai 1994)
Facilement inflammable ; R 11
Toxique ; R 23/24/25 – 39/23/24/25
- selon le règlement (CE) n° 1272/2008
Liquide inflammable catégorie 2 ; H 225
Toxicité aiguë catégorie 3 : H 331 – 311 - 301
Toxicité spécifique pour certains organes cibles, exposition unique catégorie 1 (STOT SE 1) ; H 370.

Se reporter aux étiquettes en début de la fiche toxicologique.

b) des **mélanges** (préparations) contenant du méthanol :

- Arrêté du 9 novembre 2004 modifié (JO du 18 novembre 2004) transposant la directive 1999/45/CE ou
- Règlement (CE) n° 1272/2008.

Des limites spécifiques de concentration ont été fixées pour le méthanol.

8. Entreprises extérieures

- Arrêté du 19 mars 1993 (JO du 27 mars 1993) fixant la liste des travaux dangereux pour lesquels il est établi par écrit un plan de prévention.

PROTECTION DE LA POPULATION

- Article L. 5132-2, articles R. 5132-43 à R. 5132-73, articles R. 1342-1 à R. 1342-12 du Code de la santé publique :
 - détention dans des conditions déterminées (art. R. 5132-66) ;
 - étiquetage (cf. 7) ;
 - cession réglementée (art. R. 5132-58 et R. 5132-59).

PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Installations classées pour la protection de l'environnement, Paris, imprimerie des Journaux officiels, brochure n° 1001 :

- n° 1431 : liquides inflammables, fabrication industrielle ;
- n° 1432 : liquides inflammables, stockage en réservoirs manufacturés ;
- n° 1433 : liquides inflammables, installations de mélanges ou d'emploi ;
- n° 1434 : liquides inflammables, installations de remplissage ou de distribution.

TRANSPORT

Se reporter éventuellement aux règlements suivants.

1. Transport terrestre national et international (route, chemin de fer, voie de navigation intérieure) :

- ADR, RID, ADN : Méthanol
- N° ONU : 1230
- Classe : 3
- Groupe d'emballage II

2. Transport par air

- IATA

3. Transport par mer

- IMDG

RECOMMANDATIONS

En raison de l'inflammabilité et de la toxicité du méthanol, des mesures sévères de prévention et de protection s'imposent lors de son stockage et de son utilisation.

I. AU POINT DE VUE TECHNIQUE

Stockage

■ Stocker le méthanol à l'air libre ou dans des locaux spacieux, frais, munis d'une ventilation, à l'abri de toute source d'ignition ou de chaleur (rayons solaires, flammes, étincelles...) et à l'écart des produits oxydants. Le sol des locaux sera incombustible, imperméable et formera cuvette de rétention afin qu'en cas de déversement accidentel le liquide ne puisse se répandre au dehors.

■ Le matériel électrique, y compris l'éclairage, sera conforme à la réglementation en vigueur.

■ Prévenir toute accumulation d'électricité statique.

■ Il sera interdit de fumer.

■ Les récipients seront soigneusement fermés et étiquetés. Reproduire l'étiquetage en cas de fractionnement des emballages.

Manipulation

Les prescriptions relatives aux locaux de stockage sont applicables aux locaux où est manipulé le méthanol. En outre :

■ Instruire le personnel des risques présentés par le produit, des précautions à observer et des mesures à prendre en cas d'accident.

■ Éviter l'inhalation de vapeurs. Effectuer en appareil clos toute opération industrielle qui s'y prête. Prévoir une aspiration des vapeurs à leur source d'émission, ainsi qu'une ventilation générale des locaux. Prévoir également des appareils de protection respiratoire pour certains travaux de courte durée, à caractère exceptionnel, ou pour des interventions d'urgence.

■ Procéder à des contrôles fréquents et réguliers de l'atmosphère et s'assurer du respect des valeurs limites d'exposition réglementaires (VLEP contraignantes).

■ Éviter le contact du produit avec la peau et les yeux. Mettre à la disposition du personnel des vêtements de protection, des gants (par exemple en caoutchouc butyle, polychloroprène ; les matières telles que caoutchouc naturel, caoutchouc nitrile, PVC ne sont pas recommandées [30]) et des lunettes de sécurité. Ces effets seront maintenus en bon état et nettoyés après usage.

■ Prévoir des douches de sécurité et des fontaines oculaires dans les ateliers où le produit est manipulé de façon constante.

■ Ne pas fumer, boire et manger dans les ateliers.

■ Entreposer dans les locaux de travail des quantités relativement faibles de produit et, de toute manière, ne dépassant pas celles nécessaires au travail d'une journée.

■ Interdire l'emploi d'air comprimé pour effectuer le transvasement ou la circulation du produit.

■ Ne jamais procéder à des travaux sur ou dans des cuves et réservoirs contenant ou ayant contenu du méthanol sans prendre les précautions d'usage [31].

■ Éviter les rejets atmosphériques et aqueux pollués par le méthanol.

■ En cas de fuite ou de déversement accidentel, récupérer le produit en l'épongeant avec un matériau absorbant non combustible, puis laver à grande eau la surface ayant été souillée. Si le déversement est important, évacuer le personnel en ne faisant intervenir que des opérateurs entraînés munis d'un équipement de protection.

■ Conserver les déchets imprégnés de solvant dans des récipients clos, spécialement prévus à cet effet. Le méthanol peut être régénéré ou détruit par incinération. Dans tous les cas, traiter les déchets dans les conditions autorisées par la réglementation (traitement dans l'entreprise ou dans un centre spécialisé).

II. AU POINT DE VUE MÉDICAL

■ À l'embauchage, rechercher plus particulièrement des signes d'atteinte du système nerveux central ou d'affection oculaire. Éviter d'exposer les sujets présentant une atteinte fonctionnelle hépatique sérieuse due notamment à un éthyisme.

■ Lors des visites ultérieures, pratiquer un examen clinique afin de mettre en évidence une éventuelle atteinte neurologique, oculaire ou hépatique ainsi que des signes d'irritation cutanée. Cet examen pourra être complété par des tests hépatiques. Certains médicaments pouvant potentialiser les effets neurologiques, d'une part, et l'exposition au méthanol, comme à la plupart des solvants organiques, pouvant être à l'origine de troubles neuropsychiques (irritabilité, mémoire...), d'autre part, il en sera tenu compte au cours de ces visites.

Surveillance biologique de l'exposition [27]

Le dosage du méthanol urinaire en fin de poste de travail et/ou fin de semaine est le témoin de l'exposition du jour même. Cet indicateur est pertinent à partir de 20 ppm : une bonne corrélation existe entre les concentrations atmosphériques et urinaires. Chez les sujets non professionnellement exposés, les taux de méthanol urinaire sont inférieurs à 3 mg/l.

Le BEI (Biological Exposure Index) de l'ACGIH revu en 2008 est pour le méthanol urinaire en fin de poste de travail de 15 mg/l (identique à la valeur guide française).

■ En cas de projection cutanée, laver immédiatement à grande eau. Retirer les vêtements souillés. Si cette mesure n'a pas été entreprise rapidement ou si des signes apparaissent, une hospitalisation est conseillée du fait du risque d'intoxication systémique.

■ En cas de projection oculaire, laver immédiatement à l'eau ou au sérum physiologique pendant 15 minutes, puis consulter un spécialiste.

■ En cas d'inhalation de fortes concentrations, retirer le sujet de la zone contaminée. S'il est inconscient, le mettre en position latérale de sécurité. Une hospitalisation est conseillée du fait du risque d'intoxication systémique.

■ En cas d'ingestion, si le sujet est parfaitement conscient, tenter de faire vomir, administrer du charbon médical activé, puis faire hospitaliser pour une surveillance clinique et biologique ainsi que la mise en route d'un traitement symptomatique et spécifique par un inhibiteur de l'alcool-déshydrogénase.

BIBLIOGRAPHIE

1. Methanol. International chemical safety cards. ICSC 0057, 2000 (<http://www.inchem.org>).
2. Kirk-Othmer - Encyclopedia of chemical technology, 3th ed. Vol. 15. New York: John Wiley and sons; 1981 : 398-415.
3. Encyclopedia of occupational health and safety, 3th ed. Vol 2. Genève: BIT; 1983 : 1356-1358.
4. Methanol - Data sheet I 407. Chicago: National Safety Council; 1984 : 6 p.
5. Occupational health guideline for methyl alcohol. Cincinnati: NIOSH/OSHA; 1978 : 5 p.
6. Marsden C - Solvents guide, 2^e éd. Londres: Cleaver Hume Press Ltd; 1963 : 347-355.
7. Methanol - Information sheet on hazardous materials H 42. Fire Prevention; 1975; 111: 23-24.
8. Weiss G - Hazardous chemicals data book, 2^e éd. Park Ridge: Noyes Data Corp. 1986 : 677.
9. Grignard V - Traité de chimie organique, vol. V. Paris: Masson; 1937: 670-674.
10. Alcool méthylique. Fiche 016. In: Métropol. Métrologie des polluants. Paris: INRS; 2006 (<http://www.inrs.fr/metropol>).
11. Qualité de l'air. Air des lieux de travail. Prélèvement et analyse de vapeurs organiques. Prélèvement par pompage sur tube à adsorption et désorption au solvant. Norme NF X 43-267. La Plaine Saint-Denis: AFNOR; 2004 : 49 p.
12. Clayton GD, Clayton FE - Patty's industrial hygiene and toxicology, 3th ed. Vol. IIC. New York: John Wiley and sons; 1981 : 4528-4541.
13. Wimer WW, Russel JA, Kaplan HL - Alcohols toxicology. Park Ridge: Noves Data Corp; 1983 : 8-26.
14. Criteria for a recommended standard - Occupational exposure to methyl alcohol. Cincinnati: DHEW (NIOSH); 1976 : 136 p.
15. Browning E - Toxicity and metabolism of industrial solvents. Amsterdam: Elsevier; 1965 : 311-323.
16. Registry of toxic effects of chemical substances, édition 1985-1986, vol. 3A. Cincinnati: DHHS (NIOSH); 3060-148 et 149.
17. Sax NI - Hazardous chemicals information annual No. 1. New York: Van Nostrand Reinhold Information Service; 1986 : 615-621.
18. Grant MW - Toxicology of the eye. Springfield: Charles C. Thomas; 1974 : 666-676.
19. Chang LW et al. - The evaluation of six different monitors for the exposure to formaldehyde in laboratory animals. *Environmental Mutagenesis*. 1983 (5) : 381.
20. McGregor DB et al. - Optimisation of a metabolic activation system for use in the lymphoma L 5178 γ tk⁺ tk⁻ mutation system. *Environmental Mutagenesis*. 1985 (3), suppl. 3 : 70.
21. Pereira MA et al. - Battery of short-term tests in laboratory animals to corroborate the detection of human population exposures to genotoxic chemicals. *Environmental Mutagenesis*. 1982 (4) : 317.
22. Nelson BK et al. - Teratological assessment of méthanol and ethanol at high inhalation levels in rats. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1985 (5) : 727-736.
23. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices, 5^e éd. Cincinnati: ACGIH; 1986: 372.
24. Lundberg P - Scientific basis for swedish occupational standards VI. Consensus report for méthanol. *Αρβετε Οχρα*. 1985 (32) : 115-727.
25. Conso F, Mignee C - Monoalcools autres que l'alcool éthylique. Paris. *Encyclopédie médico-chirurgicale; Intoxications*. 5-1984, 16047, A25 : 10 p.
26. Bismuth C et al. - Toxicologie clinique, 4^e éd. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 1987 : 623-624.
27. Méthanol. In: Biotox. Guide biotoxologique pour les médecins du travail. Paris: INRS; 2008 (<http://www.inrs.fr/biotox>).
28. Solvents mixtures. In: Kettrup A, Greim H (Eds). Analysis of Hazardous Substances in Air/DFG. Volume 6. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2002 : 234 p.
29. Methyl alcohol. Method 091. In: Sampling and analytical methods. OSHA (<http://www.osha-slc.gov/dts/sltc/methods>).
30. Forsberg K, Mansdorf SZ - Quick selection guide to chemical protective clothing. 5th ed. Hoboken: John Wiley and Sons; 2007 : 203 p.
31. Cuves et réservoirs. Recommandation CNAM R 435. Paris: INRS; 2008.

FICHE TOXICOLOGIQUE

FT 48

Éthanol

Fiche établie par les services techniques et médicaux de l'INRS
(N. Bonnard, M. Farcy, D. Jargot, E. Pasquier)

CARACTÉRISTIQUES

UTILISATIONS [1 à 4, 6]

- Solvant utilisé dans l'industrie des peintures, vernis, encres, matières plastiques, adhésifs, explosifs, parfums, cosmétiques, l'industrie pharmaceutique...
- Matière première pour la production de nombreux composés : acide acétique, acrylate d'éthyle, acétate d'éthyle, éthers de glycol, éthylamine, éthylène, éthers-oxydes notamment l'ETBE (éthyl-tert-butyl-éther)...
- Constituant de carburants : le « bioéthanol », éthanol obtenu à partir de matières premières végétales, peut être utilisé seul ou avec de l'essence ; les mélanges essence-éthanol renferment 5 à 95 % de bioéthanol selon les pays. En France, la réglementation fixe à 5,75 % le taux d'incorporation de bioéthanol dans l'essence en 2008 pour atteindre 10 % en 2010 ; toutefois la commercialisation d'un carburant renfermant 85 % de bioéthanol et 15 % d'essence sans plomb autorisée fin 2007, se généralise dans les stations service (E85).
- Désinfectant, biocide.
- Composant de boissons alcoolisées.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES [1 à 8]

L'éthanol est un liquide mobile, incolore, volatil, d'odeur plutôt agréable, décelable dès 84 ppm.

L'éthanol est miscible à l'eau, le mélange se faisant avec dégagement de chaleur et contraction du liquide : 1 vol. d'éthanol + 1 vol. d'eau donnent 1,92 vol. de mélange.

Par contre il y a expansion du liquide lorsque l'éthanol est mélangé à de l'essence.

L'éthanol est également miscible à la plupart des solvants usuels. C'est un bon solvant des graisses et il dissout de nombreuses matières plastiques.

Ses principales caractéristiques physiques sont les suivantes.

Masse molaire	46,07
Point de fusion	- 114 °C
Point d'ébullition	78-78,5 °C
Densité (D ₂₀ ²⁰)	0,789
Densité de vapeur (air = 1)	1,59
Indice d'évaporation (oxyde de diéthyle = 1)	8,3
Indice d'évaporation (acétate de n-butyle = 1)	2,4

CH₃-CH₂OH

C₂H₆O

Numéro CAS

64-17-5

Numéro CE

200-578-6

Numéro Index

603-002-00-5

Synonyme

Alcool éthylique

Depuis le 1^{er} décembre 2010, l'étiquette doit être conforme au règlement (CE) n° 1272/2008 dit « règlement CLP »



ÉTHANOL

DANGER

H 225 – Liquide et vapeurs très inflammables.
Les conseils de prudence P sont sélectionnés selon les critères de l'annexe 1 du règlement 1272/2008.

202-578-6

Selon le règlement CLP



F – Facilement inflammable

ÉTHANOL

R 11 – Facilement inflammable.
S 7 – Conserver le récipient bien fermé.
S 16 – Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer.

202-578-6 – Étiquetage CE.

Selon la directive 67/548/CEE.

Pression de vapeur	5,9 kPa à 20 °C 10 kPa à 30 °C 29,3 kPa à 50 °C
Point d'éclair (en coupelle fermée) éthanol éthanol à 95 % vol. éthanol à 70 % vol. éthanol à 10 % vol. éthanol à 5 % vol.	13 °C 17 °C 21 °C 49 °C 62 °C
Température d'auto-inflammation	423-425 °C; 363 °C (selon les sources)
Limites d'explosivité dans l'air (% en volume) limite inférieure limite supérieure	3,3 % 19 %
Coefficient de partage octanol/eau : log Pow	-0,31

À 20 °C et 101 kPa, 1 ppm = 1,91 mg/m³.

Le titre d'un mélange eau/éthanol est le rapport entre le volume d'alcool absolu contenu dans ce mélange et le volume de celui-ci à 15 °C ; il est exprimé en % en volume.

L'éthanol peut être commercialisé sous forme anhydre (éthanol à 100 % en volume appelé aussi **alcool absolu**) ou à différentes concentrations dans l'eau, principalement à 95 % et, pour des usages antiseptiques, à 70 %.

Pour les usages autres qu'alimentaires, des dénaturants sont ajoutés. L'éthanol dénaturé, que l'on trouve également dans le commerce sous le nom d'**alcool à brûler**, est de l'éthanol dans lequel on a dissous divers produits pour le rendre impropre à la consommation.

En France, l'alcool dénaturé selon le procédé général, doit contenir 3,5 % de méthylène-Régie (mélange complexe qui donne un goût et une odeur désagréables, obtenu par carbonisation du bois et contenant environ 65 % de méthanol, des cétones et des impuretés pyrogénées) et 1 % de 2-propanol. Des procédés spéciaux de dénaturation peuvent être autorisés pour des usages particuliers.

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES [2, 3, 4, 9]

Dans les conditions normales, l'éthanol est un produit stable. Il possède les propriétés générales des alcools primaires (réactions d'oxydation, déshydrogénation, déshydratation et estérification).

Il peut réagir vivement avec les oxydants puissants : acide nitrique, acide perchlorique, perchlorates, peroxydes, permanganates, trioxyde de chrome...

La réaction avec les métaux alcalins conduit à la formation d'éthylate et à un dégagement d'hydrogène ; elle peut être brutale sauf si elle est réalisée en l'absence d'air pour éviter la formation de mélanges explosifs air-hydrogène.

Le magnésium et l'aluminium peuvent également former des éthylates, la plupart des autres métaux usuels étant insensibles à l'éthanol.

Récipients de stockage

Le stockage de l'éthanol s'effectue généralement dans des containers en acier ou dans des récipients métalliques revêtus de résines phénoliques. Le verre est également utilisable pour les petites quantités.

L'aluminium et certaines matières plastiques sont à éviter.

VALEURS LIMITES D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE

Des VLEP indicatives dans l'air des locaux de travail ont été établies pour l'éthanol.

Pays	VLEP		Court terme (15 min maxi)	
	Moyenne pondérée sur 8 heures		ppm	mg/m³
France (circulaire 1982)	1000	1950	5000	9500
États-Unis (ACGIH)	1000	1880		
Allemagne (valeurs MAK)	500	960		

MÉTHODES DE DÉTECTION ET DE DÉTERMINATION DANS L'AIR

■ Prélèvement au travers d'un tube rempli de charbon actif (900/300 mg ou 700/300 mg). Désorption au dichlorométhane ou par un mélange dichlorométhane/sulfure de carbone/méthanol. Dosage par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme [10, 11, 12].

■ Prélèvement au travers de deux tubes connectés en série remplis d'Anasorb 747 (400 mg et 200 mg). Désorption par un mélange diméthylformamide/sulfure de carbone. Dosage par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme [13].

■ L'utilisation, possible en toute première approche, d'appareils à réponse instantanée équipés d'un tube réactif colorimétrique (par exemple GASTEC 112 ou 112 L, DRAEGER Alcool 25/a ou 100/a, MSA Ethanol-100) n'assure ni la sélectivité ni la précision nécessaires à une comparaison à une valeur limite d'exposition professionnelle.

INCENDIE – EXPLOSION [2, 9]

L'éthanol est un liquide très inflammable (point d'éclair en coupelle fermée = 13 °C) dont les vapeurs peuvent former des mélanges explosifs avec l'air dans les limites de 3,3 à 19 % en volume. Les solutions aqueuses d'éthanol sont également inflammables : le point d'éclair d'une solution à 70 % est de 21 °C, celui d'une solution à 10 % est de 49 °C.

Les oxydants puissants peuvent réagir vivement avec le produit.

Les agents d'extinction préconisés sont les mousses spéciales pour liquides polaires, le dioxyde de carbone, les poudres chimiques. En général, l'eau en jet direct n'est pas recommandée car elle peut favoriser la propagation de l'incendie. Elle pourra toutefois être utilisée pulvérisée ou sous forme de brouillard en grande quantité pour éteindre un feu important ou refroidir les fûts exposés ou ayant été exposés au feu.

Les intervenants, qualifiés, seront équipés d'appareils de protection respiratoire isolants autonomes et de combinaisons de protection.

PATHOLOGIE – TOXICOLOGIE

TOXICOCINÉTIQUE – MÉTABOLISME [6, 15, 16]

L'éthanol est rapidement absorbé par voie orale et respiratoire et peu par contact cutané. Il est distribué dans tous les tissus et fluides de l'organisme, notamment le cerveau et le foie, et est principalement éliminé par une métabolisation oxydative dans le foie produisant transitoirement de l'aldéhyde puis de l'acide acétique.

La toxicocinétique et le métabolisme ont été bien étudiés chez l'homme. L'éthanol est facilement absorbé par ingestion et par inhalation; on considère en général que l'absorption percutanée est très faible (environ 1 %). Après une ingestion unique, l'alcoolémie est maximale après 1 heure si l'alcool a été ingéré sans nourriture, après 2 heures autrement; la vitesse d'absorption varie aussi en fonction des individus, de la vitesse d'ingestion et de la concentration de la solution ingérée: elle est maximale pour les concentrations comprises entre 10 et 30 %. Chez des volontaires inhalant des concentrations de 5 800 à 10 000 ppm, le taux de rétention pulmonaire a été trouvé égal à 62 %, indépendamment de la concentration et de la vitesse de ventilation. Chez des volontaires exposés à 25, 100 et 1 000 ppm, l'absorption est de 70 à 80 %.

L'éthanol absorbé diffuse rapidement et presque uniformément dans tout l'organisme en raison de sa grande solubilité dans l'eau. La distribution est très rapide dans les organes fortement vascularisés comme le cerveau, les poumons, le foie; et la concentration est maximale dans le liquide céphalo-rachidien et l'urine où elle atteint 1,3 fois la concentration plasmatique, elle-même légèrement supérieure (1,1 fois) à la concentration moyenne dans les organes. L'éthanol traverse librement le placenta et des concentrations similaires sont retrouvées dans le sang maternel et fœtal. Signalons que chez le rat et le cobaye, l'éthanol s'accumule dans le liquide amniotique qui peut servir de réservoir.

La métabolisation de l'éthanol comporte essentiellement une oxydation complète en dioxyde de carbone et eau qui se déroule en 3 étapes. La première qui mène à l'aldéhyde acétique se fait en majeure partie (80-90 %) dans le foie sous l'action de l'alcool-déshydrogénase. Les systèmes du cytochrome P450 (inductible) et de la catalase-peroxydase interviennent également à ce stade. L'efficacité de ce dernier est limitée par la lenteur de formation du peroxyde d'hydrogène. La deuxième étape, menant à l'acide acétique, est sous la dépendance de l'aldéhyde-déshydrogénase présente dans le foie (90 %) et dans le rein (10 %). L'activité aldéhyde-déshydrogénase du foie étant supérieure à son activité alcool-déshydrogénase, il n'y a généralement pas, dans les conditions normales, d'accumulation d'aldéhyde acétique. Cependant, en raison du polymorphisme génétique de l'aldéhyde-déshydrogénase, certains groupes ethniques peuvent dégrader plus lentement l'aldéhyde acétique. Une accumulation peut également se produire en présence d'un inhibiteur spécifique de l'aldéhyde-déshydrogénase (disulfirame par exemple). L'acide acétique formé est libéré dans le sang et la troisième étape a lieu principalement dans les tissus périphériques où il est oxydé en dioxyde de carbone et eau.

Au total, la vitesse de métabolisation varie largement selon les individus; une valeur moyenne déterminée par

des essais sur volontaires se situe vers 100 mg/kg par heure. Des individus exposés régulièrement peuvent avoir une vitesse de métabolisation plus importante par induction enzymatique. La clairance plasmatique serait voisine de 220 mg/l par heure. Pour un sujet inhalant des vapeurs d'éthanol tout en accomplissant un travail de force (vitesse de ventilation = 30 l/min), l'équilibre vitesse d'absorption = vitesse de métabolisation assurant la stabilité de l'alcoolémie serait atteint pour une concentration de 3 500 ppm; après 6 heures d'exposition à 8 500 ppm, l'alcoolémie maximale retrouvée chez de tels sujets est de 470 mg/l.

En dehors de ce processus de détoxication oxydante, une faible partie de l'éthanol absorbé (2 à 5 %) est éliminée sous forme inchangée dans l'air expiré et dans l'urine. Il peut également être excrété dans le lait maternel à une concentration comparable à celle du sang maternel.

Mécanisme d'action [15, 16]

Les effets neuropsychiques aigus et subaigus de l'éthanol sont dus à l'action directe mais non spécifique de l'alcool sur le parenchyme cérébral: fixé dans les zones corticales, il inhibe le fonctionnement des transmissions synaptiques et déprime ainsi le système nerveux central avec une action principalement analgésique et anesthésique.

Le mécanisme des effets sur le métabolisme des lipides est plus complexe. L'accumulation des graisses dans le foie semble en effet résulter:

- d'une augmentation de la synthèse des triglycérides dans le foie lui-même;
- d'une augmentation de l'incorporation de glycérol dans la phosphatidylcholine avec déficit relatif de choline;
- d'une libération de catécholamines qui accélèrent la mobilisation des dépôts graisseux;
- d'une diminution de la vitesse d'oxydation des acides gras.

Surveillance biologique de l'exposition [14]

Le dosage de l'éthanol sanguin en cours ou immédiatement en fin de poste de travail est d'une utilisation limitée pour apprécier l'intensité de l'exposition en milieu professionnel.

Il n'existe pas de valeur guide pour ce paramètre.

TOXICITÉ EXPÉRIMENTALE

Toxicité aiguë [6, 15, 16]

La toxicité aiguë de l'éthanol est faible par inhalation et par ingestion, et négligeable par contact cutané. L'éthanol est irritant pour les yeux mais n'a pas d'effet irritant ou sensibilisant sur la peau.

Pour les diverses espèces étudiées (souris, rats, cobayes, lapins, chiens), les DL50 par voie orale sont comprises entre 5 et 20 g/kg, et les CL50 par inhalation sont voisines de 20 000 à 30 000 ppm pour des expositions de 4 à 6 heures. Par voie percutanée, aucun effet toxicologique n'est observé chez le lapin à 20 g/kg vraisemblablement en raison de la faible absorption percutanée.

Quelles que soient la voie d'administration et l'espèce considérées, les symptômes observés sont très semblables à ceux que l'on connaît chez l'homme. Ce sont essentiellement ceux d'une excitation puis d'une dépression du système nerveux central: ataxie, prostration, somnolence,

paralysie et dyspnée. La mort survient par défaillance respiratoire ou circulatoire après baisse progressive de la tension artérielle. Dans le cas de l'inhalation, on note en plus une irritation des muqueuses respiratoires.

L'examen anatomo-pathologique révèle des lésions hépatiques : œdème des cellules périphériques des lobules, accumulation de lipides et notamment de triglycérides.

Localement, l'éthanol n'a pas d'effet irritant appréciable sur la peau du lapin, sauf si l'on prolonge le contact 24 heures sous pansement occlusif. Une faible irritation passagère est alors observée.

Sur l'œil de lapin, le produit utilisé pur provoque une irritation oculaire modérée qui se manifeste par une légère opacification de la cornée et une rougeur de la conjonctive modérée à sévère. Ces effets sont réversibles en moins de 14 jours.

Aucune réaction n'a été observée dans un essai de maximisation sur cobaye à une concentration de 75 % et dans des essais de gonflement de l'oreille de souris à 95 %, et l'éthanol ne présente pas de propriété sensibilisante pour la peau.

Toxicité chronique [6, 15, 16]

L'éthanol possède une faible toxicité par exposition répétée par voie orale et respiratoire. Les effets se manifestent sur le foie et le système hématopoïétique à des doses élevées. Aucun effet systémique n'est observé par voie cutanée.

Chez le rat, l'administration pendant 12 semaines d'éthanol dans l'eau de boisson à la concentration de 15 % (environ 10 g/kg) provoque un ralentissement de la croissance pondérale et une stéatose hépatique. Cette même stéatose peut se retrouver par administration pendant 14 semaines d'un régime dans lequel l'éthanol représente 33 % de l'apport calorique (environ 12 g/kg). Une diminution du taux d'érythrocytes, de l'hématocrite, de la concentration en hémoglobine et du taux de lymphocytes est également observée à une dose de 8 g/kg/j pendant 10 mois. Chez le singe, recevant pendant 3 mois un régime riche en éthanol (40 % de l'apport calorique), la stéatose hépatique se double d'une stéatose du myocarde ; l'accumulation graisseuse porte à la fois sur les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol. Pour des expositions plus longues, les effets hépatiques évoluent vers la cirrhose. En ce qui concerne les effets neurologiques du produit, on note chez les animaux le développement d'une certaine tolérance : pour un taux d'alcoolémie donné, la coordination neuromusculaire est meilleure chez les animaux ingérant régulièrement de l'éthanol que chez les animaux le consommant pour la première fois. Il y a une tolérance croisée avec d'autres alcools (1- ou 2-propanol, 1- ou 2-butanol).

Chez les rats, cobayes, lapins, chiens et singes exposés par inhalation en continu à 46 ppm d'éthanol pendant 90 jours, comme chez les cobayes exposés 4 h/j, 6 j/sem, pendant 10 semaines à 3000 ppm, on n'observe aucune atteinte particulière clinique, biologique ou histologique. Chez le rat et la souris, une inflammation et une nécrose hépatiques interviennent après une exposition comprise entre 6384 et 10108 ppm pendant 9 jours. Dans des expérimentations plus anciennes réalisées à forte concentration, on a également signalé des atteintes hépatiques sévères (stéatoses, cirrhose, infiltrations péri-vasculaires hémorragiques). Les effets sur le comportement disparaissent chez le rat après 8 jours d'exposition, 4 h/j à 24000 ppm.

L'application quotidienne sur la peau du rat de 10 gouttes d'une solution d'éthanol à 50 % dans l'eau, pendant 187 jours, n'entraîne qu'une irritation temporaire.

Effets génotoxiques [6, 15, 16]

Les données suggèrent que l'éthanol provoque des lésions de l'ADN dans les cellules somatiques et germinales.

Sans activité sur *Salmonella typhimurium*, l'éthanol produit, sans activation métabolique, des mutations ponctuelles sur *Escherichia coli*, sur *Saccharomyces cerevisiae* et sur *Aspergillus nidulans*.

In vitro, il entraîne une augmentation de la fréquence des échanges de chromatides sœurs dans des cultures de cellules ovariennes de hamster ou de lymphocytes humains.

In vivo, une augmentation des échanges de chromatides sœurs est également retrouvée chez les rats et souris exposés par voie orale à des doses massives d'éthanol (> 7 g/kg/j) pendant plusieurs semaines. Il détermine également des mutations létales dominantes chez le rat et la souris mâle par voie orale dès 1240 mg/kg/j pendant 3 jours, et la formation de micronoyaux dans les érythrocytes de la moelle osseuse chez la souris à partir de 620 mg/kg par injection intrapéritonéale. Les essais d'aberrations chromosomiques sont négatifs.

Effets cancérogènes [17]

Selon l'évaluation du CIRC en 2007, il existe des preuves suffisantes de la cancérogénicité de l'éthanol chez l'animal.

De nombreuses études ont été menées en utilisant des doses massives d'éthanol dans l'eau de boisson. Ces études souvent anciennes et de qualité médiocre montrent des résultats divergents. Plus récemment, chez le rat, aucun effet cancérogène n'a été identifié à 676 et 2028 mg/kg/j alors que l'éthanol a provoqué l'augmentation de l'incidence des tumeurs mammaires, des carcinomes de la cavité orale, carcinomes du pré-estomac chez le mâle et la femelle, et d'autres sites chez le mâle à 6760 mg/kg/j. Enfin, une augmentation dose-dépendante de l'incidence des tumeurs hépatiques a été observée chez la souris.

Aucune étude adéquate n'a été réalisée par inhalation.

Effets sur la reproduction [6, 15, 16]

À forte dose, l'éthanol affecte les fonctions reproductrices mâles et femelles et induit une diminution de la viabilité, des malformations et des retards de croissance dans la descendance. Des effets comportementaux sont observés chez la descendance à plus faible dose.

De très nombreuses expérimentations ont été consacrées à l'étude des effets de l'éthanol sur la reproduction. Elles ont porté sur un grand nombre d'espèces (souris, rats, hamsters, cobayes, lapins, chats, chiens, porcs et singes) et ont utilisé différentes voies d'administration (orale, respiratoire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratesticulaire et intra-utérine).

Il ressort de façon concordante de toutes ces études que l'éthanol peut exercer des effets sur la fertilité des mâles (action sur la spermatogenèse) et des femelles (perturbation du cycle ovarien, mortalité post-implantation), sur le développement embryonnaire et fœtal et sur les nouveaux-nés : défauts de viabilité, retards de croissance, ano-

malies de développement, troubles du comportement (activité locomotrice, apprentissage...).

Ces effets sont généralement mis en évidence à fortes doses ; ainsi ces résultats s'observent :

- par voie orale, par administration d'éthanol à des doses quotidiennes de 4 g/kg ou plus ;
- par inhalation, par exposition quotidienne de 7 heures à 20 000 ppm.

Toutefois, une étude plus récente a montré une altération de la mémoire et de l'apprentissage chez des rats juvéniles exposés in utero et par le lait maternel de femelles exposées à 1 000 mg/kg/j.

TOXICITÉ SUR L'HOMME

Toxicité aiguë [5, 15, 16, 19, 20]

Les manifestations observées en cas d'intoxication aiguë par ingestion sont bien connues : elles sont essentiellement neuropsychiques (excitation intellectuelle et psychique, puis ivresse caractérisée avec incoordination motrice de type cérébelleux, puis coma plus ou moins profond avec menace du pronostic vital par paralysie des centres respiratoires) et ont pu être reliées de façon assez précise au taux d'alcoolémie. Des altérations neuropsychiques sont observables pour des concentrations d'éthanol dans le sang de 0,2 g/l : diminution du temps de réaction, de la coordination motrice et trouble du jugement. Il est peu probable qu'une telle concentration sanguine puisse provenir de la seule exposition professionnelle par inhalation [24].

Il convient toutefois de signaler que l'alcool industriel présente des dangers particuliers dus notamment aux additifs de dénaturation, et surtout à sa concentration, les produits à plus de 70 % d'éthanol risquant d'entraîner des lésions gastriques sérieuses.

En cas d'inhalation de vapeurs d'éthanol, les risques d'intoxication graves sont faibles car les effets anesthésiques se situent à un niveau de concentration où l'irritation provoquée est intolérable. Les essais réalisés sur volontaires ont permis de préciser les niveaux d'action suivants :

- 1 380 ppm : après 30 minutes d'exposition, céphalée suivie d'un léger engourdissement ;
- 3 340 ppm pendant 100 minutes : sensation de chaud et froid, irritation nasale, céphalée, engourdissement ;
- 5 000 ppm : irritation immédiate des yeux et des voies aériennes supérieures (toux) disparaissant en 5 à 10 minutes ; odeur presque intolérable initialement mais acclimatation rapide ; très vite, céphalée, tension intra-oculaire, sensation de chaleur ; après 1 heure, engourdissement marqué ;
- 9 000 ppm : en plus des symptômes ci-dessus, fatigue et somnolence après 30 minutes ;
- 20 000 ppm : larmoiement permanent, toux irrépressible, suffocation ; cette concentration n'est tolérable que pour de très courtes périodes.

Tous ces effets sont transitoires et disparaissent très vite après la fin de l'exposition. En cas d'expositions répétées – ou chez les sujets ingérant régulièrement de l'éthanol – un certain degré de tolérance apparaît : pour une même concentration atmosphérique, les symptômes sont moins sévères et le temps nécessaire pour les faire apparaître est plus long.

La projection de liquide pur dans l'œil provoque immédiatement une douleur cuisante, un larmoiement, des

lésions de l'épithélium cornéen et une hyperémie de la conjonctive ; la sensation de corps étranger peut durer 1 jour ou 2 mais, en général, la cicatrisation est spontanée, rapide et complète [18].

Toxicité chronique [5, 15, 19, 20]

Les effets chroniques de l'éthylisme par ingestion avec ses retentissements neuropsychiques (polynévrite, atrophie cérébelleuse, troubles de la mémoire), digestifs (stéatose et cirrhose hépatiques, gastrite chronique, pancréatite), cardio-vasculaires (mycardiopathie, hypertension artérielle) et hématologiques sont rappelés ici pour mémoire. En milieu industriel, cet éthylisme chronique doit retenir l'attention, d'une part, en raison des risques d'accidents liés aux troubles de vigilance et, d'autre part, en raison d'interactions possibles avec les effets toxiques d'autres produits chimiques (notamment synergie avec les effets hépatotoxiques des solvants chlorés, interaction avec les amides, oximes, thiurames et carbonates inhibiteurs d'aldéhyde-déshydrogénase) [21].

Dans le cas d'inhalations répétées de vapeurs d'éthanol, des irritations des yeux et des voies aériennes supérieures, des céphalées, de la fatigue, une diminution des capacités de concentration et de vigilance ont été rapportées. Mais, en dépit de rares observations anciennes non confirmées, il n'est pas établi que cette inhalation chronique puisse avoir – notamment au niveau du foie et du myocarde – des répercussions semblables à celles d'ingestions excessives répétées. Toutefois, une étude, portant sur 1 282 travailleurs de l'industrie du caoutchouc et des pneumatiques et comportant un suivi de 15 ans, a conclu à une association significative, chez les sujets de plus de 50 ans, entre exposition à l'éthanol et mortalité par cardiopathie ischémique [22] ; chez ces sujets, manipulant une vingtaine de solvants, on a également trouvé un effet de l'exposition au disulfure de carbone et au phénol. Il semble actuellement qu'une consommation excessive d'alcool soit un facteur favorisant de l'athérosclérose et de ses conséquences, alors qu'une consommation faible aurait un pouvoir protecteur [23].

Localement la répétition d'un contact cutané peut entraîner un érythème et un œdème particulièrement s'il existe une occlusion gênant l'évaporation du produit.

Effets cancérogènes [17]

Le CIRC a classé en 2007 « l'éthanol dans les boissons alcoolisées » dans le groupe 1 des agents cancérogènes pour l'homme.

De nombreuses études prospectives, rétrospectives ou de corrélation indiquent que l'ingestion prolongée d'éthanol (boissons alcoolisées) accroît la fréquence de certains cancers. Ces études concernent la population générale, les sujets alcooliques et dans certains cas les employés de brasseries (production de boissons alcoolisées). Il n'existe pas de données épidémiologiques évaluant le rôle possible de l'inhalation de vapeurs d'éthanol dans la survenue de cancers.

Dans une évaluation récemment mise à jour, le CIRC a analysé ces données concernant l'association possible entre alcool et 27 types de cancers. Lorsque des effets significatifs sont notés, ils surviennent généralement pour une consommation quotidienne de 50 grammes d'alcool pur. On retrouve cette augmentation de risques pour :

- les tumeurs du tractus digestif supérieur (bouche, pharynx, larynx, œsophage), les effets sont nettement majorés par le tabagisme ;
- les tumeurs hépatiques, souvent en liaison avec des atteintes préalables du foie liées à l'alcool (cirrhose) ;
- les tumeurs du sein qui peuvent être légèrement augmentées à partir de doses de 18 grammes par jour (RR 1,13 sur une méta analyse portant sur 58 000 femmes) ;
- les tumeurs colorectales qui ont un risque relatif de 1,4 selon une méta analyse.

Pour d'autres sites, les résultats sont inconstants (on note même parfois une diminution de risque chez le buveur) : reins, lymphomes non-hodgkiniens, poumons et estomac.

Effets sur la reproduction [19, 25, 26]

D'importantes anomalies sont observées dans le domaine de la reproduction chez des nouveau-nés de femmes ayant absorbé de l'éthanol au cours de leur grossesse par ingestion. On ne dispose d'aucune donnée clinique correspondant à des inhalations de vapeurs. Contrairement à l'ingestion, l'inhalation ne conduit pas d'augmentation significative de la concentration d'éthanol dans le sang. Certains effets constatés surviennent pour des doses faibles et il convient d'y prêter attention en cas d'exposition importante possible.

L'ingestion d'éthanol affecte la fertilité masculine (atrophie testiculaire, réduction de la libido, diminution de la testostérone). Chez la femme alcoolique, on note une perturbation des cycles menstruels. Par ailleurs une diminution de l'incidence de conception par cycle a été notée pour des consommations d'alcool même faibles (5 verres par semaine).

La consommation d'alcool provoque des anomalies congénitales multiples (retard de croissance, perturbation du système nerveux central, malformations externes) ; la fréquence de ces anomalies dépend de la dose quotidienne d'alcool absorbée. Une augmentation du nombre d'avortements ainsi que des retards intellectuels (baisse du QI) et comportementaux sont également rapportés chez des enfants dont les mères ont consommé des doses de 10 à 20 g d'alcool quotidiennement. L'effet peut être augmenté si l'enfant est exposé au cours de l'allaitement.

RÈGLEMENTATION

Rappel : La réglementation citée est celle en vigueur à la date d'édition de cette fiche : 1^{er} trimestre 2011.

Les textes cités se rapportent essentiellement à la prévention du risque en milieu professionnel et sont issus du Code du travail et du Code de la sécurité sociale. Les rubriques « Protection de la population » et « Protection de l'environnement » ne sont que très partiellement renseignées.

Il existe également une réglementation économique et fiscale de l'éthanol qui n'est pas traitée dans le cadre de cette fiche (voir avec le ministère chargé des Finances, Direction générale des impôts).

HYGIÈNE ET SÉCURITÉ DU TRAVAIL

1. Mesures de prévention des risques chimiques (agents chimiques dangereux)

- Articles R. 4412-1 à R. 4412-58 du Code du travail.
- Circulaire DRT n° 12 du 24 mai 2006 (non parue au JO)

2. Aération et assainissement des locaux

- Articles R. 4222-1 à R. 4222-26 du Code du travail.
- Circulaire du ministère du Travail du 9 mai 1985 (non parue au JO).
- Arrêtés des 8 et 9 octobre 1987 (JO du 22 octobre 1987) et du 24 décembre 1993 (JO du 29 décembre 1993) relatifs aux contrôles des installations.

3. Prévention des incendies et des explosions

- Articles R. 4227-1 à R. 4227-41 du Code du travail.
- Articles R. 4227-42 à R. 4227-54 du Code du travail.
- Décret 96-1010 modifié du 19 novembre 1996 (JO du 24 novembre 1996) relatif aux appareils destinés à être utilisés en atmosphère explosible.

4. Valeurs limites d'exposition professionnelle

- Circulaire du ministère du Travail du 19 juillet 1982 (non parue au JO).

5. Maladies de caractère professionnel

- Articles L. 461-6 et D. 461-1 et annexe du Code de la sécurité sociale : déclaration médicale de ces affections.

6. Maladies professionnelles

- Article L. 461-4 du Code de la sécurité sociale : déclaration obligatoire d'emploi à la Caisse primaire d'assurance maladie et à l'inspection du travail ; tableau n° 84.

7. Classification et étiquetage

L'étiquette doit être conforme au règlement CLP à compter du 1^{er} décembre 2010 pour les substances et du 1^{er} juin 2015 pour les mélanges.

a) éthanol pur

Le règlement CLP (règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 (JOUE L 353 du 31 décembre 2008)) introduit dans l'Union européenne le nouveau système général harmonisé de classification et d'étiquetage ou SGH. La classification et l'étiquetage de l'éthanol, harmonisés selon les deux systèmes (règlement et directive 67/548/CEE), figurent dans l'annexe VI du règlement CLP. La classification est :

- selon le règlement (CE) n° 790/2009 du 10 août 2009 modifiant le règlement (CE) n° 1272/2008
Liquides inflammables, catégorie 2 ; H 225.

- selon la directive 67/548/CEE
Facilement inflammable ; R 11.

Se reporter aux étiquettes au début de la fiche toxicologique.

b) mélanges (préparations) contenant de l'éthanol

- Arrêté du 9 novembre 2004 modifié (JO du 18 novembre 2004) transposant la directive 1999/45/CE

ou

- Règlement (CE) n° 1272/2008.

8. Entreprises extérieures

- Arrêté du 19 mars 1993 (JO du 27 mars 1993) fixant en application de l'article R. 237-8 du Code du travail la

liste des travaux dangereux pour lesquels il est établi par écrit un plan de prévention.

INTERDICTION/LIMITATION DE MISE SUR LE MARCHÉ ET D'EMPLOI

Produits biocides

Ils sont soumis à la réglementation biocides (articles L. 522-1 et suivants du Code de l'environnement). A terme, la totalité des produits biocides seront soumis à des autorisations de mise sur le marché.

L'éthanol est une substance active identifiée à l'annexe I et notifiée à l'annexe II du règlement (CE) n° 1451/2007 différents types de produits biocides.

A la date de publication de cette fiche, l'éthanol peut être présent dans les types de produits suivants : TP 1 (Produits biocides destinés à l'hygiène humaine), TP 2 (Désinfectants utilisés dans le domaine privé et dans le domaine de la santé publique et autres produits biocides) ; TP 4 (Désinfectants pour les surfaces en contact avec les denrées alimentaires) ;

L'éthanol ne peut plus être utilisé dans les TP 3 (produits biocides destinés à l'hygiène vétérinaire depuis le 01/03/2010 (décision de la Commission européenne n° 2009/322/UE) et l'utilisation de TP 3 renfermant de l'éthanol est interdite en France depuis le 01/09/2010 (arrêté du 9 septembre 2009).

Pour plus d'information, consulter le ministère chargé de l'environnement.

PROTECTION DE LA POPULATION

- Article L. 5132-2, articles R. 5132-43 à R. 5132-73, articles R. 1342-1 à R. 1342-12 du Code de la santé publique :
 - étiquetage (cf. 7).

PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Installations classées pour la protection de l'environnement, Paris, imprimerie des Journaux officiels, brochure n° 1001 :

- N°s 1430 à 1434 : liquides inflammables.

TRANSPORT

Se reporter éventuellement aux règlements suivants.

1. Transport terrestre national et international (route, chemin de fer, voie de navigation intérieure)

- ADR, RID, ADN : éthanol et solutions aqueuses
N° ONU : 1170
Classe : 3
Groupe d'emballage : II ou III

2. Transport par air

- IATA

3. Transport par mer

- IMDG

RECOMMANDATIONS

I. AU POINT DE VUE TECHNIQUE

Stockage

■ Stocker l'éthanol à l'air libre ou dans des locaux frais, bien ventilés, à l'abri de toute source d'ignition ou de chaleur (flammes, étincelles, rayons solaires...) et à l'écart des produits oxydants. Le sol de ces locaux sera incombustible, imperméable et formera cuvette de rétention afin qu'en cas d'écoulement accidentel, le liquide ne puisse se répandre au dehors.

■ Mettre le matériel électrique en conformité avec la réglementation en vigueur.

■ Interdire de fumer.

■ Prendre toutes dispositions pour éviter l'accumulation d'électricité statique.

■ Conserver à l'abri de l'air dans des récipients soigneusement fermés et correctement étiquetés.

■ Reproduire l'étiquetage en cas de fractionnement des emballages.

Manipulation

Les prescriptions relatives aux locaux de stockage sont applicables aux ateliers où est manipulé l'éthanol. En outre :

■ Instruire le personnel des risques présentés par la substance, des précautions à observer et des mesures à prendre en cas d'accident.

■ Entreposer dans les locaux de travail des quantités ne dépassant pas celles nécessaires au travail d'une journée.

■ Ne pas fumer, boire ou manger sur les lieux de travail.

■ Éviter l'inhalation de vapeurs ou d'aérosols. Effectuer en appareil clos toute opération industrielle qui s'y prête. Prévoir une aspiration des vapeurs à leur source d'émission ainsi qu'une ventilation générale des locaux. Prévoir également des appareils de protection respiratoire pour certaines opérations exceptionnelles de courte durée ; leur choix dépend des conditions de travail ; si un appareil filtrant peut être utilisé, il doit être muni d'un filtre de type A. Pour des interventions d'urgence, le port d'un appareil respiratoire isolant autonome est nécessaire.

■ Contrôler régulièrement la teneur de l'atmosphère en éthanol.

■ Éviter le contact du produit avec la peau et les yeux. Mettre à la disposition du personnel des vêtements de protection, des gants (par exemple en caoutchouc butyle, en néoprène® ; caoutchouc naturel, polychlorure de vinyle et polyalcool vinylique sont déconseillés [27]) et des lunettes de sécurité. Ces effets seront maintenus en bon état et nettoyés après usage.

■ Ne pas procéder à des travaux sur ou dans des cuves et réservoirs contenant ou ayant contenu de l'éthanol sans prendre les précautions d'usage [28].

■ Éviter les rejets d'éthanol dans l'environnement.

■ En cas de fuite ou de déversement accidentel, récupérer le produit en l'épongeant avec un matériau absorbant inerte puis laver à grande eau la surface ayant été souillée.

Si le déversement est important, évacuer le personnel en ne faisant intervenir que des opérateurs entraînés munis d'un équipement de protection approprié.

■ Conserver les déchets imprégnés de solvant dans des récipients spécialement prévus à cet effet. L'éthanol peut être régénéré ou détruit par incinération. Dans tous les cas, traiter les déchets dans les conditions autorisées par la réglementation (traitement dans l'entreprise ou dans un centre spécialisé).

II. AU POINT DE VUE MÉDICAL

■ À l'embauchage, rechercher plus particulièrement des signes d'atteinte neurologique (centrale ou périphérique), cutanée ou oculaire ou respiratoire chronique. Éviter d'exposer des sujets présentant une atteinte fonctionnelle hépatique sérieuse.

■ Lors des visites ultérieures, pratiquer un examen cli-

nique afin de mettre en évidence une éventuelle atteinte neurologique ainsi que des signes d'irritation oculaire, cutanée et respiratoire.

■ En cas de projection cutanée, laver immédiatement à grande eau. Retirer les éléments souillés. Si des signes locaux ou généraux apparaissent, consulter un médecin.

■ En cas de projection oculaire, laver immédiatement à l'eau pendant 15 minutes. Si des signes apparaissent, consulter un spécialiste.

■ En cas d'inhalation de fortes concentrations, retirer le sujet de la zone contaminée. S'il est inconscient, le mettre en position latérale de sécurité. Dans tous les cas, le garder au repos et avertir un médecin.

■ En cas d'ingestion, si le sujet est parfaitement conscient, tenter de le faire vomir, lui administrer du charbon médical actif et avertir un médecin. Une hospitalisation pourra être décidée pour une surveillance et un traitement symptomatique.

BIBLIOGRAPHIE

- Budavari S (ed.) – The Merck Index. 13^e éd. An encyclopaedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station, NJ : Merck and Co., Inc. ; 2001 ; 261 p.
- Kirk-othmer – Encyclopedia of chemical technology. 5^e éd, vol. 10. New-York : John Wiley – Interscience Publication. Ethanol ; 2001 : 527-558.
- Ethanol. In : Base de données HSDB, 2006. (toxnet.nlm.nih.gov)
- Ethanol. In Cheminfo Chemical Profiles. CCOHS ; 2006. (www.ccohs.ca)
- Ethanol. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. ACGIH ; 2001.
- Ethanol. OECD SIDS initial assessment report. 2004. UNEP publication. (www.inchem.org/documents/sids/sids/64175.pdf)
- IUCLID dataset – 1-Butanol. European Commission. European Chemicals Bureau ; 2000. (ecb.jrc.it)
- Fire protection guide to hazardous materials. 13^e éd. NFPA (National Fire Protection Agency).
- Bretherick's handbook of reactive chemicals hazards. 6^e éd. Oxford : Butterworth-Heinemann ; 1999.
- Alcool éthylique. Fiche 017. In : MétroPol. Métrologie des polluants. INRS, 2004 (www.inrs.fr/metro-pol/).
- BIA 7330 – Ethanol. BIA-Arbeitsmappe, Messung von Gefahrstoffen, Erich Schmidt Verlag ; 1997.
- Norme NF X43-267. Air des lieux de travail. Prélèvement et analyse de gaz et vapeurs organiques. Prélèvement par pompage sur tube à adsorption et désorption aux solvants. Paris : AFNOR ; juillet 2004.
- Ethyl Alcohol - Method 100. In : Sampling and Analytical Methods. OSHA ; 1993 (www.osha.gov/dts/sltc/methods/index.html).
- Ethanol. In : BIOTOX. Guide biotoxologique pour les médecins du travail. Inventaire des dosages biologiques disponibles pour la surveillance des sujets exposés à des produits chimiques. INRS, 2010 (www.inrs.fr/biotox).
- Clayton GD, Clayton FE – Patty's industrial hygiene and toxicology. 5^e éd, vol. 6. New York : John Wiley and sons ; 2001 : 382-394.
- Wimer WW, Russel JA, Kaplan HL – Alcohols toxicology. Park Ridge : Noyes Data corp. ; 1983 : 27-45.
- Alcohol drinking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 44. Lyon : International Agency for Research on Cancer ; 1988. Révision en cours de publication : Consumption of alcoholic beverages. In : IARC monographs. Vol. 96, 2010. (www.iarc.fr)
- Grant MW – Toxicology of the eye. 3^e éd. Springfield : Charles C. Thomas ; 1986 : 53-59.
- Girre C et al. – Toxicité de l'éthanol. Encyclopédie médico-chirurgicale, Toxicologie-Pathologie professionnelle, 16047-A-20. Paris ; 1995 ; 8 p.
- Bismuth C et al. – Toxicologie clinique, 5^e éd. Paris : Flammarion Médecine-Sciences ; 2000 : 836-840.
- Hills BW, Venable HL – The interaction of ethyl alcohol and industrial chemicals. *Am J of Ind Med*, 1982 ; 3 : 321-333.
- Wilcosky TC, Tyroler HA – Mortality from heart diseases among workers exposed to solvents. *J Occup Med*, 1983 ; 25 : 879-885.
- Biyyik I, Ergene O – Alcohol and acute myocardial infarction. *J Int Med Res*, 2007 ; 35 (1) : 46-51.
- Pastino GM et al. – A comparison of physiologically based pharmacokinetic model predictions and experimental data from inhaled ethanol in male and female B6C3F1 mice, F344 rats, and humans. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997 ; 145 : 145-57.
- Ethanol, evaluation of the effects on reproduction, recommendation for classification. Committee for Compounds toxic to reproduction, a committee of the Health Council of the Netherlands. The Hague ; 19 april 2000.
- Evaluation des risques de l'éthanol. ANSES, 2010. L'éthanol en population professionnelle. Evaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle ; avis et rapport d'expertise collective ; AFSSET, juin 2010 (www.anses.fr).
- Forsberg K, Mansdorf SZ – Quick selection guide to chemical protective clothing. 4^e éd. New York : John Wiley and sons ; 2002.
- Cuves et réservoirs – Recommandations CNAMTS R 435 ; 2008.



Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles
30, rue Olivier-Noyer 75680 Paris cedex 14 • Tél. 01 40 44 30 00 • Fax 01 40 44 30 99 • Internet : www.inrs.fr • e-mail : info@inrs.fr

Annexe 19 : Tableau résumant les types de denrées alimentaires ainsi que les doses maximales d'emploi pour les glycosides de stéviol [46].

L'annexe II du règlement (CE) n° 1333/2008 est modifiée comme suit:

1) Dans la partie B2, l'inscription suivante relative à l'additif E 960 est insérée après l'inscription relative à l'additif E 959:

«E 960	Glycosides de stéviol»
--------	------------------------

2) Dans la partie E, les inscriptions suivantes relatives à l'additif E 960 sont insérées par ordre numérique dans les catégories de denrées alimentaires visées:

PARTIE E: ADDITIFS ALIMENTAIRES AUTORISÉS DANS LES DIFFÉRENTES CATÉGORIES DE DENRÉES ALIMENTAIRES ET CONDITIONS D'UTILISATION

Numéro de catégorie	Numéro E	Dénomination	Quantité maximale (en mg/l ou mg/kg selon le cas)	Notes	Restrictions/exceptions
01.4	Produits laitiers fermentés aromatisés, y compris traités thermiquement				
	E 960	Glycosides de stéviol	100	(60)	Uniquement produits à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
03	Glaces de consommation				
	E 960	Glycosides de stéviol	200	(60)	Uniquement produits à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
04.2.2	Fruits et légumes conservés dans le vinaigre, l'huile ou la saumure				
	E 960	Glycosides de stéviol	100	(60)	Uniquement conserves aigres-douces de fruits et de légumes
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
04.2.4.1	Préparations de fruits et de légumes, à l'exclusion des compotes				
	E 960	Glycosides de stéviol	200	(60)	Uniquement produits à valeur énergétique réduite
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
04.2.5.1	Confitures extra et gelées extra au sens de la directive 2001/113/CE				
	E 960	Glycosides de stéviol	200	(60)	Uniquement confitures, gelées et marmelades à valeur énergétique réduite
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
04.2.5.2	Confitures, gelées, marmelades et crème de marrons sucrée au sens de la directive 2001/113/CE				
	E 960	Glycosides de stéviol	200	(60)	Uniquement confitures, gelées et marmelades à valeur énergétique réduite
		(60): exprimés en équivalents stéviols			

2011

FR

Journal officiel de l'Union européenne

L 295/207

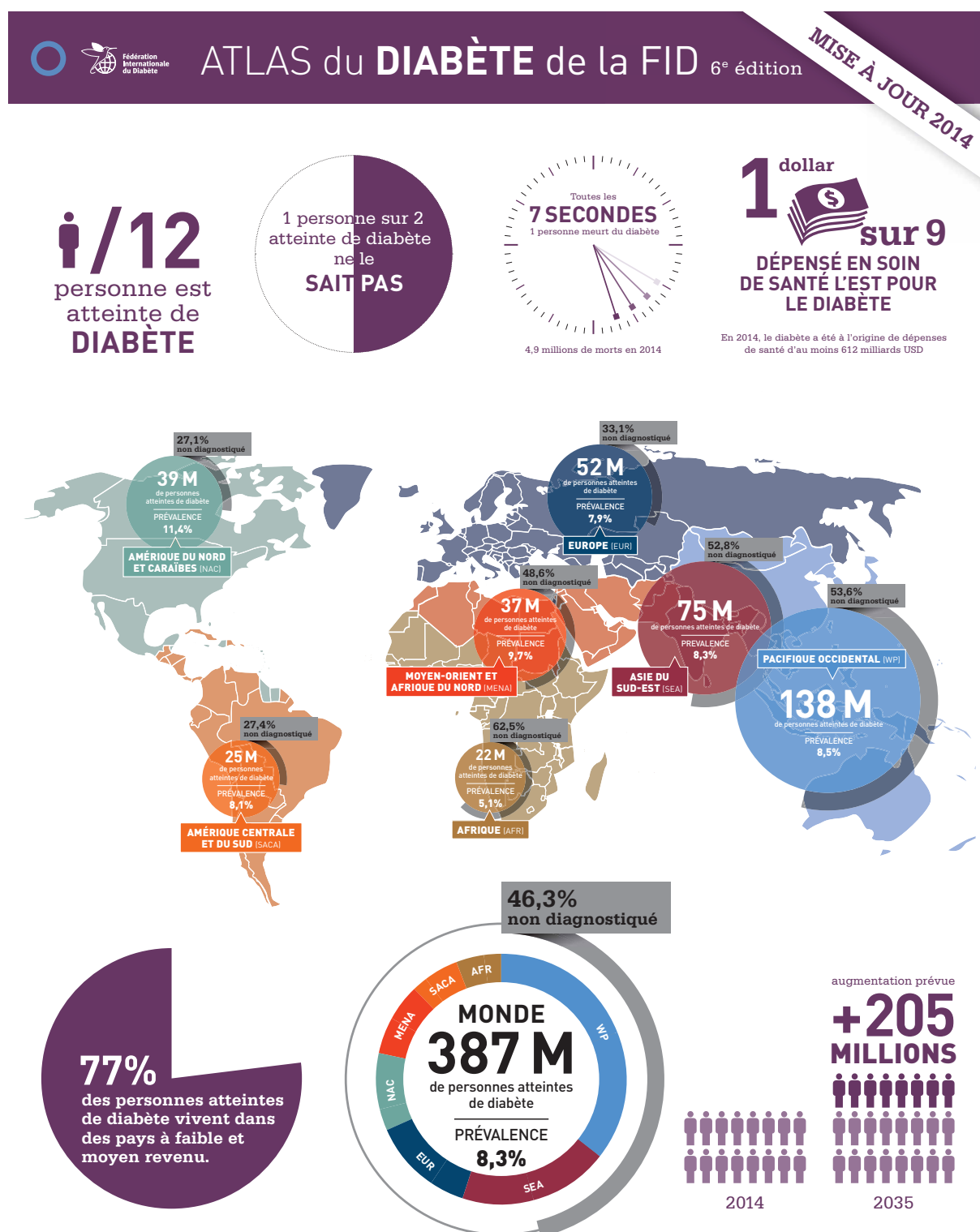
Numéro de catégorie	Numéro E	Dénomination	Quantité maximale (en mg/l ou mg/kg selon le cas)	Notes	Restrictions/exceptions
04.2.5.3	Autres pâtes à tartiner similaires à base de fruits ou de légumes				
	E 960	Glycosides de stéviol	200	(60)	Uniquement pâtes à tartiner à base de fruits secs, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
05.1	Produits de cacao et de chocolat visés par la directive 2000/36/CE				
	E 960	Glycosides de stéviol	270	(60)	Uniquement produits à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
05.2	Autres confiseries, y compris les microconfiseries pour rafraîchir l'haleine				
	E 960	Glycosides de stéviol	270	(60)	Uniquement produits à base de cacao ou de fruits secs, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
	E 960	Glycosides de stéviol	330	(60)	Uniquement pâtes à tartiner à base de cacao, de lait, de fruits secs ou de graisses, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
	E 960	Glycosides de stéviol	350	(60)	Uniquement confiseries sans sucres ajoutés
	E 960	Glycosides de stéviol	2 000	(60)	Uniquement microconfiseries pour rafraîchir l'haleine, sans sucres ajoutés
	E 960	Glycosides de stéviol	670	(60)	Uniquement pastilles rafraîchissantes pour la gorge fortement aromatisées sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
05.3	Chewing-gum				
	E 960	Glycosides de stéviol	3 300	(60)	Uniquement produits sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
05.4	Décorations, enrobages et fourrages, à l'exclusion des fourrages à base de fruits relevant de la catégorie 4.2.4				
	E 960	Glycosides de stéviol	330	(60)	Uniquement confiseries sans sucres ajoutés
	E 960	Glycosides de stéviol	270	(60)	Uniquement produits à base de cacao ou de fruits secs, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			

Numéro de catégorie	Numéro E	Dénomination	Quantité maximale (en mg/l ou mg/kg selon le cas)	Notes	Restrictions/exceptions
06.3	Céréales pour petit-déjeuner				
	E 960	Glycosides de stéviol	330	(60)	Uniquement céréales pour petit-déjeuner à teneur en fibres de plus de 15 %, et contenant au moins 20 % de son, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
07.2	Produits de boulangerie fine				
	E 960	Glycosides de stéviol	330	(60)	Uniquement essoblaten – enrobage de papier comestible
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
09.2.	Poisson et produits de la pêche transformés, y compris mollusques et crustacés				
	E 960	Glycosides de stéviol	200	(60)	Uniquement conserves et semi-conserves aigres-douces de poissons et marinades de poissons, crustacés et mollusques
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
11.4.1	Édulcorants de table sous forme liquide				
	E 960	Glycosides de stéviol	QS	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
11.4.2	Édulcorants de table sous forme de poudre				
	E 960	Glycosides de stéviol	QS	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
11.4.3	Édulcorants de table sous forme de comprimés				
	E 960	Glycosides de stéviol	QS	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
12.5	Soupes, potages et bouillons				
	E 960	Glycosides de stéviol	40	(60)	Uniquement les soupes et potages à valeur énergétique réduite
		(60): exprimés en équivalents stéviols			

Numéro de catégorie	Numéro E	Dénomination	Quantité maximale (en mg/l ou mg/kg selon le cas)	Notes	Restrictions/exceptions
12.6	Sauces				
	E 960	Glycosides de stéviol	120	(60)	À l'exclusion de la sauce de soja (fermentée ou non fermentée)
	E 960	Glycosides de stéviol	175	(60)	Uniquement la sauce de soja (fermentée ou non fermentée)
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
13.2	Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales au sens de la directive 1999/21/CE (à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 13.1.5)				
	E 960	Glycosides de stéviol	330	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
	13.3	Aliments diététiques de régime contre la prise de poids destinés à remplacer un repas ou l'apport alimentaire d'une journée (en tout ou en partie)			
E 960		Glycosides de stéviol	270	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
14.1.3		Nectars de fruits au sens de la directive 2001/112/CE du Conseil, nectars de légumes et produits similaires			
	E 960	Glycosides de stéviol	100	(60)	Uniquement produits à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
	14.1.4	Boissons aromatisées			
E 960		Glycosides de stéviol	80	(60)	Uniquement produits à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
14.2.1		Bière et boissons maltées			
	E 960	Glycosides de stéviol	70	(60)	Uniquement bière sans alcool ou ayant une teneur en alcool ne dépassant pas 1,2 % vol.; bière de table/Tafelbier/table beer (contenant moins de 6 % de moût primitif) sauf Obergäriges Einfachbier; bières ayant une acidité minimale de 30 milli-équivalents exprimée en NaOH; bières brunes du type oud bruin
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
	14.2.8	Autres boissons alcoolisées, y compris les spiritueux ayant un titre alcoométrique inférieur à 15 % vol et les mélanges de boissons alcoolisées et de boissons non alcoolisées			
E 960		Glycosides de stéviol	150	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			

Numéro de catégorie	Numéro E	Dénomination	Quantité maximale (en mg/l ou mg/kg selon le cas)	Notes	Restrictions/exceptions
15.1	Amuse-gueule à base de pommes de terre, de céréales, de farine, d'amidon ou de fécule				
	E 960	Glycosides de stéviol	20	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
15.2	Fruits à coque transformés				
	E 960	Glycosides de stéviol	20	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
16.	Desserts, à l'exclusion des produits relevant des catégories 1, 3 et 4				
	E 960	Glycosides de stéviol	100	(60)	Uniquement produits à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
17.1	Compléments alimentaires sous forme solide, y compris sous forme de gélules ou de comprimés et sous d'autres formes similaires				
	E 960	Glycosides de stéviol	670	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
17.2	Compléments alimentaires sous forme liquide				
	E 960	Glycosides de stéviol	200	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			
17.3	Compléments alimentaires sous forme de sirop ou sous une forme à mâcher				
	E 960	Glycosides de stéviol	1 800	(60)	
		(60): exprimés en équivalents stéviols			

Annexe 20 : Statistiques concernant la pathologie du diabète, sous différentes formes graphiques [180].



BIBLIOGRAPHIE

- [1] APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2009;**161**.
- [2] REYMOND M, JAUZEIN F. Classification phylogénétique de la lignée verte. 2007.
http://tela-botanica.org/sites/botanique/fr/documents/biblio/articles_en_ligne
(Consulté le 10/11/2014)
- [3] Tropicos. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/2716375>
(Consulté le 10/11/2014)
- [4] STEVEN PF. Angiosperm Phylogeny Website.
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
(Consulté le 10/11/2014)
- [5] <https://sajf.ujf-grenoble.fr/botanique/ressources-pedagogiques/fiches-familles/asteraceae-compositae-composees?language=fr>
(Consulté le 13/11/2014)
- [6] <http://www.topsante.com/var/topsante/storage/images/medecine/allergies/rhinite-allergique/prevenir/ambrosie-c-est-le-moment-de-l-arracher-pour-eviter-les-allergies-36937/284285-1-fre-FR/Ambrosie-c-est-le-moment-de-l-arracher-pour-eviter-les-allergies.jpg>
(Consulté le 10/11/2014)
- [7] <http://www.biogelules.com/images/plante-chardon-Marie-en-gelules.jpg>
(Consulté le 10/11/2014)
- [8] http://www.lesbulbesafleurs.com/db/products/135159648977400_edelweiss_leontopodium_alpinum.jpg
(Consulté le 10/11/2014)
- [9] <http://www.mahoneysgarden.com/sites/default/files/plant/2011/02/dah12909-94458na.jpg>
(Consulté le 10/11/2014)
- [10] http://www.bolster.fr/upload_tmp/Calendula-officinalis---Souci-des-jardins--32.jpg
(Consulté le 10/11/2014)
- [11] <http://faune-flore.lu/wp-content/gallery/tiphaine-maurice/arnica-montana.jpg>
(Consulté le 10/11/2014)

- [12] http://fr.cdn.v5.futura-sciences.com/builds/images/thumbs/7/7ab766dcc1_tournesol_phovoir.jpg
(Consulté le 10/11/2014)
- [13] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c8/Lactuca_sativa-whole_plant_top.JPG
(Consulté le 10/11/2014)
- [14] <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Compositae/Stevia/>
(Consulté le 14/10/2014)
- [15] LEMUS-MONDACA R, VEGA-GALVEZ A, ZURA-BRAVO L, AH-HEN K. *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.
- [16] GIUFFRÉ L, ROMANIUK R, CIARLO E. Stevia, ka'a he'e, wild sweet herb from south America - An overview. *Emir. J. Food Agric*. 2013;**25**:746-750.
- [17] ABOUDRARE A. Une nouvelle plante sucrée au Maroc *Stevia rebaudiana* Exigences, techniques culturales et potentialités. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA*. 2009;**174**:1-6.
- [18] SIRSHENDU D, SOURAY M, SUVRAJIT B. Stevioside : Technology, Applications and Health. *John Wiley & Sons, Ltd*. 2013;First edition:1-18.
- [19] NEPOVIM A, DRAHOSOVA H, VALICEK P, et al. The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants cultivated in the Czech Republic. *Pharm. pharmacol. lett*. 1998;**8**:19-21.
- [20] YADAV A.K, SINGH S, DHYANI D, AHUJA PS. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci*. 2011;**91**:1-27.
- [21] TANAKA O. Steviol-glycosides : new natural sweeteners. *Trends in Analytical Chemistry*. 1982;**1**:246-248.
- [22] SOEJARTO DD. Botany of Stevia and *Stevia rebaudiana* Dans : KINGHORN AD. Stevia : The genus Stevia. *London, Taylor & Francis*. 2002;18-39.

- [23] PANDE SS, PRIYANKA G. Plant tissue culture of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) : A review. *Jour. of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 2013;**5**:26-33.
- [24] GOETTEMÖLLER J, CHING A. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. In: J. Janick (ed.), *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, 1999;510-511.
- [25] SIC ZABLUR J, VOCA S, DOBRICEVIC N, JEZEK D, BOSILJKOV D, BRNCIC M. *Stevia rebaudiana* Bertoni - A review of nutritional and biochemical properties of natural sweetener. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2013;**78**:25-30.
- [26] CEUNEN S, GEUNS JMC. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science*. 2013;**198**:72-82.
- [27] Le Stevia. *l'Officinal*. 2010;**85**:44-46.
- [28] BRANDLE JE, ROSA N. Heritability for yield, leaf : stem ratio and stevioside content estimated from landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci*. 1992;**72**:1263-1266.
- [29] Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF). *Stevia rebaudiana* et produits fabriqués à base de stévia. *Le portail de l'Économie et des Finances*. 2014. <http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Securite/Produits-alimentaires/Stevia-rebaudiana-produits-base-de-stevia>. (Consulté le 09/12/2014).
- [30] DEBNATH M. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2008;**2**:45-51.
- [31] GVASALIYA VP, KOVALENKO NV, GARGULIYA MC. Studies on the possibility of growing honey grass in Abkhazia conditions. *Subtropicheskie Kul Tury*. 1990;**5**:149-156.
- [32] MAITI RK, PUROHIT SS. Stevia, a miracle plant for human health, *Agrobios*, 2008;p.71.
- [33] PATIL V, REDDY PS, ASHWINI KS, PURUSHOTHAM MG, PRASAD TG, UDAYAKUMAR M. *in Vitro* multiplication of *Stevia rebaudiana*. *Curr Sci*. 1996;**70**:960.
- [34] AKITA M, SHIGEOKA T, KOIZUMI Y, KAWAMURA M. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. *Plant cell Rep*. 1994;**13**:180-183.

- [35] BONDAREV N, RESHETNYAK O, NOSOV A. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. *Plant science*. 2003;**165**:845-850.
- [36] JANARTHANAM B, GOPALAKRISHNAN M, LAKSHMI SAI G, SEKAR T. Plant regeneration from leaf derived callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Cult. & Biotech*. 2009;**19**:133-141.
- [37] KHALIL SA, ZAMIR S, AHMAD S. Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2014;**21**,566-573.
- [38] CEUNEN S, GEUNS JMC. Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Phytochemistry*. 2013;**89**:32-38.
- [39] ODDONE B. How to grow *Stevia*. *Guarani Botanicals Inc*. 1999;1-30.
- [40] COLOMBUS M. La culture du stévia, l'édulcorant naturel. *Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario*. 1997;p.4.
- [41] PERICHE A, CASTELLO ML, HEREDIA A, ESCRICHE I. Influence of drying method on steviol glycosides and antioxydants in *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*. 2015;**172**:1-6.
- [42] TODD J. La culture du stévia, l'édulcorant naturel. *Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales*. 1997.
http://www.omafra.gov.on.ca/CropOp/fr/indus_misc/pharm/stev.html.
 (Consulté le 02/12/2014)
- [43] WOOD HB, ALLERTON R, DIEHL HW, FLETCHER HG. Stevioside. I. The structure of glucose moieties. *J. Org. Chem*. 1955;**20**:875-883.
- [44] DE S, MONDAL S, BANERJEE S. Stevioside : Technology, Applications and Health. *John Wiley & Sons*, 2013;**1**:1-18.
- [45] BRIAND P. Opinion of the French Food Safety Agency on a draft order concerning the use of the steviol as an additive in food for human consumption. *Afssa - Request no. 2008-SA-0321 related requests no. 2006-SA-0231 and no. 2008-SA-0108*. 2008;1-2.

- [46] 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 stéviol. *Journal officiel de l'Union européenne*. L 295/205. 12 Novembre 2014.
- [47] EDEOGA H, OKWU D, MBAEBIE B. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 2005;**4**:685-688.
- [48] JAYARAMAN S, MANOHARAN M, ILLANCHEZIAN S. *In-vitro* antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2008;**7**:1143-1149.
- [49] YADAV SK, GULERIA P. Steviol glycosides from Stevia : biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012;**52**:988-998.
- [50] GEUNS J. Stevioside. *Phytochemistry*. 2003;**64**:913-921.
- [51] PRAKASH I, DUBOIS GE, CLOS JF, WILKENS KL, FOSDICK LE. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;**46**:S75-S82.
- [52] MILAGRE HMS, MARTINS LR, TAKAHASHI JA. Novel agents for enzymatic and fungal hydrolysis of stevioside. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009;**40**:367-372.
- [53] JECFA. STEVIOL GLYCOSIDES - Chemical and Technical Assessment Revised by Paul M. Kuznesof, Ph.D. for the 68th JECFA. 2007;1-8.
- [54] BRANDLE JE, TELMER PG. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*. 2007;**68**:1855-1863.
- [55] PRAKASH I, MARKOSYAN M, BUNDERS C. Development of next generation stevia sweetener : Rebaudioside M. *Foods*. 2014;**3**:162-175.
- [56] CHATURVEDULA VSP, PRAKASH I. A new diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Molecules*. 2011;**16**:2937-2943.
- [57] CHATURVEDULA VSP, MUBARAK C, PRAKASH I. IR spectral analysis of diterpene glycosides isolated from *Stevia rebaudiana*. *Food and Nutrition Sciences*. 2012;**3**:1467-1471.

- [58] CHATURVEDULA VSP, CLOS JF, PRAKASH I. Stability study of steviol glycosides in mock beverages using fluorescent light exposure under ICH guidelines. *Int. J. of Pharm. Pharm. Sci.* 2011;**3**:316-323.
- [59] GULERIA P, YADAV SK. *Agrobacterium* Mediated Transient Gene Silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: Insights into Steviol Glycoside Biosynthesis Pathway. *Plos One*. 2013;**8**:e74731.
- [60] GULERIA P, YADAV SK. Insights into steviol glycoside biosynthesis pathway enzymes through structural homology modeling. *Am. J. Biochem. Mol. Biol.* 2013;**3**:1-19.
- [61] TOTTE N, CHARON L, ROHMER M, COMPERNOLLE F, BABOEUF I, GEUNS JMC. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Lett.* 2000;**41**:6407-6410.
- [62] SHIBATA H, SONOKE S, OCHIAI H, NISHIHASHI H, YAMADA M. Glucosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiol.* 1991;**95**:152-156.
- [63] SHIBATA H, SAWA Y, OKA T, SONOKE S, KIM KK, YOSHIOKA M. Steviol and steviol-glycoside - glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni - purification and partial characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995;**321**:390-396.
- [64] LAMARTI A, BADO A, DEFFIEUX G, CARDE JP. Biogenèse des monoterpènes. *Bull Soc. Pharm.* 1994;**133**:79-99.
- [65] WANG X. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glucosyltransferases. *FEBS Letters.* 2009;**583**:3303-3309.
- [66] MORI K, NAKAHARA Y, MATSUI M. Total synthesis of (±)-steviol. *Tetrahedron Letters.* 1970;**28**:2411-2414.
- [67] STEPHANOPOULOS G, AJIKUMAR PK. 2012. Microbial production of natural sweeteners, diterpenoid steviol glycosides. Patent Application Publication. Pub. No.: US 2012/0164678 A1.

- [68] YANG Y, HUANG S, HAN Y, YUAN H, GU C, WANG Z. Environmental cues induce changes of steviol glucosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. *Plant physiology and biochemistry*. 2015;**86**:174-180.
- [69] KUMAR H, KAUL K, BAJPAI-GUPTA S, KAUL VK, KUMAR S. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*. 2012;**492**:276-284.
- [70] BRAZ DE OLIVEIRA AJ, CORREIA GONCALVES RA, CANTUARIA CHIERRITO TP, MÜLLER DOS SANTOS M, MERA DE SOUZA L, GORIN PAJ et al. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Food Chemistry*, 2011;**129**:305-311.
- [71] AFSSA. Saisine 2004-SA-0052. Apport en protéine : consommation, qualité, besoins et recommandation. 2007.
- [72] ABOU-ARAB AE, ABOU-ARAB AA, ABU-SALEM MF. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *Afr. J. Food Sci*. 2010;**4**:269-281.
- [73] LATHAM MC. Les bases de la nutrition. In *La nutrition dans les pays en voie de développement*. 2002;**29**:99-131.
- [74] KIMI IS, YANG M, LEE OH, KANG SN. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology*. 2011;**44**:1328-1332.
- [75] DARISE M, KOHDA H, MIZUTANI K, KASAI R, TANAKA O. Chemical constituents of flowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agri. Biol. Chem*. 1983;**47**:133-135.
- [76] SEKARAN T, GIRIDHAR P, RAVISHANKAR GA. Production of steviosides *in ex vitro* and *in vitro* grown *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Sci. Food Agric*. 2007;**87**:420-424.
- [77] BONDAREV N, SUKHAMOVA MA, RESHETNYAK OV, NOSOV AM. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics through ontogeny. *Biol. Plant*. 2003;**47**:261-264.

- [78] MONTORO P, MOLFETA I, MALDINI M, CECCARINI L, PIACENTE S, PIZZA C et al. Determination of six steviol glycosides of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from different geographical origin by LC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*. 2013;**141**:745-753.
- [79] CEUNEN S, WERBROUCK S, GEUNS JMC. Stimulation of steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* by red LED light. *Journal of Plant Physiology*. 2012;**169**:749-752.
- [80] COOK LF, KNOX JR. A synthesis of steviol. *Tetrahedron Letters*. 1970;**47**:4091-4093.
- [81] OGAWA T, NOZAKI M, MATSUI M. Total synthesis of stevioside. *Tetrahedron*. 1980;**36**:2641-2648.
- [82] YANG LM, HSU FL, CHANG SF, CHENG JT, HSU JY, HSU CY et al. Microbial metabolism of steviol and steviol-16 α ,17-epoxyde. *Phytochemistry*. 2007;**68**:562-570.
- [83] YILDIZ-OZTURK E, TAG O, YESIL-CELIK TAS O. Subcritical water extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. *J. of Supercritical Fluids*. 2014;**95**:422-430.
- [84] JENTZER JB, ALIGNAN M, VACA-GARCIA C, RIGAL L, VILAREM G. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry*. 2015;**166**:561-567.
- [85] GASMALLA MAA, YANG R, MUSA A, HUA X, YE F. Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia* (*Stevia rebaudiana* bertoni) leaves. *Arabian Journal of Chemistry*. 2014.
- [86] PURI M, SHARMA D, BARROW CJ, TIWARY AK. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*. 2012;**132**:1113-1120.
- [87] PASQUEL A, MARQUES MOM, MEIRELES MAA. *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves pre-treatment with pressurized CO₂: an evaluation of the extract composition. In *Proceedings of the 6th Meeting on Supercritical Fluids*, Chemistry and Materials, ISASF, Nottingham. 1999.

- [88] Règlement (UE) n°231/2012 de la commission du 9 mars 2012 établissant les spécifications des additifs alimentaires énumérés aux annexes II et III du règlement (CE) n°1333/2008 du Parlement européen et du Conseil. *Journal Officiel de l'Union Européenne*. L83/1, 22.03.2012.
- [89] JECFA. Steviol glycosides (addendum). In: *69th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, WHO Food Additive Series*. 2009;**60**:183-219.
- [90] KROYER GT. The Low Calories Sweetener Stevioside: Stability and Interaction with Food Ingredients. *LWT - Food and Science Technology*. 1999;**32**:509-512.
- [91] USFDA. *GRAS Notice Inventory*. 2012a;GRN: 252, 253, 275, 287, 303, 304, 328, 323, 329, 349, 354, 365, 367, 369, 380, 388, 395, 418.
- [92] RAI C, MAJUMDAR GC, DE S. Optimization of process parameters for water extraction of stevioside using Response Surface Methodology. *Separation Science and Technology*. 2012;**47**:1014-1022.
- [93] TEO CC, TAN SN, YONG JWH, HEW CS, ONG ES. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Separation Science*. 2009;**2**:612-622.
- [94] ERKUCUK A, AKGUN IH, YESIL-CELIK TAS O. Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves : identification and optimization. *J. Supercritical Fluids*. 2009;**51**:29-35.
- [95] AFANDI A, SARIJAN S, SHAHA RK. Optimisation of rebaudioside A extraction from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and quantification by high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science*. 2013;**1**:62-70.
- [96] BONDAREV N, RESHETNYAK O, NOSOV A. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science*. 2001;**161**:155-163.

- [97] JAROSLAV PL, ELENA V, OSTR PL, KARSEK MR, KAROLNKA B, PAVLA K et al. Comparison of two different solvents employed for pressurized fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Anal. Bioanalytical Chem.* 2007;**388**:1847-1857.
- [98] MIDMORE DJ, RANK AH. A new rural industry Stevia to replace imported chemical sweeteners. *Rural Industries Research and Development Corporation.* 2002.
- [99] JAITAK V, SINGH BB, KAUL VK. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytochemical Analysis.* 2009;**20**:240-245.
- [100] PASQUEL A, MEIRELES MAA, MARQUES MOM, PETENATE AJ. Extraction of stevia glycosides with CO₂ + water, CO₂ + ethanol, and CO₂ + water + ethanol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* 2000;**17**:271-282.
- [101] PURKAYASTHA S, PUGH G, LYNCH B, ROBERTS A, KWOK D, TARKA SM. *in vitro* metabolism of rebaudioside B, D and M under anaerobic conditions: Comparison with rebaudioside A. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2014;**68**:259-268
- [102] POMARET M, LAVIEILLE R. Le principe à saveur sucrée du Kaà-hè-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Quelques propriétés physiologiques du Stévioside. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1931;**13**:1248-1252.
- [103] GEUNS JMC, AUGUSTIJNS P, MOLS R, BUYSE JG, DRIESSEN B. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of Stevioside, Rebaudioside A and Steviol. *Food Chem. Toxicol.* 2003;**41**:1599-1607.
- [104] GEUNS JMC, MALHEIROS RD, MORAES VMB, DECUYPERE EMP, COMPERNOLLE F, BUYSE JG. Metabolism of stevioside by chickens. *J. Agric. Food Chem.* 2003b;**51**:1095-1101.
- [105] CHATSUDTHIPONG V, MUANPRASAT C. Stevioside and related compounds : Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics.* 2009;**121**:41-54.
- [106] SIGMA-ALDRICH. 01432 - rebaudioside A.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/01432?lang=fr®ion=FR>
 (Consulté le 03/04/2015)

- [107] ROBERTS A, RENWICK AG. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;**46**:S31-S39.
- [108] NAKAYAMA K, KASAHARA D, YAMAMOTO F. Absorption distribution metabolism and excretion of stevioside in rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 1986;**27**:1-8.
- [109] GARDANA C, SIMONETTI P, CANZI E, ZANCHI R, PIETTA P. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J. Agric. Food Chem*. 2003;**51**:6618-6622.
- [110] KOYAMA E, SAKAI N, OHORI Y, KITAZAWA K, IZAWA O, KAKEGAWA K et al. Absorption and metabolism of the glycosidic sweeteners, Stevia related compounds in human and rat. *Food Chem. Toxicol*. 2003b;**41**:875-883.
- [111] WHEELER A, BOILEAU AC, WINCKLER PC, COMPTON JC, PRAKASH I, JIANG X. et al. Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral dose in healthy men. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;**46**:S54-S60.
- [112] CARDOSO VN, BARBOSA MF, MURAMOTO E, MESQUITA CH, ALMEIDA MA. Pharmacokinetic studies of ¹³¹I-stevioside and its metabolites. *Nucl. Med. Biol*. 1996;**23**:97-100.
- [113] CARAKOSTAS MC, CURRY LL, BOILEAU AC, BRUSICK DJ. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem. Toxicol*. 2008;**46**:S1-S10.
- [114] NIKIFOROV AI, RIHNER MO, EAPEN AK, THOMAS JA. Metabolism and toxicity studies supporting the safety of rebaudioside D. *Int. J. Toxicol*. 2013;**32**:261-273.
- [115] HUTAPEA AM, TOSKULKAO C, BUDDHASUKH D, WILAIRAT P, GLINSUKONI T. Digestion of Stevioside, a Natural Sweetener, by Various Digestive Enzymes. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 1997;**23**:177-186.
- [116] HUTAPEA AM, TOSKULKAO C, WILAIRAT P, BUDDHASUKH D. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of stevioside and its metabolites. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol*. 1999;**22**:1161-1170.

- [117] EFSA. Scientific opinion of the panel on food additives and nutrient sources (ANS) on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA J.* 2010;**8**:1537.
- [118] JECFA. Compendium of food additive specifications. Monographs 5. Steviol glycosides. 2008.
- [119] TOSKULKAO C, CHATURAT L, TEMCHAROEN P, 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.
- [120] CURRY L, ROBERTS A. Subchronic toxicity of rebaudioside A. *Food and Chemical Toxicology.* 2008;**46**:S11-S20.
- [121] NIKIFOROV AI, EAPEN AK. A 90-day oral (dietary) toxicity study of rebaudioside A in Sprague-Dawley rats. *Int. J. Toxicol.* 2008;**27**:65-80.
- [122] BRUSICK DJ. A critical review of genetic toxicity of steviol and steviol glycoside. *Food Chem. Toxicol.* 2008;**46**:S83-S91.
- [123] URBAN JD, CARAKOSTAS MC, BRUSICK DJ. Steviol glycoside safety: Is the genotoxicity database sufficient?. *Food Chem. Toxicol.* 2013;**51**:386-390.
- [124] MATSUI M, MATSUI K, KAWASAKI Y, ODA Y, NOGUCHI T, KITAGAWA Y et al. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six *in vitro* and one *in vivo* mutagenicity assays. *Mutagenesis* 1996a;**11**:573-579.
- [125] PEZZUTO JM, NANAYAKKARA NPD, COMPADRE CM, SWANSON SM, KINGHORN AD, GUENTHNER TM et al. Characterization of bacterial mutagenicity mediated by 13-hydroxy-ent-kaurenoic acid (steviol) and several structurally-related derivatives and evaluation of potential to induce glutathione S-transferase in mice. *Mutat. Res.* 1986;**169**:93-103.
- [126] TERA I T, REN H, MORI G, YAMAGUCHI Y, HAYASHI T. Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in *Salmonella typhimurium* TM677. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2002;**50**:1007-1010.

- [127] SUTTAJIT M, VINITKETKAUMNUEN U, MEEVATEE U, BUDDHASUKH D. Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 1993;**101**:53-56.
- [128] MATSUI M, MATSUI K, NOHMI T, MIZUSAWA H, ISHIDATE Jr. M. Detection of deletion mutations in pSV2-gpt plasmids induced by metabolically-activated steviol. In: *Selected Abstracts of the 17th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan. Mutat. Res.* 1989;**216**:353-385.
- [129] USFDA. Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. IV.C.1. Short-term Tests for Genetic Toxicity. Office of Food Additive Safety. Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2000.
- [130] NUNES APM, FERREIRA-MACHADO SC, NUNES RM, DANTAS FJS, DE MATTOS JCP, CALDEIRA-DE-ARAUJO A. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 2007;**45**:662-666.
- [131] ANZFSA. Steviol glycosides as intense sweeteners. Final assessment report. 2008;6:Application A540.
- [132] AFSSA. 2008. Saisine n°2008-SA-0108. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une autorisation provisoire, pour une durée de deux ans, d'emploi de stéviol, extrait 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 AFSSA du 12 octobre 2007.
- [133] YAMADA A, OHGAKI S, NODA T, SHIMIZU M. Chronic toxicity of dietary stevia extracts. *J. Food. Hyg. Soc. Jpn.* 1985;**26**:169-183.
- [134] XILI L, CHENGJIANY B, ERYI X, REIMING S, YUENGMING W, HAODONG S et al. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 1992;**30**:957-965.
- [135] TOYODA K, MATSUI H, SHODA T, UNEYAMA C, TAKADA K, TAKAHASHI M. Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology.* 1997;**35**:597-603.

- [136] YASUKAWA K, KITANAKA S, SEO S. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.* 2002;**25**:1488-1490.
- [137] PLANAS G.M., KUC J. Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science*. 1968;**162**:1007.
- [138] SHIOTSU S. Fertility study of Stevia decoction in rats. *Tech. J. Food. Chem. Chemicals* 1996;**4**:108-113.
- [139] MELIS MS. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. *J. Ethnopharmacol.* 1999;**167**:157-161.
- [140] URBAN JD, CARAKOSTAS MC, TAYLOR SL. Steviol glycoside safety : Are highly purified steviol glycoside sweeteners food allergens? *Food and Chemical Toxicology*. 2015;**75**:71-78.
- [141] KIMATA H. Anaphylaxis by stevioside in infants with atopic eczema. *Allergy* 2007;**62**:565-566.
- [142] ANTUNES J, BORREGO L, ROMEIRA A, PINTO P. Skin prick tests and allergy diagnosis. *Allergol. Immunopathol.* 2009;**37**:155-164.
- [143] ESMAIL S, KABADI UM. Edema, enigma: 11 B-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 inhibition by sweetener “Stevia”. *Open J. Endocr. Metab. Dis.* 2012;**2**:49-52.
- [144] SEHAR I, KAUL A, BANI S, PAL HC, SAXENA AK. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem. Biol. Interact.* 2008;**173**:115-121.
- [145] KINGSTON RL, PRAWER S, VAN DE LIGT J. Best practice post-market surveillance for a stevia based sweetener. In: *Geuns, J.M.C. (Ed.), Proceedings of the 7th Stevia Symposium. Euprint, Belgium.* 2013;189-200.
- [146] CARAKOSTAS MC, PRAKASH I, KINGHORN AD, WU CD, SOEJARTO DD. Steviol glycosides. In: *O'Brien Nabors, L. (Ed.), Alternative Sweeteners. CRC Press. Florida.* 2012;159-180.
- [147] Services techniques et médicaux de l'INRS. Fiche technique méthanol - FT 5. *INRS*. 2009.

- [148] BONNARD N, FALCY M, JARGOT D, PASQUIER E. Fiche technique éthanol - FT 48. *INRS*. 2011.
- [149] OMS. Global status report on noncommunicable diseases 2010. 2011.
- [150] HOLVOET P, RULL A, GARCIA-HEREDIA A, LOPEZ-SANROMA S, GEERAERT B, JOVEN J et al. *Stevia*-derived compounds attenuate the toxic effects of ectopic lipid accumulation in the liver of obese mice: A transcriptomic and metabolomic study. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;**77**:22-33.
- [151] BARRIOCANAL LA, PALACIOS M, BENITEZ G, BENITEZ S, JIMENEZ JT, JIMENEZ N et al. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2008;**51**:37-41.
- [152] SHIVANA N, NAIKA M, KHANUM F, KAUL VK. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2013;**27**:103-113.
- [153] SARAVANAN R, RAMACHANDRAN V. Modulating efficacy of Rebaudioside A, a diterpenoid on antioxidant and circulatory lipids in experimental diabetic rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013;**36**:472-483.
- [154] JEPPENSEN P, GREGERSEN S, ROLFSEN SED, JEPSEN M, COLOMBO M, AGGER A et al. Antihyperglycemic and blood pressurereducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2003;**52**:372-378.
- [155] GUPTA E, PURWAR S, SUNDARAM S, RAI GK. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013;**7**:3343-3353.
- [156] DAS SARMA A, MALLICK AR, GHOSH AK. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 2010;**1**:185-192.
- [157] KIM IS, YANG M, LEE OH, KANG SN. The antioxydant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology*. 2011;**44**:1328-1332.

- [158] MUANDA FN, SOULIMANI R, DIOP B, DICKO A. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology*. 2011;**44**:1865-1872.
- [159] CARBONELL-CAPELLA JM, BUNIEWSKA M, ESTEVE MJ, FRIGOLA A. Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. *Food Chemistry*. 2015;**184**:122-130.
- [160] REBOUISSOU S, AMESSOU M, COUCHY G, POUSSIN K, IMBEAUD S, PILATI C et al. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*. 2009;**457**:200-204.
- [161] MIZUSHINA Y, AKIHISA T, UKIYA M, HAMASAKI Y, MURAKAMI-NAKAI C, KURIYAMA I et al. Structural analysis of isosteviol and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. *Life Sci*. 2005;**77**:2127-2140.
- [162] BELDA-GALBIS CM, PINA-PEREZ MC, ESPINOSA J, MARCO-CELDRAN A, MARTINEZ A, RODRIGO D. Use of the modified Gompertz equation to assess the *Stevia rebaudiana* Bertoni antilisterial kinetics. *Food microbiology*. 2014;**38**:56-61.
- [163] ALFAJARO MM, RHO MC, KIM HJ, PARK JG, KIM DS, HOSMILLO M et al. Anti-rotavirus effects by combination therapy of stevioside and *Sophora flavescens* extract. *Research in Veterinary Science*. 2014;**96**:567-575.
- [164] OH HM, LEE SW, PARK MH, KIM MH, RYU YB, KIM MS et al. Norkurarinol inhibits TLR3-mediated pro-inflammatory signaling pathway and rotavirus replication. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2011;**118**:161-170.
- [165] Règlement (CE) n°1333/2008 sur les additifs alimentaires. *Journal Officiel de l'Union Européenne*. L354/16, 31.12.2008.
- [166] Directive 89/107/CEE. Relative au rapprochement des législations des États membres concernant les additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine. *Journal Officiel des Communautés Européennes*. L40, 11.02.89, 27-33.
- [167] GALLEN C, PLA J. Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. *Revue française d'allergologie*. 2013;**53**:S9-S18.

- [168] Noms de catégorie et système international de numérotation des additifs alimentaires CAC/GL 36-1989. *Codex alimentarius*. 2008;1-65.
- [169] Directive 94/35/CE. Concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires. *Journal Officiel des Communautés Européennes*. L237, 10.09.94, 1-18.
- [170] ANSES. Définition et présentation des travaux de l'ANSES.
<https://www.anses.fr/fr/content/les-édulcorants-intenses>.
(Consulté le 16/06/2015)
- [171] AFSSA. Saisine n°2011-SA-0012. Avis de l'Agence Nationale de Sécurité sanitaire des aliments sur un nouveau projet d'arrêté relatif à l'emploi du rébaudioside A extrait de *Stevia rebaudiana* comme additif alimentaire. 2009.
- [172] Seppic. Règlementation du Stevia en Europe. 2011. http://www.seppic.com/legislation-europe-france-steviol-glycosides-efsa-@/view-1423-searticle.html;jsessionid=p17h0L-8-y1-2jWpboJ5jA__?lang=fr
(Consulté le 13/04/2015)
- [173] Règlement (CE) n°1223/2009 du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. *Journal Officiel de l'Union Européenne*. L342/59, 22.12.09.
- [174] Règlement (CE) n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*. L43/1, 14.02.97.
- [175] OMS. Aide mémoire n°311 : Obésité et surpoids. 2015.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/>
(Consulté le 05/08/2015)
- [176] World obesity. World map of obesity. 2014.
<http://www.worldobesity.org/aboutobesity/world-map-obesity/?map=children>
(Consulté le 05/08/2015)
- [177] World obesity. World map of obesity. 2014.
<http://www.worldobesity.org/aboutobesity/world-map-obesity/?map=adults>
(Consulté le 05/08/2015)
- [178] OMS. Statistiques sanitaires mondiales 2014. 2014.

- [179] OMS. Aide mémoire n°312 : Diabète. 2015.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/>
 (Consulté le 05/08/2015)
- [180] Fédération Internationale du Diabète. 2014. Atlas du diabète de la FID - sixième édition - Key finding 2014. <http://www.idf.org/diabetesatlas/update-2014>
 (Consulté le 05/08/2015)
- [181] OMS. Aide mémoire n°236 : Le coût du diabète.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs236/fr/>
 (Consulté le 06/08/2015)
- [182] Sénat. Quelles issues entre les espérances de la nutrition et la quasi certitude annoncée d'un désastre sanitaire? <http://www.senat.fr/rap/r03-267/r03-26717.html>
 (Consulté le 06/08/2015)
- [183] Haute Autorité de Santé HAS. Surpoids et obésité de l'adulte: prise en charge médicale et premier recours. 2011.
- [184] EMERY C, DINET J, LAFUMA A, SERMET C, KHOSHNOOD B, FAGNANI F. Évaluation du coût associé à l'obésité en France. *La Presse Médicale*. 2007;**6**:832-840.
- [185] SCHNEIDER H, VENETZ W. Cost of Obesity in Switzerland 2012. Etude menée sous mandat de l'OFSP. 2014.
- [186] DOBBS R, SAWERS C, THOMPSON F, MANYIKA J, WOETZEL J, CHILD P et al. Overcoming obesity: An initial economic analysis. *McKinsey Global Institute report*. 2014.
- [187] Haute Autorité de Santé. Extrait de l'argumentaire scientifique de la RBP : "Stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2" - Chapitre : Epidémiologie et coût du diabète de type 2 en France. 2013.
- [188] REDURON V. Médicaments remboursables délivrés en officine : principales évolutions en 2009. *Points de Repère*. 2010;**34**.
- [189] MOREL A, LECOQ G, JOURDAIN-MENNINGER D. (Inspection générale des affaires sociales). Rapport n°RM2012-033P - Evaluation de la prise en charge du diabète. 2012;Tome 1 et 2.

[190] MOREL A, KIOUR A, GARCIA A. (Inspection générale des affaires sociales). Rapport n°RM2010-154P - Evolution et maîtrise de la dépense des dispositifs médicaux. 2010;tome 1.

[191] Haute Autorité de Santé. L'autosurveillance glycémique dans le diabète de type 2 : une utilisation très ciblée. 2011.

[192] Haute Autorité de Santé. Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé - Prévention et dépistage du diabète de type 2 et des maladies liées au diabète. 2014.

[193] Assemblée Nationale. N°3775 - Projet de loi de finances pour 2012 - Article 46: Instauration d'une contribution sur les boissons contenant des sucres ajoutés. 2011;114-115.

[194] Le Parisien. Etats-Unis: hausse alarmante du nombre de diabétiques de 11,5% en deux ans. 2014. <http://www.leparisien.fr/flash-actualite-sante/etats-unis-hausse-alarmante-du-nombre-de-diabetiques-de-11-5-en-deux-ans-10-06-2014-3911915.php>
(Consulté le 06/08/2015)

[195] <http://www.edulcorants.eu/edulcorants/>
(Consulté le 07/08/2015)

[196] Règlement (UE) n°497/2014 de la commission du 14 mars 2014 modifiant l'annexe II du règlement (CE) n°1333/2008 du Parlement européen et du Conseil et l'annexe du règlement (UE) n°231/2012 de la Commission en ce qui concerne l'utilisation de l'advantame comme édulcorant. *Journal Officiel de l'Union Européenne*. L143/6, 15.05.2014.

[197] AESA. Avis scientifique sur l'aspartame. 2014.
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetaspartame-fr.pdf
(Consulté le 10/08/2015)

[198] BAGINSKI C. 2011. State of the stevia market. Newhope360.
<http://newhope360.com/supply-news-amp-analysis/state-stevia-market?page=1>
(Consulté le 20/07/2015)

[199] Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000473. Purified Steviol Glycosides with Rebaudioside X (also Known as Rebaudioside M) as the Principal Component.
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm382202>

(Consulté le 10/12/2014)

[200] Stevia Corp. <http://www.stevia.co/opportunity/market-size>

(Consulté le 07/06/2015)

[201] Zenith International. 2014. A review of the market performance and latest developments. *2014 global stevia market*.

[202] Engredea news and analysis. Global stevia market up to 14% in 2014. 2014.

<http://newhope360.com/sweeteners/global-stevia-market-14-2014>

(Consulté le 21/07/2015)

[203] Bureau d'innocuité des produits chimiques, Direction des aliments, Direction générale des produits de santé et des aliments. 2012. Avis de Modification à la Liste des édulcorants autorisés visant à permettre le recours aux glycosides de stéviol à titre d'édulcorants de table et d'édulcorants dans certaines catégories d'aliments - n°NOM/ADM-0002. *Santé Canada*.

[204] GRAS expert panel. GRAS assessment of glucosylated steviol glycosides STEVITEN RICH. 2012. <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm337462.pdf>

(Consulté le 10/12/2014)

[205] BASCH D. 2014 Stevia hits the sweet spot.

<http://www.robecosam.com/en/sustainability-insights/library/foresight/2014/stevia-hits-the-sweet-spot.jsp>

(Consulté le 02/05/2015)

[206] GELSKI J. Stevia use grows globally amid regulatory, formulation issues. *Food Business News*. 2013. <http://www.foodbusinessnews.net/Standard-Items/Search-Results.aspx?searchStr=stevia>

(Consulté le 02/05/2015)

[207] LOUBENS A. A quand des champs de stévia en France? *Techniques de L'ingénieur*. 2014. http://www.techniques-ingenieur.fr/actualite/biotech-chimie-thematique_6343/a-quand-des-champs-de-stevia-en-france-article_285658/

(Consulté le 20/07/2015)

- [208] IndustryARC. 2013. Global Stevia/Stevia rebaudiana market (2013 - 2018).
- [209] Zenith International. Study shows stevia remains a sweet health trend. *The 2011 Zenith Report on Stevia*. 2011.
- [210] LENTSCHNER K. Le marché de la stévia décolle en France. *Le Figaro*. 2012.
<http://www.lefigaro.fr/societes/2012/09/21/20005-20120921ARTFIG00639-le-marche-de-la-stevia-decolle-en-france.php>
(Consulté le 13/04/2015)
- [211] Agrimip Innovation. Projet Stevianov - Développement d'une filière française tracée de *Stevia rebaudiana* Bertoni. 2013. http://eco.ted.fr/sites/eco.ted.fr/files/Soirée-Agri-SO-Innovation-05.11.2013_Stevianov-presentation-projet_0.pdf
(Consulté le 13/04/2015)
- [212] LENTSCHNER K. Naissance en France du champion européen de la stévia. *Le Figaro*. 2013. <http://www.lefigaro.fr/societes/2013/09/04/20005-20130904ARTFIG00338-naissance-en-france-du-champion-europeen-de-la-stevia.php>
(Consulté le 13/04/2015)



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Jonathan LESNIAREK

***Stevia rebaudiana* B. :**
Réels enjeux de santé publique ou campagne marketing ?

RÉSUMÉ

Le sucre est retrouvé dans de nombreuses denrées alimentaires, notre civilisation le consomme de manière excessive ce qui engendre des pathologies graves. Malheureusement, ces pathologies sont de plus en plus nombreuses et surviennent de plus en plus tôt.

Stevia rebaudiana B. contient des glycosides de stéviol possédant un fort pouvoir sucrant, entre 200 et 350 fois plus que le saccharose, sans apporter ni calories, ni glucides. La stévia s'inscrit donc comme une solution aux pathologies liées au sucre, en se substituant à lui dans l'alimentation.

Depuis 2009, les glycosides de stéviol sont autorisés en France comme édulcorant et 2011 pour l'ensemble de la zone Euro. Cet événement est relativement récent pour qu'un impact sur l'obésité et le diabète puisse être observé. Des études dans les années à venir doivent être menées. En plus de leur propriété sucrante, les glycosides de stéviol présentent des caractéristiques anticariogène, antidiabétique, antioxydante, antimicrobienne, antihypertenseur, anti-inflammatoire et anticancérigène pouvant être utiles pour le traitement de pathologies liées ou non au sucre. Mais actuellement, il ne sont pas commercialisés pour ces activités.

La stévia représente économiquement un double enjeu. D'une part elle diminuerait les dépenses de santé, d'autre part elle générerait des profits aux industriels de l'agro-alimentaire en se substituant au sucre. Ceci est dû à l'origine naturelle, qui confère aux glycosides de stéviol une plus grande attractivité que les édulcorants synthétiques. Le marché de la stévia est en pleine expansion mais les dépenses de santé n'ont pas diminué suite à son introduction récente sur le sol Européen.

MOTS CLÉS : *Stevia rebaudiana*, glycosides de stéviol, sucre, édulcorant, toxicologie, diabète, obésité, économie.

ADRESSE : 2, le Pereyrol
07210 SAINT VINCENT DE BARRÈS

MAIL : jonathan.lesniarek@orange.fr

FILIÈRE : Industrie