HAL
open science

La place de Stevia rebaudiana au sein des édulcorants d'origine naturelle

Anne-Claire Thines

To cite this version:

Anne-Claire Thines. La place de Stevia rebaudiana au sein des édulcorants d'origine naturelle. Sciences pharmaceutiques. 2001. hal-01733520

HAL Id: hal-01733520

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733520

Submitted on 14 Mar 2018

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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 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 : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.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/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ph N 2001/19
Double

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

2001

DB 24796

FACULTE DE PHARMACIE

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

LA PLACE DE *STEVIA REBAUDIANA* AU SEIN DES EDULCORANTS D'ORIGINE NATURELLE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 avril 2001

pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Anne-Claire THINES

Membres du Jury

Président : M. François MORTIER, Professeur

Juges : Mme Marie Claude FUZELLIER, Maître de conférences
Mme Anne VOIRIN-TIERCELIN, Pharmacien, Nancy

BU PHARMA-ODONTOL
D 104 057678 9

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

2001

FACULTE DE PHARMACIE

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

LA PLACE DE *STEVIA REBAUDIANA* AU SEIN DES EDULCORANTS D'ORIGINE NATURELLE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 avril 2001

pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Anne-Claire THINES

Membres du Jury

Président : M. François MORTIER, Professeur

Juges : Mme Marie Claude FUZELLIER, Maître de conférences
Mme Anne VOIRIN-TIERCELIN, Pharmacien, Nancy

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : Mme Chantal FINANCE
Vice Doyen : Mme Anne ROVEL

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mle BESSON Suzanne
Mle GIRARD Thérèse
M. LECTARD Pierre
M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Physico-chimie appliquée à la formulation pharmaceutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mle	FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme	FUZELLLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratiques officinales

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais

SERMENT DES APOTHICAIRES

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 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 d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

A notre Président de thèse,

Monsieur François MORTIER
Professeur
Pharmacognosie

Qui a accepté la présidence de cette thèse, tous mes remerciements les plus sincères.

A nos Juges,

Madame Marie-Claude FUZELLIER
Maître de conférences
Pharmacognosie

Qui m'a fait l'honneur de me confier un sujet de thèse dont elle a suivi et guidé la réalisation. Je la remercie pour sa disponibilité, ses précieux conseils et lui témoigne toute ma reconnaissance.

Madame Anne VOIRIN-TIERCELIN
Pharmacien
Maître de stage

Qui a guidé mes premiers pas dans mon exercice professionnel et qui a accepté avec beaucoup de gentillesse de juger ce travail, tous mes remerciements et ma reconnaissance.

Plan

Introduction p.1

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

1ère Partie : Le goût et la saveur sucrée.

1. Histologie et physiologie du goût. p.4

1.1. La langue, l'appareil du goût. p.4

1.2. Les récepteurs gustatifs et la transmission du signal gustatif dans le système nerveux central. p.5

1.3. Les sensations gustatives. p.8

1.4. Préférences, aversions et facteurs extérieures. p.10

1.5. Les modifications du goût. p.11

2. La saveur sucrée. p.11

2.1. Origine des descripteurs. p.12

2.2. Les différences interindividuelles. p.13

2.2.1. Distribution. p.13

2.2.2. Profils. p.13

2.3. Le codage : les images sensorielles. p.13

2.4. Multiples combinaisons de récepteurs. p.15

2.4.1. Chimiorécepteurs. p.15

2.4.2. Le génome personnel. p.15

2.5. Structure de l'espace gustatif. p.15

2.6. Structure des sites récepteurs. p.16

2ème Partie : *Stevia rebaudiana* Bertoni ou Herbe sucrée du Paraguay.

1. Histoire. p.20

2. Botanique. p.21

3. Culture et propagation. p.22

3.1. Production. p.22

3.2. Propagation. p.22

3.2.1. Sexuée. p.22

3.2.2. Végétative. p.23

3.2.3. Culture cellulaire. p.23

4. Composition chimique. p.24

4.1. **Stévioside.** p.24

4.2. **Rebaudiosides et dulcosides.** p.25

4.3. **Autres.** p.27

5. Le stévioside. p.27

5.1. **Métabolisme.** p.27

5.2. **Stabilité .** p.28

5.3. **Propriétés sensorielles.** p.29

6. Toxicologie. p.30

6.1. **Toxicité aiguë.** p.30

6.1.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles. p.30

6.1.2. Stévioside. p.30

6.2. **Toxicité subchronique.** p.31

6.2.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles. p.31

6.2.2. Stévioside. p.31

6.3. **Toxicité chronique et carcinogénicité.** p.31

6.4. **Effets sur la reproduction.** p.33

6.4.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles. p.33

6.4.2. Stévioside. p.33

6.5. Potentiel mutagène. p.35

6.6. Effets sur le métabolisme des glucides. p.36

6.6.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles. p.36

6.6.2. Stévioside. p.36

6.7. Effets cardiovasculaires. p.37

6.7.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles. p.37

6.7.2. Stévioside. p.38

6.8. Effets rénaux. p.38

6.8.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles. p.38

6.8.2. Stévioside. p.39

6.9. Effet cariogène. p.39

6.10. Effets sur le muscle lisse. p.40

6.11. Effets sur la phosphorylation oxydative. p.40

7. Autres propriétés du *Stevia rebaudiana.* p.40

7.1. Activité antimitotique. p.40

7.2. Activité bactéricide. p.41

7.3. Activité anti-virale. p.41

7.4. Effets sur la croissance des plantes. p.41

8. Utilisation du stévioside et des extraits de *Stevia rebaudiana* Bertoni dans le monde. p.42

8.1. Généralités. p.42

8.2. Impact nutritionnel. p.42

8.3. Utilisation dans le monde. p.43

8.3.1. Au Paraguay. p.43

8.3.2. Au japon. p.43

8.3.3. En Chine. p.44

8.3.4. Au Brésil. p.44

8.3.5. Aux Etats-Unis. p.44

3ème Partie : Autres édulcorants d'origine naturelle.

1. Les protéines édulcorantes. p.47

1.1. La thaumatine. p.47

1.1.1. La plante. p.47

1.1.2. Composition. p.48

1.1.3. Propriétés. p.48

1.1.4. Toxicité. p.49

1.1.5. Intérêt. p.49

1.2. La monelline. p.50

1.2.1. La plante. p.50

1.2.2. Composition. p.51

1.2.3. Propriétés. p.51

1.2.4. Toxicité. p.51

1.3. La miraculine. p.52

1.3.1. La plante. p.52

1.3.2. Composition. p.53

1.3.3. Propriétés. p.53

1.3.4. Toxicité. p.54

2. Les dérivés semi-synthétiques de flavonosides naturels, les dihydrochalcones. p.54

2.1. Origine. p.55

2.2. Propriétés. p.56

2.3. Toxicité. p.57

2.4. Intérêt. p.57

3. Un saponoside : la glycyrrhizine. p.57

3.1. La plante. p.58

3.2. Composition. p.59

3.3. Propriétés. p.60

3.4. Emplois. p.61

3.5. Toxicité. p.62

3.6. Intérêt. p.62

4. La phyllodulcine. p.63

4.1. La plante. p.63

4.2. Composition. p.63

4.3. Propriétés. p.63

4ème Partie : Législation.

1. Cas des édulcorants autorisés. p.66

1.1. Thaumatine et néohespéridine dihydrochalcone. p.66

1.2. Glycyrrhizine. p.71

1.3. Critères de pureté. p.72

2. Le règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil. p.74

2.1. Introduction. p.74

2.2. Catégories de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires recensés par le règlement (CE) n° 258/97. p.75

2.3. Points clés pour l'évaluation de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires. p.75

2.4. Classification scientifique des nouveaux aliments en vue de l'évaluation de leur innocuité. p.78

2.5. Identification des informations essentielles requises pour l'évaluation de l'innocuité d'un nouvel aliment ou d'un nouvel ingrédient alimentaire (NA). p.79

Conclusion p.82

Annexes p.85

Annexe 1 : Comparaison entre le stévioside et deux autres édulcorants intenses d'origine naturelle. p. 86

Annexe 2 : Planche de botanique, *Stevia rebaudiana* Bertoni. p. 87

Annexe 3 : Glossaire. p. 88

Introduction

La recherche d'édulcorants puissants se poursuit continuellement dans le but de promouvoir des alternatives au « sucre » dans des situations spécifiques telles que l'obésité ou le diabète. Cette recherche perpétuelle est stimulée par la demande d'aliments allégés et de boissons faiblement caloriques.

Il existe de nombreux édulcorants de structures chimiques très variées. Parmi les édulcorants artificiels, on note le cyclamate et la saccharine qui ont posé des problèmes toxicologiques. Des molécules synthétiques telles que acesulfame de potassium, l'aspartame se sont imposées. On trouve aussi l'alitame (dipeptide) et le sucralose (dérivé du saccharose) qui ont un avenir très prometteur. Les édulcorants d'origine naturelle sont tout aussi nombreux : la thaumatine, la monelline, la miraculine, la glycyrrhizine, la néohespéridine dihydrochalcone et accessoirement la phyllodulcine. Actuellement une autre molécule naturelle, dotée d'un pouvoir sucrant intense, issue de *Stevia rebaudiana* Bertoni intéresse particulièrement les chercheurs et les industriels.

Dans une première partie, les notions de goût et de saveur sucrée sont exposées pour mieux comprendre la complexité des sensations gustatives.

Dans une deuxième partie, on s'intéresse tout particulièrement à la plante, *Stevia rebaudiana* Bertoni et aux molécules qui en sont extraites dont le stévioside.

Dans une troisième partie, les édulcorants naturels majeurs sont détaillés pour se faire une idée de la place qu'occupent la plante, *Stevia rebaudiana* et le stévioside au sein de ces molécules.

Enfin dans une quatrième partie, la législation concernant les édulcorants naturels autorisés est évoquée, ainsi que le cadre législatif, au sein de l'Europe, dans lequel est étudié le cas de *Stevia rebaudiana* et du stévioside.

1ère Partie:
le goût
et
la saveur sucrée

Le goût et la saveur du sucre, le goût du sucré, la saveur sucrée, la flaveur sucrée sont des termes et des expressions souvent employés les uns pour les autres.
L'étymologie nous enseigne que le mot *goût* vient d'un mot indo-européen, *geus*, qui signifie « éprouver, goûter, apprécier ». Effectivement, le goût nous permet d'éprouver ou de juger directement notre environnement. Beaucoup de personnes estiment que le goût est le sens qui nous procure le plus de plaisir.
Par définition, la saveur est la sensation produite par certaines substances qui stimulent l'organe du goût et par extension un peu laxiste du langage, on emploie aussi, communément, l'expression « goût sucré » dans le sens de saveur sucrée. (15, 34)
Dans cette partie, l'histologie, la physiologie du goût et la saveur sucrée sont traitées.

1. Histologie et physiologie du goût.

1.1. La langue, l'appareil du goût.

La langue se présente comme un organe musculaire complexe composé de 17 muscles et recouvert d'une muqueuse où se situent les récepteurs du goût. (11)

Placé au centre de l'arcade dentaire inférieure, sa partie antérieure est mobile tandis que sa partie postérieure fait corps avec le plancher de la cavité orale et la partie supérieure du carrefour pharyngo-laryngé, si bien que seule la face supérieure de la langue est totalement libre. (11)

La face supérieure de la langue est divisée en deux par une ligne en forme de V à concavité antérieure, le V lingual. La face inférieure est reliée au plancher oral par un repli, le frein de la langue. (11)

1.2. Les récepteurs gustatifs et la transmission du signal gustatif dans le système nerveux central.

Le goût est perçu au niveau de la cavité buccale par des récepteurs gustatifs constitués de cellules épithéliales modifiées. (52)

Ces cellules sensorielles gustatives sont regroupées dans des bourgeons du goût. On en décompte 10 000 qui sont situés, principalement, sur la langue et au niveau du palais mou, sur la face interne des joues, sur le pharynx et sur l'épiglotte. En majorité, les bourgeons du goût siègent dans les éminences de la muqueuse linguale appelées papilles. (34)

On en décrit trois types différents selon leur structure morphologique :

- ❖ Les papilles filiformes sont les plus nombreuses et sont dépourvues de bourgeon du goût. Elles sont formées de la simple surélévation de l'épithélium lingual.
- ❖ Les papilles fungiformes sont les plus volumineuses, moins nombreuses et contiennent des bourgeons du goût situés au niveau de leur partie superficielle. Elles sont disséminées sur toute la surface de la langue et sont particulièrement abondantes sur le bout et les côtés.
- ❖ Les papilles caliciformes sont peu nombreuses et exclusivement localisées au V lingual, limitées par un sillon circulaire entourant une surélévation centrale, les bourgeons du goût étant situés au niveau des faces latérales de la papille dans le sillon. (52)

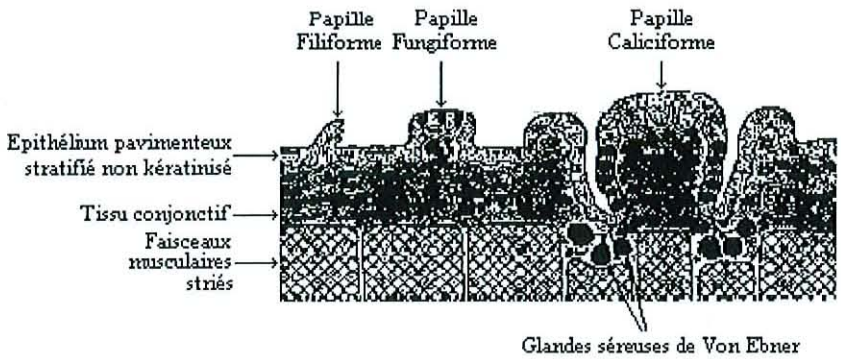


Figure 1 : Les papilles linguales. (52)

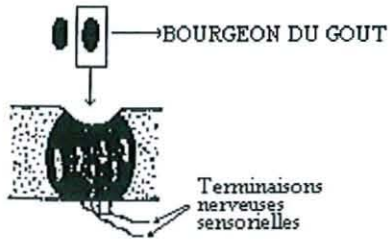


Figure 2 : Un bourgeon du goût. (52)

Chaque bourgeon contient des cellules sensorielles gustatives, des cellules de soutien et des cellules basales. Il existe un renouvellement continu des cellules sensorielles tous les 7 à 10 jours, grâce à la division des cellules basales (ces cellules étant sujettes à une friction intense par leur situation). (52)

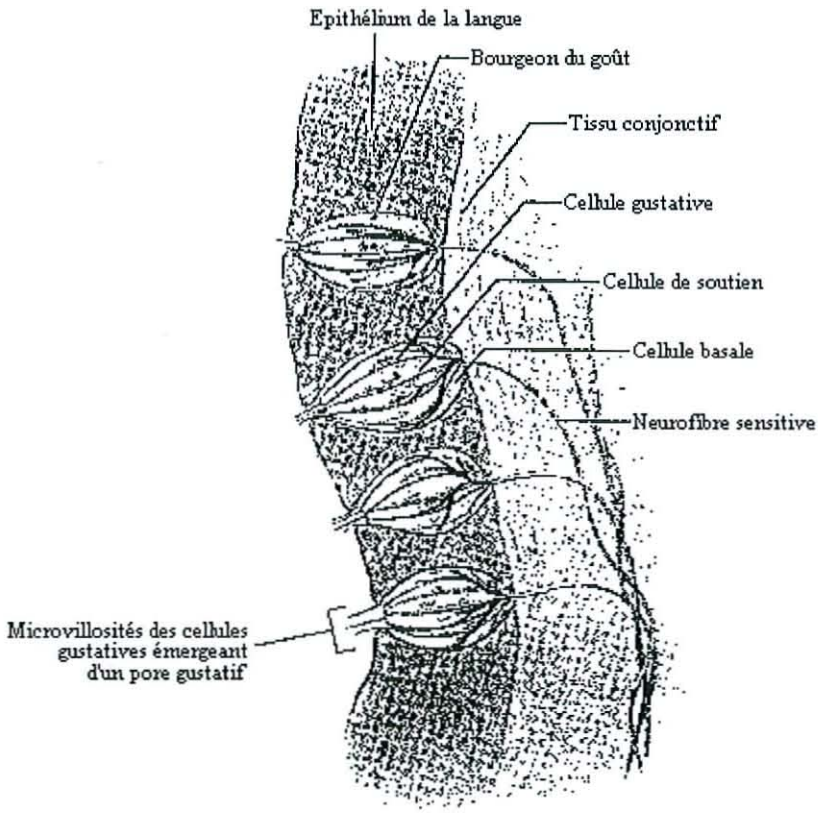


Figure 3 : Structure des bourgeons du goût. (34)

Le pôle apical de chacune des cellules porte plusieurs microvillosités qui font saillies dans le pore en direction de la cavité buccale et forment les récepteurs de la surface du goût. La membrane de ces récepteurs, comme celle des autres cellules réceptrices, est chargée, l'intérieur étant négatif par rapport à l'extérieur. L'application d'un stimulus gustatif sur les microvillosités

entraîne la dépolarisation partielle de la membrane. Lorsqu'un seuil est atteint, un potentiel d'action est engendré, proportionnel à la concentration de la substance stimulante. Le mécanisme de déclenchement est dû à la fixation de molécules chimiques sur des récepteurs membranaires dont la nature est à l'origine de la spécificité des sensations gustatives. (23)

Suite à l'application du stimulus gustatif, il y a transmission immédiate d'un signal intense par les neurones sensoriels gustatifs puis d'un signal plus faible qui persiste tant que dure la stimulation gustative du bourgeon. Le stimulus sera progressivement éliminé par la salive. (23)

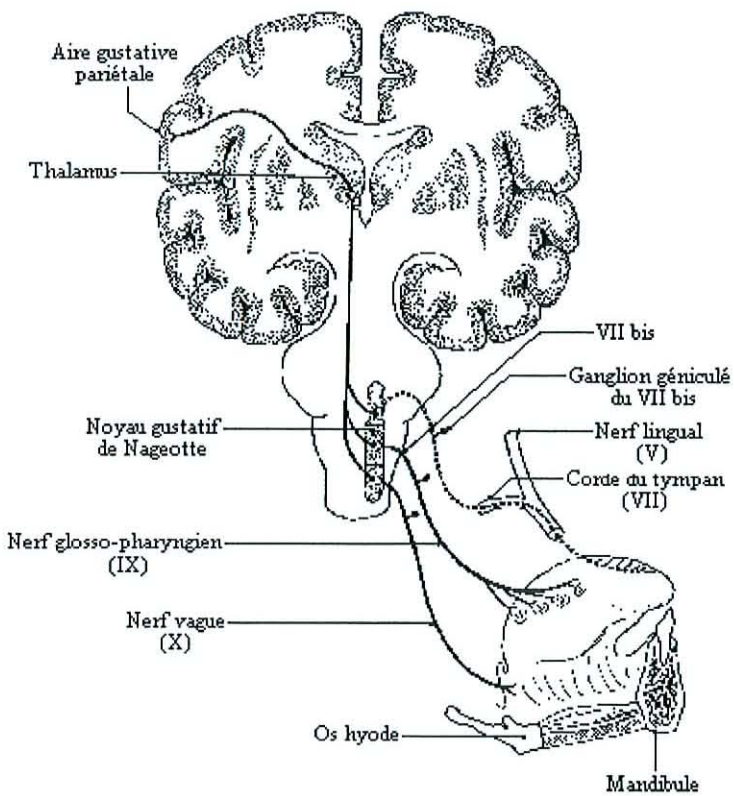


Figure 4 : Systématisation de l'appareil du goût. (11)

Les terminaisons ramifiées des fibres sensorielles gustatives forment un réseau entres les cellules gustatives et sont stimulées par des cellules réceptrices, probablement par le biais de neurotransmetteurs.

Ainsi les signaux gustatifs provenant :

- Des deux tiers antérieurs de la langue, passent initialement par le nerf lingual, branche du nerf trijumeau (V), puis par la corde du tympan (VII) et, de là, le faisceau solitaire situé dans le tronc cérébral.

- ❖ Des papilles caliciformes de la partie postérieure de la langue, sont véhiculés par le nerf glosso-pharyngien (IX) et gagnent aussi le faisceau solitaire un peu en dessous des précédents.
- ❖ De la base de la langue et de certaines zones du pharynx sont transmis par le nerf pneumogastrique (X) (ou nerf vague) au faisceau solitaire. (11, 23)

Tous les neurones gustatifs afférents primaires font synapse dans le noyau solitaire d'où partent les seconds neurones qui gagnent le thalamus où ils font, à leur tour, synapse avec les neurones du troisième ordre qui atteignent l'aire gustative pariétale. (23,34)

Remarque : il est probable que le SNC joue un rôle dans

- L'adaptation rapide à des sensations gustatives au point qu'elles peuvent disparaître.
- La préférence gustative qui contribue au contrôle des ingestions. (23)

1.3. Les sensations gustatives.

Les récepteurs sont regroupés en 4 catégories générales qui correspondent aux saveurs fondamentales : l'acide, le salé, le sucré et l'amer.

Ainsi chaque saveur est due à un mécanisme différent :

- ❖ Le goût salé est produit dans sa forme la plus pure par le chlorure de sodium qui, sous sa forme ionisée, entraîne une réponse biphasique : l'ion Na+ produit une excitation du récepteur puis l'ion Cl^- une inhibition.
- ❖ Le goût acide est dû à la présence de substances acides : l'élément responsable est l'ion H+ pour les acides inorganiques. Il est d'autant plus marqué que la concentration en proton est grande et la variation de pH intervient grâce à des canaux calciques voltage dépendant situés à l'apex de la cellule. L'anion peut aussi jouer un rôle dans la genèse du signal pour les acides organiques.
- ❖ Le **goût sucré** provient de la liaison d'une molécule de glucose sur un récepteur membranaire. Toutes les molécules chimiquement apparentées au glucose peuvent se lier à des récepteurs entraînant une excitation plus ou moins importante. Par exemple le fructose peut se lier à ces récepteurs mais produit une excitation plus faible que celle du glucose,

expliquant son pouvoir sucrant moindre. En fait ce sont surtout les anions et les molécules riches en groupement alcool (ROH) qui stimulent ces récepteurs. (Par exemple le glycérol CH_2OH-CHOH-CH_2OH)

❖ L'amertume est produite par des substances organiques comme la quinine. On ne sait pas exactement le mode d'action de ces substances : action directe sur un récepteur membranaire lié à des canaux sodiques et potassiques ou passage transmembranaire et action intracellulaire. De même, on ne connaît pas le ou les groupements chimiques fonctionnels responsables de la liaison au récepteur. (2, 52)

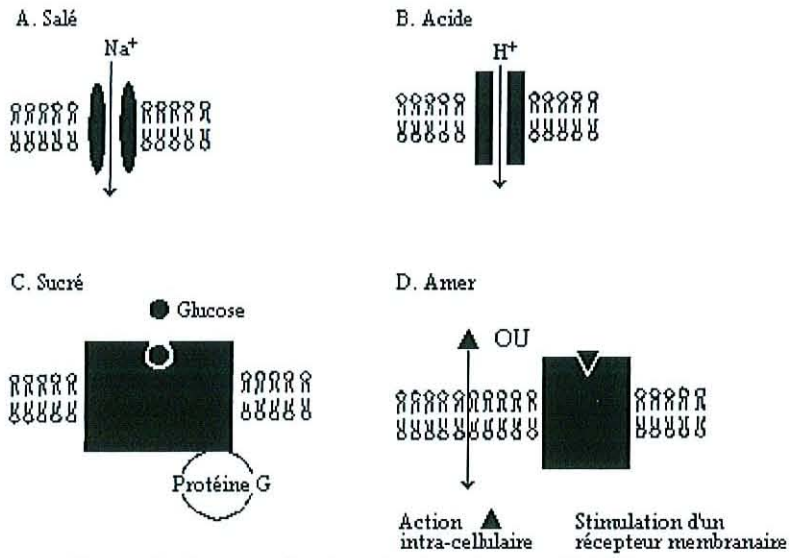


Figure 5 : La transduction du signal gustatif. (52)

Le goût fournit donc les données sensorielles essentielles permettant les sélections discriminatoires nécessaires à la survie en permettant le repérage des caractères organoleptiques d'aliments favorables (comme les glucides) et le rejet hors de la cavité buccale de certains autres comme les alcaloïdes toxiques fréquemment amers. (2)

Normalement, les sensations gustatives sont provoquées par des mélanges complexes de saveurs. Or, il n'existe pas de différence structurale entre les bourgeons du goût des différentes parties de la langue. Cependant, le bout de la langue est surtout sensible au sucré et au salé, les côtés, à l'acide, et l'arrière (près de la racine), à l'amer. Mais ces différences ne sont pas absolues ; en effet, la plupart des bourgeons du goût réagissent à deux, trois ou quatre saveurs et beaucoup de substances ont une saveur mixte. (34)

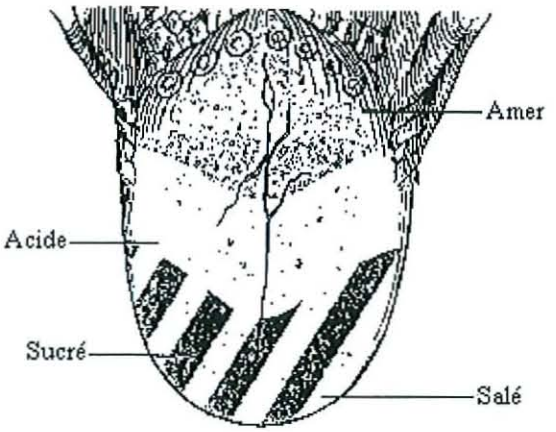


Figure 6 : La topographie de la sensibilité gustative sur le dos de la langue. (34)

1.4. Préférences, aversions et facteurs extérieurs.

En matière de goût, les préférences et les aversions ont une valeur homéostatique :

- ✓ Une prédilection pour le sucré et le salé pousse à satisfaire les besoins en glucides, minéraux et en certains acides aminés.
- ✓ De nombreux aliments naturellement acides sont riches en vitamine C, qui est une vitamine essentielle.
- ✓ Beaucoup de poisons naturels et d'aliments gâtés ont un goût amer, si bien que notre aversion pour l'amertume a une fonction protectrice (mais il faut noter que les récepteurs à l'amer sont situés à l'arrière de la langue). (34)

De plus le goût est intimement lié à la stimulation des récepteurs olfactifs. En fait, celui-ci relève à 80 % de l'odorat. La bouche contient aussi des thermorécepteurs, des mécanorécepteurs et des nocicepteurs ; de ce fait la température et la texture des aliments ajoutent ou nuisent à leur saveur. (34)

1.5. Les modifications du goût.

Le goût joue un rôle important dans le choix des aliments et dans le comportement alimentaire. De plus il favorise une digestion de bonne qualité en stimulant les sécrétions et la motricité digestives. L'agueusie est donc susceptible d'altérer l'état nutritionnel et d'aggraver ainsi les pathologies qui les provoquent ou auxquelles elles sont associées. (32)

Une atrophie locale, un traumatisme, une lésion des voies de conduction nerveuse, un trouble de la régénération des récepteurs ou de leur environnement sont les principales situations entraînant une altération du goût. Ainsi il peut être altéré par :

- Des causes locales comme des troubles dentaires, le syndrome de Sjögren, une irradiation endobuccale.
- Des infections telles que le coryza et une hépatite virale.
- Des endocrinopathies comme une hypothyroïdie ou un syndrome de Turner.
- Des affections générales comme un cancer, une insuffisance rénale chronique ou une cirrhose.
- Des causes neurologiques comme un traumatisme crânien ou une sclérose en plaques.
- Des causes nutritionnelles telles que une dénutrition chronique, une carence protéino-calorique ou des carences en zinc et en vitamines B12.
- Des médicaments comme les antithyroïdiens de synthèse, les antimitotiques (vincristine, azathioprine, méthotrexate) et ceux qui ont un groupement sulfhydril comme le captopril et la pénicillamine. (32, 54)

2. La saveur sucrée.

La saveur sucrée n'est pas due à une seule classe de substances chimiques. De nombreuses substances sont en cause : sucres, glycols, alcools, aldéhydes, cétones, amides, esters, acides aminés, acides sulfoniques, acides halogénés et sels inorganiques de plomb et de béryllium. On remarque aussi que la plupart des substances à goût sucré sont des composés organiques et que la simple substitution d'un radical peut souvent transformer la saveur sucrée en saveur amère. (23)

2.1. Origine des descripteurs.

Il s'agit du goût sucré du saccharose, du goût amer de la quinine, du goût acide et du goût salé. Ils sont purement gustatifs et ne permettent pas de décrire toutes les sensations gustatives. On n'a pas de descripteur équivalent dans le système olfactif où tous les descripteurs d'odeurs font appel à leur provenance (boisée, verte…). (17)

En gustation, il est probable que l'opposition sucré-amer, qui remonte à une époque où le saccharose était encore inconnu et donc le goût sucré pur aussi, représente plus le facteur hédonique que la qualité. Il faut noter que Aristote opposait le doux et non le sucré à l'amer. Ainsi dans le langage anglo-saxon, *sweet* est plutôt la traduction de « doux » que de « sucré ». (17)

En analyse sensorielle, il existe un biais qui prend son origine dans la confusion entre la sensibilité et la préférence et qui est profondément ancré dans l'histoire de notre langage. Il est possible que *sweet* et *bitter* soient apparus historiquement plutôt comme des termes se référant à ce qui est bon ou mauvais, ou peut-être même en croyant parler de ce qui est sain ou malsain à manger, puis, qu'ils aient été redéfinis et attribués à des qualités gustatives par les psychologues du XIXe siècle. (17)

Contrairement aux molécules organiques responsables des goûts sucré et amer, le salé et l'acide sont des stimulus uniques : les cations lithium et sodium pour le salé et l'ion H+ pour l'acide. (17)

En conclusion, il n'y aurait que deux vrais descripteurs (le salé et l'acide), sans valeur descriptive car ils ne désignent que deux « objets » précis, sans pouvoir de généralisation à d'autres sensations proches qui font totalement défaut. Les deux autres (le sucré et l'amer) seraient apparus comme des qualificatifs hédoniques, récupérés *a posteriori* par les scientifiques comme soi-disant descripteurs. (17)

2.2. Les différences interindividuelles.

2.2.1. Distribution

La distribution des sensibilités d'un ensemble de sujets pour le saccharose est très étendue. Pour 60% des sujets, le seuil de détection peut varier d'un facteur trois en concentration. Si on considère 98% de la population, la variation interindividuelle s'étend sur un facteur dix de concentration. (17)

Si on rapporte ces différences de sensibilité à l'observation anatomique de la langue humaine, on se rend compte que le nombre de papilles à la surface de la langue ne dépend pas du sexe, ni de l'âge de l'individu et varie dans le même rapport dix. (17)

2.2.2. Profils

Si l'on représente les distributions de sensibilité d'un même groupe de personne pour plusieurs composés du même goût, par exemple le sucré, on a la surprise de découvrir qu'un même sujet peut être classé parmi les plus sensibles pour un composé et parmi les moins sensibles pour un deuxième composé. La sensibilité dépend, donc, du sujet et du produit. On a une véritable indépendance d'un sujet à un autre et d'un composé à un autre. (17)

2.3. Le codage : les images sensorielles.

Chaque fibre innerve plusieurs cellules localisées dans différentes papilles. Les cellules sensorielles présentent des sensibilités multiples. Par exemple, une même cellule peut être sensible au sel, au saccharose à la quinine. On n'a donc pas affaire à un codage par lignes spécifiques. La présence d'un stimulus sur la membrane chimioréceptrice de l'ensemble des cellules sensorielles se traduit par l'activation plus ou moins forte de certains neurones, les autres restant au niveau de leur bruit de fond habituel. Cet ensemble d'unités activées et non activées constitue un motif qui dépend de la répartition des différents chimiorécepteurs dans l'ensemble des cellules sensorielles. Ce motif apparaît toujours semblable à lui-même à chaque présentation d'une même concentration du même stimulus. Le SNC mémorise cette forme et

apprend à la reconnaître lorsqu'elle se représente. C'est un processus de reconnaissance de forme et ce sont ces motifs qu'on appelle « images sensorielles ». (17)

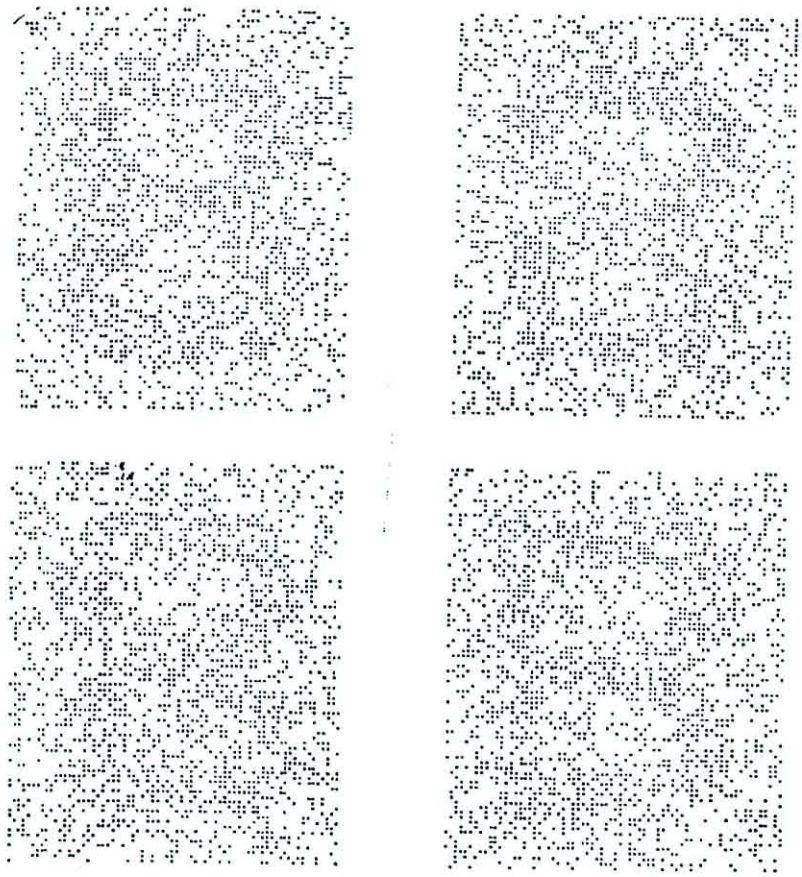


Figure 7 : Modèle d'images gustatives. (17)

Les trois premières images représentent un « 8 » à l'aide d'une densité de points de 43% contre un fond dont la densité est 26% (bruits de fond des neurones gustatifs). Une forme légèrement différente peut être obtenue avec un stimulus excitant un ensemble de cellules sensorielles peu différent : c'est le « B ». On peut imaginer que le « 8 » est l'image du saccharose et le « B » l'image de la saccharine. (17)

2.4. Multiples combinaisons de récepteurs.

2.4.1. Les chimiorécepteurs.

La sensibilité chimique dépend de l'existence de capteurs à l'interface entre le milieu interne et le milieu externe, par définition, les récepteurs doués de la capacité de reconnaître les molécules organiques sapides. Vu que deux molécules produisent un signal différent dans l'organisme, on peut conclure que ces molécules interagissent avec des récepteurs différents. (17)

2.4.2. Le génome personnel.

D'un sujet humain à un autre, on a trouve un petit nombre de sites identiques mais en proportions différentes selon l'individu. (17)

2.5. Structure de l'espace gustatif.

Les techniques d'analyse factorielle nous permettent de représenter les molécules dans un espace où les similitudes seront représentées par des proximités. On a donc des espaces continus où de proche en proche, on peut définir une similitude partielle entre deux molécules. On n'obtient donc pas un espace scindé en quatre groupes correspondants aux quatre descripteurs sémantiques. Au contraire, l'espace se remplit complètement. (17)

Les molécules sucrées constituent un sous-espace étendu, formé de plusieurs sous-groupe, les molécules amères également ; ces sous-espaces se jouxtent et se chevauchent en plusieurs lieux de rencontre. La distance entre deux molécules appartenant au « même goût », catégorie au sens de la théorie des quatre saveurs, peut être aussi grande que la distance entre deux molécules appartenant à des catégories sémantiques différentes. (17)

Des molécules inclassables dans le système des quatre catégories définissent éventuellement des pôles supplémentaires par rapport aux quatre saveurs du tétraèdre de HENNING (par exemple l'acide glycyrrhizique au goût sucré et de réglisse). (17)

Dans cet espace continu, chaque molécule a, donc, sa place particulière ; ce qui démontre l'existence d'un effet propre de chaque molécule sur le système des chimiorécepteurs. (17)

2.6. Structure des sites récepteurs.

Le site récepteur est la sous-structure moléculaire qui entre en interaction avec la molécule du stimulus. Le site ne peut être connu que par l'observation des caractéristiques géométriques et énergétiques des différents stimulus. (17)

En 1967, SCHALLENBERGER et ACREE proposent la théorie du système AH-B : le goût sucré résulte de la formation de deux liaisons hydrogène intermoléculaires antiparallèles. En 1972, KIER montre que le site accepteur peut comporter non pas deux mais trois liaisons potentielles : la troisième consiste en une interaction électrostatique du type VAN DER WAALS, entre deux zones hydrophobes appartenant respectivement au site récepteur et à la molécule stimulante. Il se trouve qu'une surface non négligeable de certaines molécules sucrées peut être estimée hydrophobe. On obtient, donc, un site trifonctionnel AH-B-X, géométriquement défini. (*in* 17)

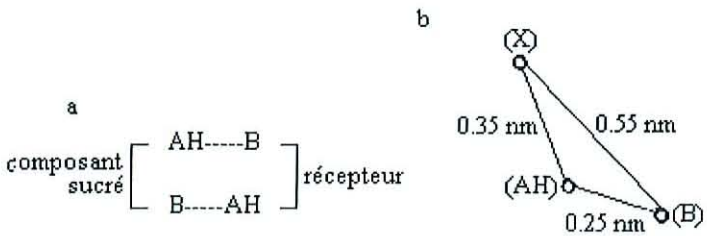


Figure 8 : Modèles de sites gustatifs (17)
a : site bifonctionnel de SHALLENBERGER et ACREE, 1967.
b : site trifonctionnel de KIER, 1972.

La synthèse donne quatre caractéristiques : une zone électro-donneuse, une zone électro-acceptrice, une zone de contacts hydrophobes et une ou plusieurs barrières spatiales. (17)

Actuellement on est persuadé qu'il existe plusieurs modèles de sites gustatifs suivant le type de stimuli :

- On a des récepteurs couplés aux protéines G :

  *on constate une action au niveau du canal potassique par le biais des protéines kinases A et C ; ce qui conduit à une dépolarisation.

  *on constate aussi une action sur le Ca++ intracellulaire ; ce qui conduit à une libération de transmetteurs.

- On a aussi des canaux liés directement à des récepteurs ; ce qui conduit de même à une dépolarisation. (33)

Remarque : on sait que les différents récepteurs sont constitués de protéines et de glycoprotéines.

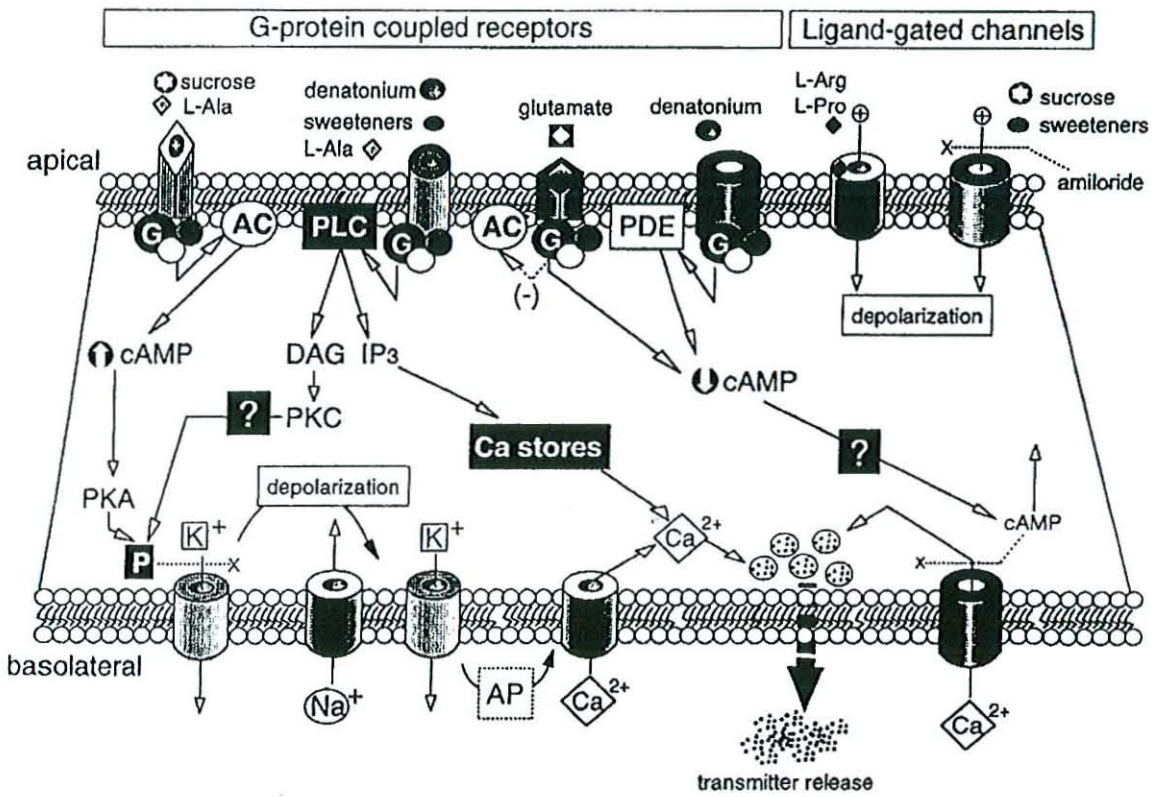


Figure 9 : Les récepteurs impliqués dans la saveur sucrée. (33)

(Ce diagramme n'implique pas que tous les récepteurs soient contenus dans une seule cellule et que les différents stimuli se lient au même récepteur)

Quand les stimuli du goût sucré se lient à des récepteurs couplés à une protéine G, il y a stimulation d'une adénylcyclase, qui, à son tour, entraîne la production d'AMPc (adénosine

monophosphate cyclique). Cet AMPc active une protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle et induit la fermeture d'un canal potassique, provoquant ainsi la dépolarisation de la cellule portant le récepteur du goût. On est dans le cas du saccharose. (33)

D'autres édulcorants agissent sur ces récepteurs en provoquant :

l'activation d'une phospholipase C, induisant la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP3). Le DAG active une protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle et provoque la fermeture d'un canal potassique. L'IP3 provoque la libération de Ca++ à parti des réserves intracellulaires.

l'inhibition de l'adénylcyclase et l'activation d'une phosphodiestérase (PDE). Ce qui conduit à une réduction de l'AMPc intracellulaire qui peut provoquer la fermeture d'un canal calcique AMPc sensible. (le calcium jouant un rôle dans la libération de transmetteurs) (33)

Remarque : les réponses intracellulaires diffèrent selon le type de stimulus mais on sait que la protéine G est constituée de sous-unités :

- α induisant l'activation de l'adénylcyclase.
- β et γ activant la phospholipase C. (33)

Il existe aussi des récepteurs couplés à des canaux cationiques, qui induisent leur ouverture, entraînant une dépolarisation de la cellule. Dans ce cas, le canal couplé au récepteur du saccharose peut être inhibé par la présence d'amiloride. (33)

L'étude de l'histologie et de la physiologie de la langue montre que la détection et la transmission des différentes saveurs obéissentt à des règles spécifiques. Si on y associe la complexité de la saveur sucrée, on se rend compte de la difficulté, non seulement, de la décrire, mais aussi, de trouver des substituts au sucre, chaque substance induisant des réponses particulières en fonction de ses caractéristiques propres.

2ème Partie:
Stevia rebaudiana Bertoni
ou Herbe sucrée du Paraguay

Bien que découverts par les Européens depuis plus d'un siècle et utilisés couramment dans plusieurs régions du monde, la plante *Stevia rebaudiana* Bertoni et le stévioside sont très peu connus en Europe. Actuellement le problème majeur est de prouver la totale innocuité de ces produits.

De nombreuses substances sont présentes dans la plante mais l'industrie s'intéresse essentiellement au stévioside présent en quantité importante au niveau des feuilles. Il possède un pouvoir édulcorant puissant et est attractif par son faible coût.

Pour présenter cette plante, son histoire, sa description botanique, ses constituants, notamment le stévioside, sa toxicité, sa production et sa consommation dans le monde sont évoqués.

1. Histoire.

Stevia rebaudiana Bertoni a été découverte en 1899 par Moises Bertoni. Cette plante est originaire des hauts plateaux du Nord-Est du Paraguay et du Brésil où elle pousse à l'état sauvage. Elle est connue des Indiens Guarany pour son pouvoir sucrant, depuis plusieurs siècles, sous les noms : Caā-jhe-hē, Caā-heē, Ca-ā-yupê, Azucā-caā, Eira-caā signifiant tous « Herbe sucrée ». Ils l'utilisaient pour édulcorer leurs boissons et notamment le Maté (*Ilex paraguariensis*) pour masquer sa saveur amère. (24, 25, 30, 50, 56)

D'abord baptisée *Eupatorium rebaudianum* Bertoni, elle rejoint finalement le genre *Stevia* (Bertoni, 1905) et prend le nom de *Stevia rebaudiana* Bertoni. (30)

Les premiers travaux sur cette plante remontent au début du XX° siècle. Rasenack obtient le principe sucré à l'état cristallin en 1908 et Dieterich en 1909. En 1931, Bridel et Lavieille montrent qu'il s'agit d'un hétéroside, soluble dans l'eau et de saveur sucrée 300 fois plus intense que celle du saccharose. L'établissement de sa structure détaillée a nécessité de nombreux travaux (Bell en 1954, Vis et Fletcher en 1956, Dolder en 1960, Djerassi en 1962). (*in* 25, 50)

2. Botanique.

Stevia rebaudiana est originaire du Nouveau Monde. On la trouve du Sud-Ouest des Etats-Unis au Nord-Est de l'Argentine en passant par le Mexique, l'Amérique Centrale, et les régions montagneuses brésiliennes. (25, 30, 56)

Cette plante appartient à la famille des Asteraceae. C'est une herbe de 40 à 80 cm de haut, vivace par sa racine. Ses feuilles oblongues (4-8 cm de long sur 8 à 15 mm de large) sont crénelées, légèrement pubescentes et de saveur fortement sucrée. Les inflorescences sont des capitules de fleurs peu colorées (cf. planche de botanique, annexe 2). Elle pousse le plus souvent à des altitudes de 500 à 3000 m sur des terrains montagneux semi-arides mais on peut aussi la trouver dans les herbages et les régions sub-montagneuses. (6, 50, 56)

Les parties utilisées sont les parties aériennes de la plante fraîche ainsi que les feuilles séchées et réduites en poudre. On peut y trouver mêlées de petites quantités de fleurs, tiges et graines. (56)

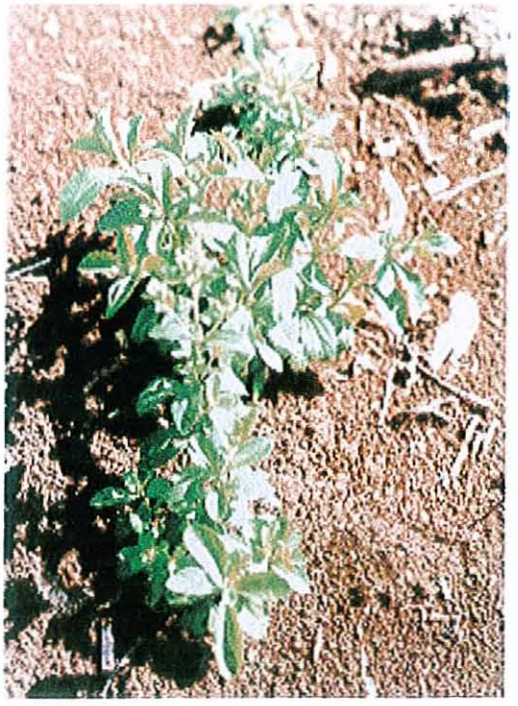


Figure 10 : *Stevia rebaudiana* Bertoni. (31)

3. Culture et propagation.

Stevia rebaudiana Bertoni est cultivée actuellement au Paraguay, Mexique, Amérique Centrale, Japon, Chine, Malaisie et Corée du Sud. En Europe, elle est cultivée en Espagne, Belgique et Royaume-Uni. Sous ces latitudes, elle est cultivée en serre. (25, 56)

3.1. Production.

Suite aux recherches agronomiques réalisées après son introduction au Japon, de nombreuses données sont devenues disponibles : éléments nutritifs, humidité de la terre, densité de la plante, repousse après récolte et croissance, caractéristiques de la propagation, fréquence des récoltes, les maladies et leur contrôle. Les techniques de culture s'en sont trouvées améliorées et la productivité augmentée. (24)

3.2. Propagation.

3.2.1. Sexuée.

Ce mode de propagation est largement employé malgré le faible indice de fertilité des graines. Cette méthode ne permet pas la production d'une population homogène avec des caractéristiques prédéfinies comme la composition et la concentration en substances édulcorantes. (24)

3.2.2. Végétative.

Cette méthode de propagation par coupe et divisions d'une plante arrivée à maturité est limitée par le faible nombre d'individus que l'on peut obtenir simultanément à partir d'un seul plant. Tous les plants seront dotés des mêmes caractéristiques. (24)

3.2.3. Culture cellulaire.

Les techniques de culture cellulaire permettent d'augmenter la productivité tout en diminuant les coûts de production. Associées aux méthodes traditionnelles, elles permettent l'obtention de populations homogènes :

- ✓ protégées des maladies,
- ✓ avec une importante concentration en substances édulcorantes,
- ✓ avec une masse importante de feuilles,
- ✓ présentant une résistance à la sécheresse, aux herbicides. (24)

Des tentatives ont été faites pour produire des agents édulcorants à partir de cultures cellulaires de *Stevia rebaudiana*. Les cals sont produits à partir de fragments de feuilles, de tiges, de pousses et sont cultivés dans un milieu avec des cytokines et des auxines. Ils peuvent être utilisés pour obtenir du stévioside *in vitro* à partir du cal ou pour produire du stévioside à partir du stéviol. (24)

Pour obtenir des cultures de cellules, l'obtention de protoplasmes est aussi une solution. Ceux-ci sont issus du mésophylle des feuilles ou d'une suspension cellulaire. (24)

4. Composition chimique.

Les feuilles renferment un mélange complexe d'hétérosides édulcorants formés à partir d'un alcool ent-kaurénique, le stéviol : stévioside (4 à 13 % du poids sec), stéviolbioside (traces), rebaudiosides A (2 à 4 %), B (traces), C (1 à 2 %), D (traces), E (traces) et dulcoside A (0,4 à 0,7 %). (24, 56)

4.1. Stévioside.

Le stévioside peut représenter jusqu'à 10 % de la masse de la feuille. On peut l'extraire par l'eau, le réextraire par le butanol et, généralement, le purifier par filtration sur charbon et cristallisation. On atteint un degré de pureté de 95 %, le rebaudioside A étant la principale impureté. (6, 25, 56)

En 1909, Dietrich isole un composé sucré, l'eupatorine, renommé stévine par Bertoni (1918) suite au changement de nomenclature. Bridel et Lavieille apportent de nombreuses informations sur la nature chimique des principes sucrant de *Stevia rebaudiana* et la stévine est rebaptisée stévioside. (*in* 30)

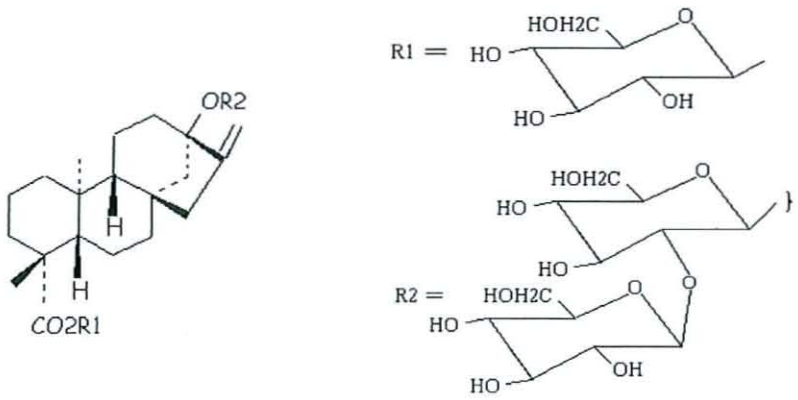


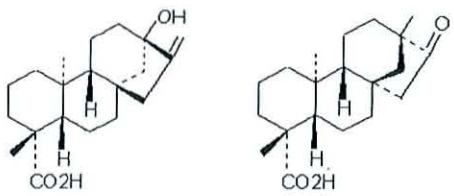
Figure 11 : Stévioside. (25)

Le stévioside est un hétéroside diterpénique formé à partir d'un acide ent-kaurénique, le stéviol (génine en $C_{20}H_{30}O_3$). Cet aglycone possède :

- Une fonction hydroxyle alcoolique où se trouve un bioside, le sophorose [2-O-(β-D-glucopyranosyl)-D-glucose] fixé en β (R1).
- Une fonction carboxyle estérifiée par une molécule de glucose (R2). (30)

Le stévioside est hydrolysé par les enzymes du suc digestif et de l'hépatopancréas de l'escargot *Helix pomatia* en stéviol et 3 molécules de glucose. (25, 50)

Suite à une hydrolyse acide, le stévioside est hydrolysé en isostéviol (génine isomère du stéviol) et 3 molécules de glucose. (30,50)



(a) (b)

Figure 12 : Stéviol (a) et isostéviol (b). (25)

Une hydrolyse en milieu basique donne le stéviolbioside qui a perdu une molécule de glucose par rapport au stévioside. (25)

4.2. Rebaudiosides et dulcosides.

Dans les années 70, un groupe de Japonais des Universités d'Hiroshima et d'Hokkaido a isolé d'autres hétérosides diterpéniques sucrant à partir de *Stevia rebaudiana*. Il s'agit du stéviolbioside, des rebaudiosides A, B, C (dulcoside B), D, E et du dulcoside A. Ils ont tous en commun la même génine, le stéviol. (cf. Tableau I) (30)

Glucosides	R^1	R^2
Rebaudioside A	β-Glc	β-Glc^2-β-Glc |^3 β-Glc
Rebaudioside B	H	β-Glc^2-β-Glc |^3 β-Glc
Rebaudioside C	β-Glc	β-Glc^2-α-Rha |^3 β-Glc
Rebaudioside D	β-Glc^2-β-Glc	β-Glc^2-β-Glc |^3 β-Glc
Rebaudioside E	β-Glc^2-β-Glc	β-Glc^2-β-Glc
Dulcoside A	β-Glc	β-Glc^2-α-Rha
Dulcoside B = Rebaudioside C		
Steviolbioside	H	β-Glc^2-β-Glc

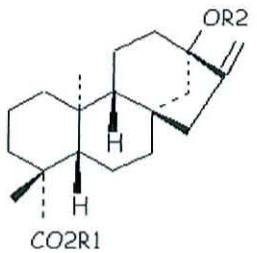


Tableau I : Rebaudiosides et dulcosides. (25)

Le rebaudioside A est plus édulcorant que le stévioside (1,2 à 1,6 fois plus important) et possède une saveur plus agréable (absence d'arrière goût) mais il est présent en plus faible quantité dans les feuilles. Des travaux ont permis de convertir le stévioside en rebaudioside A avec un rendement de 70 % (1977). (24, 30)

Tanaka, en 1980, a rapporté que :

- le stévioside et le rebaudioside E sont environ 100 à 150 fois plus sucrant que le saccharose (concentrations non définies).
- le rebaudioside A et le rebaudioside D ont en C_{13} un trioside (trois glucoses) ramifié et ont un pouvoir sucrant supérieur de 30 % par rapport au stévioside et au rebaudioside E.
- si une unité de glucose est remplacée par une unité de rhamnose, le pouvoir sucrant

diminue. Ainsi le rebaudioside C et le dulcoside A sont considérablement moins édulcorant que le rebaudioside A et le stévioside. (*in* 30)

4.3. Autres.

Dans les feuilles de *Stevia rebaudiana*, de nombreux constituants non édulcorants sont présents à côté des principes sucrants :
- des diterpènes à noyau labdane
- des triterpènes
- des stérols
- des flavonoïdes
- des substances volatiles
- des pigments
- des gommes
- de la matière inorganique. (30, 56)

5. Le stévioside.

5.1. Métabolisme.

Après administration par voie orale :

- de stévioside radio marqué, 1,5 % de la radioactivité est éliminée dans l'urine chez un animal intact ; mais chez les rats dont le canal biliaire est ligaturé, 96 % de la radioactivité est excrétée dans l'urine. Ceci prouve une circulation entéro-hépatique du stévioside et/ou de ses métabolites avec une demi-vie d'élimination de 24 heures. (55)
- de stévioside chez le rat, une importante quantité semble être dégradée par la flore intestinale en stéviol. Des études *in vitro*, utilisant la microflore intestinale du rat, ont

démontré que le stévioside est dégradé approximativement à 100 % (le rebaudioside A l'est à environ 65 %). (55)

- le stévioside n'est pas absorbé mais le stéviol l'est facilement ; plus tard, il est excrété dans la bile sous forme conjuguée puis excrété dans les fécès. (55)

Une étude a, au contraire, montré que le stévioside n'est pas métabolisé par le foie quand il est directement perfusé dans celui-ci. En effet aucune trace de produits de dégradation, dont le stéviol, n'a été retrouvée lors d'une recherche chromatographique. Par contre quand on injecte du stévioside marqué à I131 chez le rat Wistar, après 10 et 120 minutes, la plus forte concentration est observée dans le foie et l'intestin grêle, respectivement. Deux heures après l'injection, 52 % de la dose initiale est éliminée dans la bile et notamment sous forme de stéviol (métabolite majeur). Aucune trace de stéviol n'est trouvée dans les urines. (8, 27)

Wingard et al ont aussi conclu que la dégradation du stévioside peut avoir lieu chez l'Homme. En effet, elle a été obtenue avec de nombreuses enzymes digestives provenant de l'appareil gastro-intestinal de différentes espèces animales. De plus la microflore humaine a métabolisé le stévioside en stéviol et stéviol-16,17α-époxyde. Ils peuvent, donc, être formés et absorbés. Vu que le stéviol semble être mutagène, des études plus approfondies sont nécessaires. (*in* 55)

5.2. Stabilité.

La molécule de stévioside est stable pour des pH de 3 à 9 quand elle est chauffée à 100°C pendant 1 heure mais une rapide décomposition intervient pour des pH supérieurs à 9 dans les mêmes conditions. Elle résisterait à des températures élevées (180°C) dans les substances alimentaires mais une décomposition considérable a lieu pour des températures élevées de stockage. (30)

5.3. Propriétés sensorielles.

Le stévioside possède un pouvoir sucrant 200 à 300 fois plus élevé que celui du saccharose mais, quand il est pur à 93-95 %, il possède un arrière-goût persistant, avec astringence et amertume. (6, 25, 30)

Le pouvoir édulcorant du stévioside pur est 300 fois celui d'une solution de saccharose à 0,4 %, 150 fois celui d'une solution de saccharose à 4 % et 100 fois d'une solution de saccharose à 10 %. (30)

Lorsque le stévioside est pur à 50 %, l'arrière-goût est moindre. Cependant la qualité du pouvoir édulcorant du stévioside est considérée comme étant :

- ✓ plus agréable que celle de la glycyrrhizine ou du saccharinate de sodium.
- ✓ égale ou supérieure à celle de l'aspartame ou du cyclamate de sodium. (30)

De nombreuses tentatives ont été faites pour améliorer l'arrière-goût déplaisant du stévioside. Le saccharose, le glucose, le fructose ou le saccharinate de sodium, dans l'ordre décroissant d'efficacité, améliorent les qualités organoleptiques du stévioside. Ainsi plusieurs brevets japonais décrivent l'utilisation du stévioside ou d'un extrait aqueux de *Stevia rebaudiana* pour améliorer le goût des édulcorants artificiels, du saccharose, du fructose ainsi que la sensation procurée par les boissons non alcoolisées, l'arôme et la saveur du tabac. Des brevets similaires ont été déposés pour d'autres hétérosides diterpéniques issus de la même plante et notamment pour le rebaudioside A. (30)

De même on a cherché à modifier les unités glucose du stévioside et de ses dérivés pour améliorer l'arrière-goût désagréable et augmenter le pouvoir sucrant. (25)

6. Toxicologie.

La plupart des évaluations toxicologiques sont effectuées sur le stévioside et peu d'études s'intéressent à la plante dans sa globalité. Pour les quelques études disponibles, il est impossible de connaître les caractéristiques et l'origine du matériel utilisé pour obtenir les extraits testés et donc impossible d'évaluer la sécurité liée à leur utilisation. De même pour évaluer l'innocuité du stévioside, il est difficile de se baser sur des études où les extraits contiennent 95 % de stévioside. Le plus souvent, ce sont des extraits bruts de *Stevia rebaudiana* Bertoni ou des mélanges de différents hétérosides diterpéniques à pouvoir sucrant. (55, 56)

6.1. Toxicité aiguë.

6.1.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles.

En général, deux types d'extraits de *Stevia rebaudiana* Bertoni sont testés :

- ✓ Le premier contient environ 20 % de stévioside et a une DL50 de 17 g/kg quand il est administré oralement à une souris.
- ✓ Le second contient environ 40 % de stévioside et a une DL50 de 42 g/kg quand il est administré oralement à une souris. (30)

Bien que ces résultats ne concordent pas exactement, on peut conclure que cette plante présente une toxicité très faible, voir nulle. (25)

6.1.2. Stévioside.

Le stévioside et le stéviol ont une très faible toxicité par voie orale chez la souris, le rat et le hamster. Quand il est administré oralement à des rats, il a une DL50 de 8,2g/kg. (30, 55, 64)

6.2. Toxicité subchronique.

6.2.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles.

Une étude effectuée avec des rats Wistar mâles et femelles âgés de cinq semaines avec un extrait aqueux de feuilles de *Stevia rebaudiana* a pour objectif de rechercher tout signe de toxicité. Chaque groupe est composé de 15 mâles et 15 femelles et est nourri avec 0,28 %, 1,4 % et 7 % de stévioside. Au bout de trois mois, aucun effet toxique n'a été retenu. (30)

Une étude similaire effectuée avec un extrait aqueux de feuilles de *Stevia rebaudiana* contenant 50 % de stévioside n'a rapporté aucune anomalie dose- dépendante. (30)

6.2.2. Stévioside.

Trois études chez le rat ont été publiées dont deux en japonais et une en coréen et seuls les résumés en anglais sont disponibles.

Dans l'une de ces études menée pendant 13 semaines, des cellules nécrosées ont été trouvées dans le foie de tous les mâles traités (la plus faible dose administrée est équivalente à 155 mg/kg). Mais ce n'est pas une modification notable car elle est relativement peu sévère et limitée aux mâles uniquement. (1, 55)

6.3. Toxicité chronique et carcinogénicité.

- Yamada et al ont mis au point une étude de toxicité chronique avec le stévioside sur des rats F344 pendant 22 mois pour les mâles et 24 mois pour les femelles. Un extrait aqueux purifié de *Stevia rebaudiana*, contenant environ 95 % d'hétérosides diterpéniques édulcorant (74,5 % de stévioside et 16,3 % de rebaudioside), a été donné à la dose de 0.1, 0.3 et 1 % (chaque

groupe contenant 70 mâles et 70 femelles). La dose la plus élevée était basée sur une consommation humaine estimée à 4 mg/kg et avec un facteur ajouté de 100. Les conclusions majeures de cette étude sont une réduction de la spermatogenèse, une diminution du poids des vésicules séminales, une prolifération des cellules interstitielles dans les testicules, une atrophie du thymus, des lésions inflammatoires dans la trachée et les poumons et des modifications au niveau des reins (dégénération de l'épithélium tubulaire et une sclérose glomérulaire) qui peuvent être imputées à l'âge. Il est impossible d'évaluer si cette étude a recherché de façon adéquate les aspects carcinogènes. (*in* 55)

- Xili et al (70) ont combiné une étude de toxicité chronique et de carcinogénicité, chez des rats Wistar. Ils ont utilisé une poudre de stévioside pure à 85 % et l'ont donné aux doses de 0.2, 0.6, et 1.2 %, soit 100, 300 et 600 mg/kg/jour (chaque groupe comporte 45 mâles et 45 femelles). Vu l'absence d'effets toxiques, la description incomplète de la composition chimique du produit testé, sa faible pureté et les doses de stévioside utilisées, il n'est pas possible d'évaluer si cette étude a évalué de façon appropriée les aspects de la carcinogénicité.

- Une autre étude effectuée sur des rats F344 a été publiée. Un extrait purifié de stévioside (95,6 %) a été administrée à des doses équivalentes à 155, 310, 625, 1250 et 2500 mg/kg/jour. Chaque groupe était constitué de 50 mâles et 50 femelles. Aucune identification et quantification des impuretés de l'extrait n'ont été rapportée. Il a été conclu que le stévioside n'était pas carcinogène chez le rat F344 dans ces conditions expérimentales. (55, 65)

Vu les effets produits par l'extrait aqueux purifié de *Stevia rebaudiana* sur l'appareil reproducteur mâle, il serait intéressant de refaire la même étude avec des rats issus d'une autre race. (55)

6.4. Effets sur la reproduction.

6.4.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles.

Les feuilles de *Stevia rebaudiana* ont été utilisées par les Indiens du Paraguay sous forme de tisane en tant que contraceptif mâle. De plus Planas et Kuc (1968) ont administré à des rat 10 ml d'un extrait à 5 % dans l'eau de boisson et un effet contraceptif a été induit au bout de deux mois. Une toxicité directe vis à vis de l'appareil reproducteur mâle ne peut pas être exclue. (*in* 30, 55)

De même une étude, effectuée sur des rats mâles prépubaires, a montré que l'administration chronique (60 jours) d'un extrait aqueux de *Stevia rebaudiana* a entraîné une diminution du poids final des testicules, des vésicules séminales et épididymes. Ce traitement diminue aussi le taux plasmatique de testostérone. Ceci est probablement dû à une affinité des glucosides pour certains récepteurs aux androgènes. Ces résultats prouveraient une possible action du S*tevia* sur la fertilité des rats mâles. (44)

6.4.2. Stévioside.

Différentes études montrent que le stévioside n'induit ni d'effets toxiques ni d'effets tératogènes (études chez les rats et les hamsters) :

- Les hamsters ont été nourris avec du stévioside (500, 1000, 2500 mg/kg/jour, pureté 90 %) jusqu'à ce qu'ils se soient accouplés et aient donné trois portées. Les jeunes hamsters ont reçu du stévioside dans leur eau de boisson jusqu'à un mois et ont été ensuite nourris avec les mêmes doses que leurs parents. Fertilité, performance d'accouplement, grossesse , nombre de fœtus , croissance et fertilité des progénitures n'ont pas été affectés par le régime alimentaire. (55, 71)

- Dans une étude avec des rats Wistar, le stévioside est introduit dans l'alimentation à des doses équivalentes à 150, 750 et 3000 mg/kg/jour avec une pureté de l'ordre de 96 %. Les mâles

sont traités 60 jours avant et durant la période d'accouplement et les femelles 14 jours avant la période d'accouplement et 7 jours durant la gestation. Aucun effet sur la fertilité n'a été relevé, les performances d'accouplement n'ont pa sété affectées et les fœtus n'ont pas développés de malformation. (55)

- Dans une autre étude menée chez des rats Wistar femelles, le stévioside (pur à 95,6 %) est donné à la dose de 250, 500 et 1000 mg/kg/jour du 6ème au 15ème jour de gestation et elles ont été sacrifiées au 20ème jour. Le stévioside n'a causé aucune augmentation de l'incidence des malformations fœtales et aucun signe de toxicité n'a été relevé. (55, 66)

Au contraire, quand le stéviol, métabolite du stévioside, est administré aux hamsters (20 par groupe) du 6ème au 10ème jour de gestation à des doses de 500-1000 mg/kg/jour , on induit une toxicité. Le nombre de fœtus vivant par portée et le poids moyen des fœtus sont diminués. (55, 69)

Vu les études publiées, différents faits peuvent être établis :

- ✓ Le stéviol, mais pas le stévioside, semble induire une toxicité vis à vis du développement des fœtus à fortes doses.
- ✓ Le stévioside semble avoir des effets sur l'appareil reproducteur mâle.

Mais de nombreuses études ne montrent aucun effet néfaste. Des études supplémentaires sont donc souhaitables pour affirmer l'innocuité des préparations à base de stévioside.

6.5. Potentiel mutagène.

De nombreuses études sur le stévioside et les extraits bruts de *Stevia rebaudiana* sont disponibles et indiquent qu'il n'y a aucune action mutagène. On a notamment utilisé des souches de *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100, *Escherichia* coli ou *Bacillus subtilis* et on a recherché des modifications chromosomiques sur des lymphocytes humains. (25, 30, 55, 58)

Mais le stéviol montre une activité mutagène sur *S. typhimurium* TM677 conduisant à des mutations, de délétions au niveau des gènes et des aberrations chromosomiques. Ceci ne se produit qu'après une activation métabolique. Chez les mammifères, il a été montré que le métabolisme du stéviol conduit au 15-oxostéviol, un produit issu de l'oxydation du métabolite majeur du stéviol, le 15alpha-hydroxystéviol, qui serait responsable de l'action mutagène. Mais des études faites avec le 15-oxostéviol n'ont pas pu redémontrer cet effet. Depuis que des études ont montré que la transformation du stévioside en stéviol pourrait être effectuée par la microflore intestinale humaine, des études complémentaires sont nécessaires. (13, 25, 35, 36, 37, 55)

Une étude a été menée chez des rats, hamsters et souris dans le but d'évaluer les effets du stéviol au niveau chromosomique. Les métabolites du stéviol atteindraient la moelle osseuse et ils auraient un effet légèrement cytotoxique vis à vis des érythrocytes. (60)

6.6. Effets sur le métabolisme des glucides.

6.6.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles.

L'extrait de *Stevia rebaudiana*, les feuilles, les fleurs et les tiges sont utilisés sous forme de thé dans la médecine populaire au Paraguay comme remède pour les diabétiques. Les résultats des différentes études sont très contrastés :

- ✓ Dans une première étude, après l'administration orale d'un extrait aqueux de feuilles, une forte diminution de la glycémie a été obtenue au bout de 8 heures.
- ✓ Une autre étude, menée sur 4 semaines avec des feuilles séchées mélangées à la nourriture, conduit à une diminution significative du glycogène hépatique et de la glycémie.
- ✓ D'autres études n'ont montré aucun effet sur la glycémie et le glycogène hépatique. (30)

6.6.2. Stévioside.

Les effets du stévioside et du stéviol sur l'absorption intestinale du glucose ont été observés à partir du jéjunum du hamster. Le stévioside n'inhibe pas l'absorption du glucose alors qu'elle l'est par 1mM de stéviol (On a une diminution de l'accumulation du glucose dans le tissu périphérique de l'intestin). On note une altération de la morphologie de cellules responsables de l'absorption intestinale et une diminution du contenu de la muqueuse intestinale en ATP (Ceci est accompagné d'une diminution d'activité de la NADH cytochrome c réductase et de la cytochrome oxydase). (61, 63)

Une autre étude a pour objectif de déterminer l'effet du stévioside sur le métabolisme du glucose. L'augmentation de la glycémie pendant la perfusion de stévioside n'est pas due à une réduction du taux d'insuline mais probablement à l'effet du stévioside sur le transport du glucose à travers la cellule. (57)

Une dose unique de stévioside a été donnée à des rats à jeun depuis 24 heures, seul ou administré

avec du fructose. Dans ces conditions, une augmentation du glycogène hépatique a été relevée. Dans une autre étude, du stévioside a été administré à des rats dès le début de périodes de jeûne de 24 et 48 heures. Le taux de glycogène hépatique a augmenté. Le stévioside provoquerait une stimulation de la synthèse du glycogène hépatique dans des conditions de néoglucogenèse. Le stéviol ne montre aucun effet. (26)

Le stévioside est utilisé depuis de nombreuses années dans le traitement du diabète chez les Indiens au Paraguay et au Brésil. Les études ont montré que :

- ✓ Le stévioside et le stéviol stimulent la sécrétion d'insuline en agissant directement sur les cellules β du pancréas.
- ✓ Ces composés peuvent avoir un rôle potentiel en tant qu'agent anti-hyperglycémiant dans le traitement du diabète non insulinodépendant (DNID), dit de type II. (28)

6.7. Effets cardiovasculaires.

6.7.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles.

Une tisane préparée à partir de feuilles est administrée pendant 30 jours à 18 sujets humains de 20 à 40 ans et ayant une pression sanguine importante. On a noté un abaissement de la pression sanguine artérielle systolique et diastolique de 9,5 % et une discrète prolongation de la systole sur l'ECG. Une étude similaire induit les mêmes effets sur la pression artérielle mais au contraire un raccourcissement de la systole.(30)

Une étude menée par Melis (1996) (42) a montré que, quand on administre un extrait aqueux de feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* Bertoni par voie orale à des rats normaux Wistar, on note une hypotension au bout de 40 jours. Ceci est induit par une vasodilatation systémique.

L'extrait de *Stevia rebaudiana*, à des doses supérieures aux doses utilisées à des fins édulcorantes, est un agent vasodilatateur chez des rats mâles Wistar normo- et hypertensifs. (43)

6.7.2. Stévioside.

Chez le rat, le stévioside semble agir comme un vasodilatateur systémique typique entraînant une diminution de la pression artérielle moyenne et un abaissement de la résistance vasculaire rénale avec une diurèse et une natriurèse. Le vérapamil a tendance a augmenté les effets systémiques et rénaux du stévioside. Par contre si on administre du stévioside avec du CaCl2, on obtient une atténuation de la vasodilatation. Il est possible qu'il agisse en tant qu'antagoniste calcique comme le vérapamil. (9, 39, 41, 46, 47, 55)

On peut donc considérer que le stévioside possède un effet antihypertensif. Son effet a été évalué chez l'Homme souffrant d'hypertension. Le stévioside, administré par voie orale, est bien toléré (pas de modification des paramètres sanguins) et il peut être considéré comme une thérapie alternative ou supplémentaire pour ces patients. (10)

6.8. Effets rénaux.

6.8.1. Stevia rebaudiana Bertoni : plantes et feuilles.

L'administration d'extraits aqueux de *Stevia rebaudiana* Bertoni chez des rats normaux provoque au bout de 40 jours une diurèse et une natriurèse avec un taux de filtration glomérulaire constant et au bout de 60 jours une augmentation du flux plasmatique rénal. Cet extrait induit donc une vasodilatation rénale avec diurèse et natriurèse. (42)

Le stévioside est excrété par l'épithélium tubulaire rénal ; il induit une diurèse, une natriurèse et une baisse de la réabsorption tubulaire du glucose. (25, 40)

D'après une étude menée sur des rats mâles Wistar, l'extrait brut de *Stevia rebaudiana* Bertoni a une action préférentielle sur les cellules tubulaires proximales impliquées dans le transport du sel (Na+). (45)

6.8.2. Stévioside.

Le stévioside agit comme un agent vasodilatateur systémique provoquant chez les rats normo- et hypertensifs une diurèse et une natriurèse. Ceci est dû à une augmentation du flux plasmatique rénal chez les rats normaux (vasodilatation des artérioles afférentes et efférentes) et on note en plus une augmentation du taux de filtration glomérulaire chez les rats hypertensifs (autorégulation rénale). On remarque aussi une kaliurèse. Toutes ces modifications sont probablement dépendantes des prostaglandines (Les effets diurétiques, natriurétiques et kaliurétiques sont abolis par l'administration d'indométacine). (25, 41, 47)

Lors d'une étude de toxicité aiguë avec du stéviol, l'examen du rein du hamster a montré des dégénérescences des cellules tubulaires proximales. Ces altérations sont corrélées avec l'augmentation de la créatinémie et de urémie. D'après une étude récente, le stévioside ne porterait pas atteinte à la fonction tubulaire rénale chez l'Homme normal à des taux normaux.(29, 64)

6.9. Effet cariogène.

Le stévioside semble être un substrat moins apprécié par *Steptococcus mutans* et on aura une production d'acide moindre qu'avec le saccharose, le glucose ou le fructose. Ce qui suggère son utilisation dans des préparations orales comme édulcorant pour abaisser l'incidence des caries dentaires. Des études comparatives ont été effectuées avec d'autres édulcorants et les résultats ne permettent pas d'en choisir un préférentiellement. (30)

Le stévioside a été testé pour son pouvoir cariogène chez des rats colonisés par *Streptococcus sobrinus*. Les différents groupes ont été nourris avec du stévioside, du rebaudioside A et du saccharose . Au bout de cinq semaines, on a évalué le nombre de caries et on a constaté qu'il n'y avait aucune différence entre le groupe témoin et les groupes ayant absorbé le stévioside et le rebaudioside A. Le stévioside n'est donc pas cariogène. (14)

6.10. Effets sur le muscle lisse.

Le stévioside augmente visiblement la réponse contractile *in vitro* de iléon d'un cochon d'inde stimulé avec K+, Ca2+ ou de l'acétylcholine. Il a donc été postulé que le stévioside facilite probablement le transport des cations à travers la membrane. (30)

6.11. Effets sur la phosphorylation oxydative.

Le stéviol inhibe la translocation mitochondriale des nucléotides d'adénine. Mais les effets sur la phosphorylation oxydative sont discutés car les différentes études faites en laboratoire n'ont pas permis de mettre en évidence d'effets délétères. (25, 30)

7. Autres propriétés de *Stevia rebaudiana.*

7.1. Activité antimitotique.

Les effets d'un extrait aqueux de *Stevia rebaudiana* sur le cycle cellulaire d'*Allium cepa* au niveau des cellules de méristème sont étudiés. Aucune altération des mitoses ou de la distribution des cellules dans les différentes phases G1, S, G2 du cycle cellulaire n'a été observée. Seule une augmentation de la durée du cycle cellulaire a été notée. (40)

7.2. Activité bactéricide.

Des extraits aqueux ou alcooliques préparés à partir de feuilles ont montré une activité bactéricide vis à vis de plusieurs espèces de bactéries et plus particulièrement *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris*. (30)

Un extrait aqueux de *Stevia rebaudiana* Bertoni a montré une forte activité bactéricide vis à vis d'*Escherichia coli* entéro-hémorragique. Au contraire, cet extrait n'est pas actif sur les bifidobactéries ou les lactobacilles. Les principes actifs présents dans cet extrait sont bactéricides dans des conditions acides. (62)

7.3. Activité anti-virale.

Une étude a permis d'étudier les effets de *Stevia rebaudiana* sur l'activité d'un rotavirus (HRV). Il inhibe la réplication de HRV *in vitro* en bloquant la fixation du virus à la cellule infectée. Il se fixe à la fraction VP7 des récepteurs cellulaires par complémentarité stérique. (59)

7.4. Effets sur la croissance des plantes.

Les extraits avec le stévioside et le rebaudioside A ont montré des effets similaires à ceux de la gibbérelline sur l'activation de l'amylase dans les céréales et sur la croissance quand c'est appliqué à l'ensemble de la plante. Ces effets sont probablement liés aux similitudes structurales de la portion aglycone des molécules avec celle de la gibbérelline et au rôle possible du stévioside et de ses dérivés dans la synthèse de facteurs de croissance. Plusieurs brevets pour l'utilisation du stévioside et de ses dérivés comme régulateurs de croissance sont enregistrés au Japon. (24, 25, 30)

8. Utilisation du stévioside et de *Stevia rebaudiana* Bertoni comme agent édulcorant.

8.1. Généralités.

Ce sont les parties aériennes issues de la plante fraîche et les feuilles séchées et réduites en poudre qui sont utilisées. La plante séchée est produite en Europe, au Paraguay et au Japon par le biais de procédés traditionnels pour les cultures végétales. Elles sont séchées dans une atmosphère chaude (70°C) pendant 3 heures avec un taux d'humidité à 5-8 %. Dans ces conditions, le stévioside n'est pas décomposé. Le matériel séché peut être stocké dans le noir dans des containers étanches à l'air pendant 2 ans. (56)

Les feuilles séchées sont environ 30 à 45 fois plus sucrées que le saccharose mais elles sont très peu utilisées en Europe. On estime à environ 90 mg de poudre de feuilles séchées la quantité nécessaire pour édulcorer une tasse de thé ou de café. Elle peut être ajoutée au chocolat (1,2 g pour 120 g) et à la confiture (9 g pour 1 Kg de fruits). Les feuilles fraîches peuvent être utilisées pour édulcorer le vinaigre (6 à 9 g pour 1 litre) ou être ajoutées aux salades. En Europe, la consommation de feuilles fraîches ou moulues revendiquée par personne et par jour est 2,4 g de poudre sèche, soit 400 mg de stévioside mais en réalité une consommation journalière de 5 g est acceptable (résultats basés sur aucune étude de toxicité). (56)

8.2. Impact nutritionnel.

Les feuilles fraîches sont utilisées en très petites quantités et il est donc peu probable qu'elles remplacent d'autres végétaux de façon significative. La poudre sèche est destinée à remplacer le saccharose dans les boissons, confitures et confiseries pour réduire l'apport calorique. Elle peut

être utilisée par les diabétiques et les individus en surpoids mais aucune étude n'a été menée pour rechercher les effets physiologiques et pharmacologiques d'une telle substitution. De même aucune étude n'a montré les répercussions sur la biodisponibilité des macro- et microconstituants de l'alimentation normale. (56)

8.3. Utilisation dans le monde.

8.3.1. Au Paraguay.

Un mélange de feuilles, fleurs, branchettes séchées et moulues est utilisé à la dose de 5 g/jour sous forme de tisane depuis 45 ans chez des patients diabétiques pour réduire la glycémie avec une dose d'entretien de 1 g/jour. La tisane est préparée sous forme de décoction : la poudre est mélangée à l'eau et portée à ébullition pendant un court instant. (25, 30, 56)

De petites capsules contenant des feuilles séchées sont aussi utilisées pour dissiper la fatigue physique et émotionnelle (action tonique). On lui prête aussi une action stomachique. (30, 56)

8.3.2. Au Japon.

Stevia rebaudiana Bertoni a été introduit au début des années 70 à partir de plants provenant du Brésil et du Paraguay. Par le biais de nouvelles variétés, le rendement en hétérosides diterpéniques a été augmenté de 3 à 5 %. En 1992, 70 extraits étaient commercialisés pour édulcorer de nombreux aliments et des boissons non-alcoolisées. En 1987, on estimait qu'environ 1700 tonnes de feuilles étaient utilisées dans des produits alimentaires japonais. Des extraits de *Stevia rebaudiana* Bertoni à forte concentration en rebaudioside A et contenant de la glycyrrhizine sont disponibles. La consommation moyenne est estimée à 4 mg/kg/jour/personne. (25, 56)

8.3.3. En Chine.

D'importantes quantités de *Stevia rebaudiana* sont cultivées. La plus grande partie est destinée à l'exportation car l'usage local est limité à l'utilisation des feuilles séchées sous forme de tisane (pas d'estimation de la consommation). (56)

8.3.4. Au Brésil.

Les feuilles séchées sont utilisées pour préparer différents tisanes parfumés. (56)

8.3.5. Aux Etats-Unis.

Seuls les extraits de feuilles sont commercialisés en tant que suppléments diététiques (« dietary supplements ») mais les mêmes produits sont interdits en tant qu'édulcorants ou qu'additifs alimentaires. (56)

En Europe, la commercialisation de la plante *Stevia rebaudiana* Bertoni est retardée car :

- ✓ Elle semble provoquer des effets néfastes sur l'appareil reproducteur mâle alors que le stévioside en est dépourvu.
- ✓ Dans l'état actuel des connaissances, il est difficile de savoir si le stévioside est dégradé en stéviol par la flore intestinale.
- ✓ Le stévioside semble dépourvu d'effets secondaires alors que le stéviol serait la cause de malformations fœtales, d'une toxicité rénale.

D'autre part, on note des effets bénéfiques sur l'hypertension artérielle, la glycémie. Il serait intéressant d'approfondir les recherches dans ces domaines et de voir si des applications concrètes sont envisageables. En effet les études de toxicité aiguë et subchronique se sont avérées négatives.

Cette plante est employée à grande échelle au Japon et de façon plus réduite dans le reste du monde sans que d'effets secondaires ne soient répertoriés. Mais différentes études scientifiques publiées ont mis en avant des effets délétères. Il est, donc, plus sage d'invoquer des principes de précautions pour repousser sa mise sur le marché. D'autres études sont nécessaires avec une meilleure description des extraits utilisés et des conditions d'expérimentation.

3ème Partie:
Autres édulcorants d'origine naturelle

La flore naturelle constitue un important réservoir de nouvelles molécules pour l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire. On y trouve, notamment, des substances à propriétés édulcorantes comme la thaumatine, la monelline, la miraculine, la glycyrrhizine et la phyllodulcine. Il existe aussi des édulcorants semi-synthétiques comme la néohespéridine dihydrochalcone.

1. Les protéines édulcorantes.

1.1. La thaumatine.

La thaumatine est un mélange protéique isolé des fruits d'une Marantaceae africaine, *Thaumatococcus danielli* Benth. (5, 6)

1.1.1. La plante.

T. danielli est une espèce à

- ✓ Larges feuilles longuement pétiolées,
- ✓ Epis de fleurs roses pourprées,
- ✓ Fruit charnu, trigonal, rouge brillant à maturité, à 1-3 graines noires entourées d'un arille charnu. (5, 6)

L'espèce est abondante dans de nombreux pays d'Afrique occidentale : Ghana, Côte d'Ivoire, Togo, Sierra Leone. La douceur de ses arilles a été décrite dès le milieu du XIXe siècle : elle est due à des protéines. (5, 6)

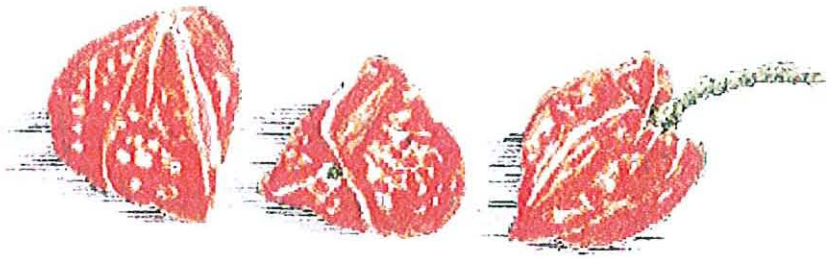


Figure13 : Fruits de *Thaumatococcus danielli* Benth. (http://www.daniscosugar.com, site consulté le 31/03/01)

1.1.2. Composition.

Les fruits congelés sont soumis à une extraction aqueuse et la fraction protéique est séparée par des techniques physiques comme l'ultrafiltration. L'extrait contient deux protéines majoritaires (thaumatines I et II) comptant chacune 207 acides aminés (17 acides aminés différents) et ne différant entre elles que sur cinq positions ; leur structure comporte huit ponts disulfure. (5, 6)

Leur masse moléculaire est voisine de 21 000 et elles diffèrent essentiellement par leur charge ionique, ce qui permet leur séparation. Mais les protéines séparées sont individuellement moins sucrées et moins stables que leur mélange. (21)

La thaumatine est très soluble dans l'eau et soluble dans les alcools dilués. La stabilité est maximale à pH 2,7-3 (le goût sucré devient acide à pH<2) et le pouvoir sucrant ne disparaît pas par chauffage. Les solutions sont pasteurisables mais un traitement prolongé (stérilisation) fait disparaître le goût sucré. (5, 6)

1.1.3. Propriétés.

La thaumatine est un édulcorant puissant : elle aurait un pouvoir sucrant équivalent à 3000 fois celui d'une solution de sucre à 8 %. (21)

La sensation sucrée induite est retardée dans le temps et persiste 15 à 20 minutes (même une heure à forte concentration). On remarque aussi qu'elle renforce le pouvoir sucrant des sucres naturels et qu'elle exalte les arômes à faible dose. (5, 6, 72)

1.1.4. Toxicité.

Elle apparaît comme faible. La DL 50 par voie orale chez le rat est d'environ 20g/kg. Il n'a été rapporté aucun effet mutagène ou tératogène. Le pouvoir allergisant de ces protéines paraît voisin de celui de l'ovalbumine. (21)
La thaumatine est donc considérée comme non toxique. (6)

1.1.5. Intérêt.

Initialement commercialisée aux Etats-Unis et au Japon (Talin®), la thaumatine est inscrite sur la liste des additifs autorisés dans l'Union européenne (E957). Non cariogène, elle est très utilisée dans des produits de type gomme à mâcher, rafraîchisseurs d'haleine ou produits pharmaceutiques. (6, 20)

Mais de nombreux travaux visant à mettre au point des procédés de production ne faisant pas appel à la plante (organismes transgéniques tels que *Aspergillus niger* var. awamori, *Penicillium roqueforti ou Saccharomyces cerevisiae*) n'ont pas permis d'obtenir des rendements suffisants. (6, 18, 19, 20, 72)

1.2. La monelline.

Dioscoreophyllum cuminsii appartient à la famille des Menispermaceae. C'est une famille appartenant à la classe des Dicotylédones, poussant dans les régions chaudes d'Afrique occidentale et tropicale. Sa distribution géographique est fort grande et elle abonde à Madagascar. (5, 6, 49)

1.2.1. La plante.

D. cuminsii est une plante grimpante ou liane à feuilles cordiformes de la forêt ombrophile humide ; elle porte des grappes denses pouvant compter une centaine de petites baies rouges, ovales, de la taille d'un petit grain de raisin. Ses fruits sont aussi appelés « baies du Nigeria ». (5, 49)

Si la graine est amère (diterpènes), le mucilage blanchâtre qui l'entoure est particulièrement « sucrant ». Ces baies consommées par les Africains possèdent une saveur sucrée intense, pure, sans arrière-goût amer. (5, 6, 14)

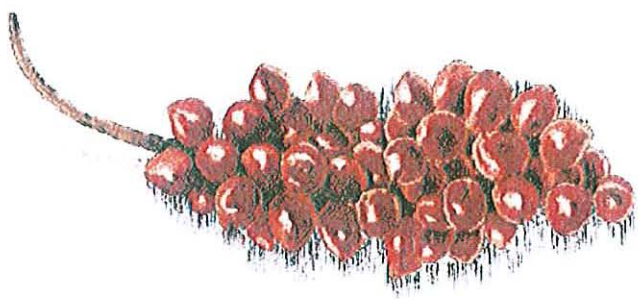


Figure 14 : Baies du Nigeria. (http://www.daniscosugar.com, site consulté le 31/03/01)

1.2.2. Composition.

On a pu isoler, par extraction aqueuse, suivie d'une précipitation par l'alcool puis d'une ultrafiltration, une protéine de poids moléculaire se situant vers 10 000. Elle se nomme monelline pour les uns ou unileverine pour les autres. Elle est formée de deux chaînes comportant respectivement 44 et 50 acides aminés, sans radical annexe hydrocarboné. (5, 6, 49)

1.2.3. Propriétés.

C'est INGLETT qui le premier, en 1969, s'est intéressé à *D. cuminsii*. Il lui a donné le nom de « Serendipity Berry » ; ce qui signifie « baie de la bonne surprise » car la qualité et la puissance de la saveur sucrée de ce fruit étaient inattendues. La monelline est 2 000 fois plus sucrante que le saccharose mais elle est instable aux pH extrêmes et ne résiste pas au chauffage, et encore moins à la combinaison des deux (elle est détruite à 50 °C à pH 3,2). (5, 6, 49)

La monelline, comme les baies, se conserve mal à la température ambiante et doit être conservée à moins de 20 °C. (21)

1.2.4. Toxicité.

Bien que les baies soient consommées couramment par les populations indigènes sans qu'aucun signe de toxicité n'ait été noté, l'extrême fragilité de la molécule et le manque de données toxicologique limitent d'éventuelles applications industrielles et alimentaires. (5, 6, 21, 49)

1.3. La miraculine.

Cette protéine peut être extraite du fruit d'un arbuste de l'Ouest africain, appartenant à la famille des Sapotaceae, *Synsepalum dulcificum* Dan. Son représentant le plus connu est le sapotillier, dont le fruit, la sapotille, de saveur exquise, contiendrait de la glycyrrhizine. (5, 6, 49)

Le fruit miracle a reçu ce nom en raison de ses propriétés modificatrices du goût. Les populations ouest africaines emploient souvent ces fruits pour améliorer le goût de leurs pains de maïs et pour rendre sucrés leur vin de palme et leurs boissons fermentées. (49)

1.3.1. La plante.

S. dulcificum est un arbuste de 2 à 4 mètres de haut, qui pousse dans la zone tropicale de l'Afrique Occidentale, du Ghana au Congo. Il porte aussi le nom de *Richardella dulcifica.* Son feuillage est abondant et ses baies, rouges, ont reçu le nom de « fruit miracle ». Elles sont ellipsoïdales, de petites taille (environ 2 cm) et leur pulpe, mince, enveloppe un volumineux noyau. Ce fruit est très fragile, très fermentescible, et pose des problèmes de récolte et de transport. (49)

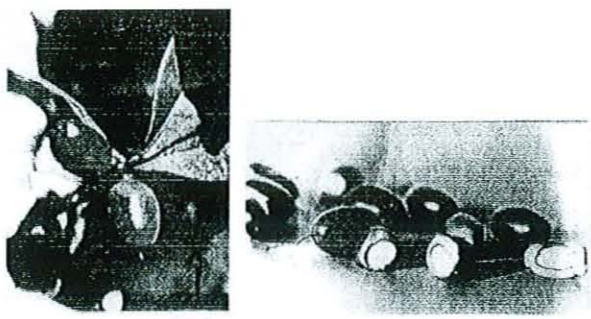


Figure 15 : *Syncepalum dulcificum* Dan. (49)

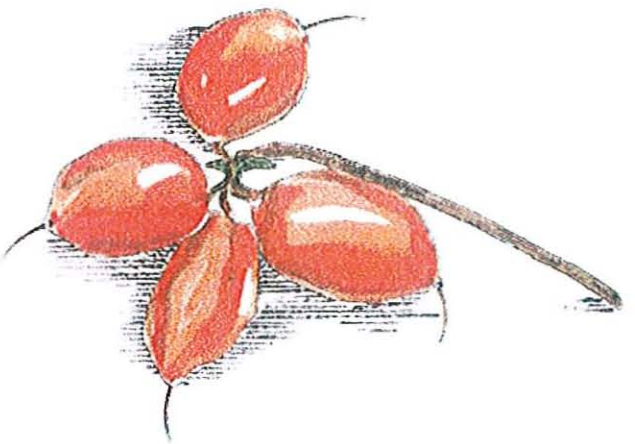


Figure16 : « Fruit miracle ». (http://www.daniscosugar.com, site consulté le 31/03/01)

1.3.2. Composition.

La miraculine est une glycoprotéine, d'un poids moléculaire de l'ordre de 40 000, constituée de 473 acides aminés (16 acides aminés mais pas de tryptophane) et contient entre 6 et 7 % d'arabinose et de xylose. (5, 6, 49)

1.3.3. Propriétés.

Après environ deux siècles et demi d'oubli (la première mention de ce fruit « qui pourrait masquer le goût amer des médicaments » remonte à 1725), le fruit « miracle » a retenu l'attention pour ses très curieuses propriétés : a peu près insipide en lui-même, il transforme la saveur acide en saveur sucrée et modifie la perception de nombreuses flaveurs (sauf le goût salé). Cet effet convertisseur est de plusieurs heures et induit un risque de confusion. (5, 6, 49)

En 1969, KURIHARA et BEIDLER ont émis une hypothèse sur le mode d'action de cette glycoprotéine :

- ✓ Cette protéine ne pénétrerait pas dans les cellules sensorielles mais se fixerait à la surface de la membrane des récepteurs gustatifs.
- ✓ Sa configuration comporterait deux sites allostériques, l'un permettant la liaison avec la

récepteur de la saveur sucrée.

- ✓ En présence d'acide, la membrane réceptrice changerait sa configuration et il en résulterait un « ajustement » de la partie « sucre » de la protéine avec le site récepteur de la sensation sucrée. (49)

La miraculine est très fragile : elle est détruite par la chaleur, la trypsine, les solvants organiques. Son activité diminue pour un pH > 12 ou < 2.5. Elle est insoluble dans l'eau. Pour la conserver, il est nécessaire de recourir à un stockage en congélateur. (49)

1.3.4. Toxicité.

Sa commercialisation a été rapidement abandonnée car ses propriétés modificatrices du goût ont fait craindre un risque d'absorption massive de produits toxiques (notamment les produits ménagers) rendus par elle de goût agréable pour les enfants. (49)

2. Les dérivés semi-synthétiques de flavonosides naturels, les dihydrochalcones.

Les *Citrus,* appartenant à la famille des Rutaceae, sont des arbres d'origine orientale dont de très nombreuses espèces, variétés et hybrides sont cultivées pour leurs fruits à endocarpe comestible, les agrumes. Très utilisés pour leurs huiles essentielles, ils sont aussi source de pectine et de flavonoïdes. (6)

Ce sont les dérivés semi-synthétiques de ces flavonoïdes naturels, dépourvus de goût ou amers présents dans l'orange de Séville (*Citrus aurantiacum*), le pamplemousse (C*itrus paradisi*), l'orange douce (*Citrus sinensis)* et le citron (*Citrus lemon*) qui sont utilisés. (21)

HOROWITZ et GENTILI ont montré que les dihydrochalcones ont un pouvoir sucrant extraordinairement élevé. (21, 49)

2.1. Origine.

Les citroflavonoïdes sont des hétérosides de flavanones :

- ✓ Le naringoside (ou naringine) qui est le principale flavonoïde du pamplemousse.
- ✓ Le néohespéridoside (ou néohespéridine) présent dans l'orange de Séville. (6)

Structuralement, ils impliquent :

- ✓ Deux rhamnoglucosides : le rutinose et l'hespéridose.
- ✓ Deux génines : 4', 5, 7-trisubstitué, la naringénine et 3', 4', 5, 7-tétrasubstitué, l'hespérétol.
- ✓ Une liaison par l'intermédiaire de leur hydroxyle en C-7. (6)

Les dihydrochalcones sont les dérivés hydrolysés et hydrogénés de ces flavonoïdes naturels, très abondant dans le péricarpe des fruits. (6)

Les citroflavonoïdes sont extraits par l'eau des péricarpes et des pulpes, et isolés par certains procédés (passage à l'état de dérivés calciques ou magnésiens, adsorption sur résine XAD, etc.). (6)

KRBECHEK et INGLETT ont mis au point des procédés permettant de passer de la naringine (facile à obtenir commercialement) à la néohespéridine, qui existe naturellement dans l'orange de Séville, mais en faible quantité, sans qu'un approvisionnement soit envisageable. (49)

Une plante hybride élaborée à partir de *Citrus paradisi* et de *Citrus depressa* a été produite et ses fruits présentent deux avantages :

- ✓ La quantité de néohespéridine présente dans le fruit de l'hybride est similaire à celle du fruit non mûr de *Citrus aurantiacum* mais la naringine s'y trouve en plus faible concentration. Le ratio néohespéridine/naringine est donc plus grand et le procédé de

purification de la néohespéridine est moins coûteux.

- ✓ Contrairement au fruit mûr de *Citrus aurantiacum*, le fruit mûr de l'hybride accumule une quantité importante de néohespéridine avec un ratio néohespéridine/naringine élevé. On peut donc utiliser ce fruit quel que soit sa maturité. (16)

La néohespéridine dihydrochalcone est le dérivé le plus intéressant de ce groupe pour son pouvoir sucrant exceptionnel. La structure responsable de la saveur sucrée est entièrement située dans le noyau aromatique. (49)

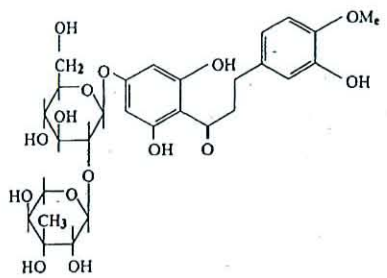


Figure 17 : Néhoespéridine dihydrochalcone. (49)

2.2. Propriétés.

Chaque dihydrochalcone a un pouvoir sucrant spécifique :

- ✓ Celui de la naringine dihydrochalcone se situe vers 110.
- ✓ Celui de la néohespéridine dihydrochalcone se situe vers 1 000. (49)

La saveur sucrée des dihydrochalcones est associée à une sensation de fraîcheur comparable à celle de la menthe et persiste plus longtemps que pour le saccharose (effet de « lingering » souvent retrouvé chez les édulcorants à saveur sucrée très intense). Ces deux particularités posent des problèmes d'incompatibilité d'arôme. Ainsi des mélanges complexes d'édulcorants ont été mis en place. Par exemple le mélange NéoDHC/saccharine/cyclamate (25 %, 64 %, 11 %) génère une saveur particulièrement agréable. (3, 4, 49)

Les dihydrochalcones sont relativement stables à pH neutre (6-7) et à des températures comprises entre 70 et 100°C, ce qui leur permet de supporter les conditions de stockage et de conservation des aliments (procédés UHT et de pasteurisation). Au contraire pour un pH abaissé au-dessous de 2-2,5, on note une dégradation au bout de deux mois environ et une diminution du pouvoir sucrant. L'effet combiné de la chaleur et de l'abaissement du pH accélère cette dégradation. (3, 7, 48, 49)

2.3. Toxicité.

Les études de toxicité chronique (2 ans), par voie orale, réalisées par GUMBMANN et coll. chez le rat et le chien Beagle (aucune toxicité n'est observée avec des doses de 0,2 et 1 g/kg/j de NéoDHC) ont montré une toxicité très faible. De même les études de toxicité subaiguë réalisées chez le rat et les études de mutagénicité se sont avérées négatives. (*in* 21)

2.4. Intérêt.

Ayant une toxicité nulle, la néohespéridine dihydrochalcone est inscrite sur la liste des additifs autorisés de l'Union européenne (E959). (73)

3. Un saponoside : la glycyrrhizine.

La réglisse est une plante méditerranéenne connue depuis l'antiquité et appréciée des Egyptiens, des Grecs et des Romains. C'est une drogue utilisée pour son pouvoir sucrant aussi bien que pour ses vertus médicinales. Elle est traditionnellement présentée comme antitussive et l'extrait de réglisse exerce une activité anti-ulcéreuse gastrique. (5, 6, 49)

Ethymologiquement, réglisse vient du grec *Glycyrrhiza*, qui signifie racine sucrée. L'espèce la plus connue est *Glycyrrhiza glabra.* On extrait la glycyrrhizine du rhizome; c'est une substance édulcorante relativement puissante. (49)

3.1. La plante.

La réglisse appartient à la famille des Fabaceae. Elle pousse en buissons pouvant atteindre 1,50 m de haut. Il s'agit d'une plante vivace, à tiges dressées, striées, garnies de feuilles alternes, composées, imparipennées à 7-17 folioles entières. Les inflorescences, des grappes dressées, sont composées de fleurs de teinte lilas plus ou moins foncé. Le fruit est une petite gousse aplatie (1,5-2,5 cm), étranglée entre les graines. (5, 6, 49)

La racine et les stolons séchés, entiers ou coupés, mondés ou non de la réglisse (Pharmacopée européenne, 3ème édition) connaissent actuellement de nombreuses utilisations, principalement en pharmacie et dans l'industrie agroalimentaire. Ils possèdent une odeur et une saveur typique. (6)

Figure18 : *Glycyrrhiza glabra* L. (6)

3.2. Composition.

La glycyrrhizine est un saponoside à génine triterpénique ; cette molécule est un monodesmoside (formation de la liaison osidique entre la fonction réductrice de l'oligoside et l'hydroxyle présent en position C-3) qui, par hydrolyse, libère deux molécules d'acide D-glucuronique et une molécule d'acide glycyrrhétique. Ce dernier est un acide carboxylique à squelette oléanane caractérisé par la présence d'une cétone α,β-insaturée (11-oxo Δ12,13). (5, 6)

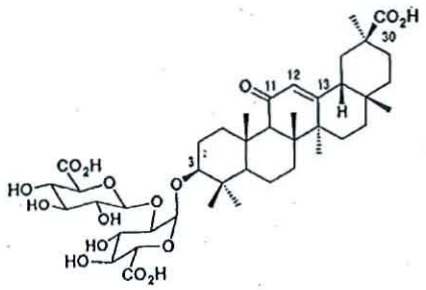


Figure 19 : glycyrrhizine. (6)

3.3. Propriétés.

Le pouvoir sucrant de la glycyrrhizine est de l'ordre de 50 fois celui du saccharose. Cette substance est également un bon exhausteur de goût. Elle a le pouvoir de renforcer beaucoup la saveur sucrée du sucre. Sa saveur sucrée n'est pas parfaite car elle est parasitée par une arrière saveur de réglisse, importante et persistante, qui constitue un handicap sérieux pour son emploi à l'état pur comme agent édulcorant. (49)

De plus, la glycyrrhizine est active sur de nombreux virus (*in vitro* et sur certains animaux). Elle est aussi faiblement antibactérienne, anti-hépatotoxique, immunostimulante et cicatrisante. Dénuée d'effets tératogènes, mutagènes ou cancérogènes, elle s'oppose à l'action d'agents mutagènes comme le benzo[a]pyrène. (6)

En effet, au Japon, la glycyrrhizine est utilisée pour traiter les patients atteints d'hépatite C chronique, notamment ceux présentant une résistance à la thérapie antivirale avec l'interféron α. Elle provoque la diminution du taux d'ALAT (alanine aminotransférase), une amélioration de l'état des tissus hépatiques mais n'a aucun effet sur le taux d'ARN viral. (67, 68)

3.4. Emplois.

- L'acide glycyrrhétique (acide glycyrrhétinique ou DCI : enoxolone) est traditionnellement utilisé par voie locale pour ses propriétés anti-inflammatoires : traitement symptomatique des manifestations inflammatoires modérées non surinfectées (eczéma atopique et dermite séborrhéique du visage, érythème solaire, érythème fessier du nouveau-né, prurit vulvaire, piqûres d'insectes). Il entre dans la formulation d'associations destinées à la voie locale et utilisées en cas d'irritations cutanées, de parodontopathies, d'inflammations de la cavité buccale et de la gorge (associé au formaldéhyde, au lysosyme, au biclotymol, à la propanocaïne ou encore à la lidocaïne). (5, 6)

- La racine de réglisse est traditionnellement utilisée pour la préparation d'extraits utilisés en pharmacie comme aromatisant et pour leur activité propre : les spécialités qui en renferment sont encore parfois proposées dans le traitement symptomatique des épigastralgies liées aux ulcères gastriques et duodénaux et aux gastrites. (5, 6)

- La drogue peut être employée en nature : c'est souvent un aromatisant dans les mélanges pour infusion et, dans les tisanes à visée laxative, elle est présentée comme antispasmodique. Les indications que peuvent revendiquer les phytomédicaments à base de réglisse sont les suivantes : traditionnellement utilisé dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que le ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulence ; traditionnellement utilisé dans le traitement symptomatique de la toux et, par voie locale, comme antalgique dans les affections de la cavité buccale et/ou du pharynx. (5, 6, 38)

3.5. Toxicité.

La consommation abusive de réglisse ou de produits à base de réglisse peut entraîner l'apparition d'œdèmes, d'hypokaliémie et d'hypertension, de troubles de la contractilité musculaire, d'anomalies cardiaques. Ces symptômes, résultant d'une action sur le système rénine-angiotensine-aldostérone, rappellent ceux que l'on observe en cas d'hyperaldostéronisme (syndrome de Conn). Ils sont liés à une activité de type minéralo-corticoïde dont le responsable est l'acide glycyrrhétique : rétention sodée, chlorurée et hydrique, excrétion potassique accrue, diminution de la diurèse. Cette action est due à l'inhibition compétitive des enzymes impliquées dans la dégradation des stéroïdes : les récepteurs aux minéralo-corticoïdes sont stimulés par le cortisol qui s'accumule du fait de l'inhibition de la 11β-hydroxydéshydrogénase par l'acide glycyrrhétique. (5, 6)

3.6. Intérêt.

La réglisse est largement employée dans les industries du secteur agroalimentaire qui apprécient son pouvoir sucrant et son rôle de renforçateur de goût. Elle est notamment présente dans les boissons : apéritifs anisés avec ou sans alcool, sodas, bières brunes, etc. Il est recommandé que l'étiquetage de ces produits mette en garde contre les abus (dose maximale recommandée : 125 mg/j de glycyrrhizine et 100 mg/j pour la Commission E en Allemagne). Un gros emploi est également fait en confiserie et dans l'industrie des tabacs : 90 % de la réglisse importée par les Etats-Unis seraient utilisés par celle-ci. (6)

4. La phyllodulcine

La phyllodulcine a été isolée en 1916 par ASAHINA et UENO, à partir d'*Hydrangea thunbergii* qui appartient à la famille des Hydrangeaceae. (49)

4.1. La plante.

Cette molécule se trouve dans plusieurs variétés d'*Hydrangea* (*macrophylla, thunbergii, serrata*), plantes assez courantes en Orient. (49)

4.2. Composition.

On extrait le principe édulcorant des feuilles en faisant agir des solvants organiques comme l'éthanol ou le benzène. (49)

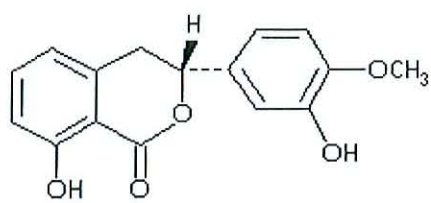


Figure 20 : phyllodulcine. (25)

4.3. Propriétés.

Les feuilles séchées de ces plantes sont depuis longtemps utilisées, par les Japonais, pour édulcorer leur thé. La saveur de la phyllodulcine serait assez voisine de celle des dihydrochalcones selon HOROWITZ et GENTILI. Sa saveur n'apparaît pas immédiatement et persiste en bouche (effet

lingering). Cette saveur sucrée n'est pas pure, elle est associée à une après-saveur de type réglisse. (49)

La phyllodulcine pure est peu soluble dans l'eau. Se dissolvant lentement, elle produit une saveur sucrée d'intensité faible et modérée. Son pouvoir sucrant varie beaucoup. Pour une concentration correspondant à une solution de 3 % de saccharose, il est établi à 400 environ. (49)

Ces édulcorants peuvent donc être classés en trois groupes :

- ✓ Les intenses qui ont un pouvoir sucrant 1000 à 3000 fois plus important que celui du saccharose : thaumatine, monelline et néohespéridine dihydrochalcone.
- ✓ Les modérés qui ont un pouvoir sucrant 50 à 400 fois plus sucrant que celui du saccharose : glycyrrhizine et phyllodulcine.
- ✓ La miraculine qui n'est pas un édulcorant à part entière mais un modificateur de goût.

Leur saveur sucrée est souvent associée à une persistance du goût pendant 10 à 20 minutes, un effet de « lingering », un arrière-goût et un délai d'apparition.

Seuls la thaumatine et la néohespéridine dihydrochalcone sont autorisées en Europe et leur emploi est strictement réglementé. Les conditions d'utilisation de la glycyrrhizine sont fixées par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé), anciennement Agence du Médicament.

4ème Partie: Législation

Actuellement, ce sont les dispositions de la Directive européenne 94/35/CE concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires qui s'appliquent. Cette Directive est transposée en droit français au titre II de l'Arrêté du 2 octobre 1997 relatif aux additifs pouvant être employés dans la fabrication des denrées alimentaires ; dans cet Arrêté, les édulcorants autorisés sont listés en annexe II. Le stévioside issu de *Stevia rebaudiana*, n'est pas autorisé en tant qu'édulcorant au sens des textes susvisés. En effet, dans un avis du 17 juin 1999, le SCF (Scientific Commitee on Food) a réitéré que le stévioside n'est pas acceptable en tant qu'édulcorant. (55, 73, 75)

Par ailleurs, la plante *Stevia rebaudiana* (feuilles séchées) a été examinée au titre du règlement (CE) n° 258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients. Ce règlement s'applique en effet, aux aliments et ingrédients ayant fait l'objet jusqu'à présent d'une consommation négligeable dans la Communauté européenne. (78)

1. Cas des édulcorants autorisés.

Dans ce chapitre, seuls les édulcorants d'origine naturelle (thaumatine et néohespéridine dihydrohalcone) autorisés par l'Arrêté du 2 octobre 1997 sont pris en compte.

1.1. Thaumatine et néohespéridine dihydrochalcone.

- ✓ Par définition, les édulcorants sont des additifs alimentaires utilisés pour donner une saveur sucrée aux denrées alimentaires. Les denrées alimentaires, ayant un pouvoir édulcorant ne sont pas considérées comme édulcorants. (73)

- ✓ L'emploi d'édulcorants est interdit dans les aliments destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge, y compris les aliments pour les nourrissons et les enfants en bas âge qui ne sont pas en bonne santé. (73)

- ✓ La présence d'un édulcorant dans une denrée alimentaire est autorisée :
  - ❖ S'il s'agit d'une denrée alimentaire composée, sans sucres ajoutés, ou à valeur énergétique réduite, de denrées composées diététiques destinées à un régime hypocalorique ou de denrées composées à durée de conservation prolongée, autres que celles destinées aux nourrissons et aux enfants en bas âge, pour autant que cet édulcorant soit autorisé dans l'un des ingrédients qui constituent la denrée alimentaire composée.
  - ❖ Si cette denrée alimentaire est destinée uniquement à la préparation d'une denrée alimentaire composée conforme à l'arrêté du 2 octobre 1997. (73)

- ✓ La dénomination de vente des édulcorants de table doit comporter la mention « édulcorant de table à base de… » suivie du ou des noms des substances édulcorantes entrant dans leur composition. (73)

- ✓ L'annexe II de l'arrêté du 2 octobre 1997 comporte la liste des édulcorants autorisés :
  - ❖ Ils doivent aussi répondre aux spécifications fixées en annexe VI-B pour pouvoir être mis sur le marché en vue de :
    - De leur vente au consommateur final.
    - De leur emploi pour la fabrication de denrées alimentaires. Dans ce cas, les édulcorants ne peuvent être employés que pour la fabrication des denrées alimentaires énumérées à l'annexe II et des denrées alimentaires correspondantes destinées à une alimentation particulière au sens du décret du 29 août 1991, relatif aux aliments destinés à une alimentation particulière, dans les conditions qui y sont fixées.
  - ❖ Ces expressions figurent à l'annexe II :
    - « Sans sucres ajoutés » signifie sans aucune adjonction de mono- ou de disaccharides, ni de quelque denrée que ce soit, utilisée pour son pouvoir édulcorant.
    - « A valeur énergétique réduite » signifie à valeur énergétique réduite d'au moins 30 % par rapport à la denrée d'origine ou à un produit similaire.
  - ❖ Les doses maximales d'emploi indiquées à l'annexe II se rapportent aux denrées alimentaires prêtes à être consommées, préparées selon le mode d'emploi. (73)

Sur le tableau II, figurent les doses maximales d'emploi de la thaumatine dans les denrées alimentaires autorisées.

Sur le tableau III, figurent les doses maximales d' emploi de la néohespéridine dihydrochalcone dans les denrées alimentaires autorisées.

DENREES ALIMENTAIRES	DOSES MAXIMALES D'EMPLOI
Confiseries	
- confiseries sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- confiseries à base de cacao ou de fruits secs à valeur énergétique réduite, ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- gommes à mâcher sans sucres ajoutés	50 mg/kg
Autres produits	
- glaces de consommation, à valeur énergétique réduite, ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- compléments alimentaires à base de vitamines et/ou éléments minéraux sous forme de sirop ou à mâcher	400 mg/kg

Tableau II : Denrées alimentaires pour lesquelles l'usage de la thaumatine (E957) est autorisé. (73)

DENREES ALIMENTAIRES	DOSES MAXIMALES D'EMPLOI
Boissons non alcoolisées	
- boissons aromatisées à base d'eau à valeur énergétique réduite, ou sans sucres ajoutés	30 mg/l
- boissons à base de lait et produits dérivés à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	50 mg/l
- boissons à base de jus de fruits à valeur énergétique réduite, ou sans sucres ajoutés	30 mg/l
Desserts et produits similaires	
- desserts aromatisés à base d'eau à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- préparations à base de lait et produits dérivés, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- desserts à base de fruits, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- desserts à base d'œufs, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- desserts à base de céréales, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- desserts à base de matières grasses, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- glaces de consommation, à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- cornets et gaufrettes sans sucres ajoutés pour glace	50 mg/kg
- 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	50 mg/kg
- Amuse-gueule salés et secs à base d'amidon ou de noix et noisettes, préemballés et contenant certains arômes	50 mg/kg

Tableau III : Denrées alimentaires pour lesquelles l'usage de la néohespéridine dihydrochalcone (E959) est autorisé. (73)

DENREES ALIMENTAIRES	DOSES MAXIMALES D'EMPLOI
Confiseries	
- confiseries sans sucres ajoutés	100 mg/kg
- confiseries à base de cacao ou de fruits secs à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	100 mg/kg
- confiseries à base d'amidon à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	150 mg/kg
- micro-confiseries pour rafraîchir l'haleine sans sucres ajoutés	400 mg/kg
- pâtes à tartiner à base de cacao, de lait, de fruits secs ou de graisses à valeur énergétique réduite ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- gommes à mâcher sans sucres ajoutés	400 mg/kg
Autres produits	
- cidre et poiré	20 mg/l
- bières sans alcool ou ayant une teneur en alcool ne dépassant 1,2 % vol	10 mg/l
- « bière de table/*Tafelbier*/*Table Beer* » (contenant moins de 6 % de moût primitif) sauf « *Obergäriges Einfachbier* »	10 mg/l
- bières ayant une acidité minimale de 30 milli-équivalents exprimés en NaOH	10 mg/l
- bières brunes du type *oud bruin*	10 mg/l
- bière à valeur énergétique réduite	10 mg/l
- boissons constituées d'un mélange de bière, de cidre, de poiré, de spiritueux ou de vin et de boissons non alcoolisées	30 mg/l
- boissons spiritueuses avec une teneur en alcool de moins de 15 % en volume	30 mg/l
- fruits en boîte ou en bocal, à valeur énergétique réduite, ou sans sucres ajoutés	50 mg/kg
- confitures, gelées et marmelades à valeur énergétique réduite	50 mg/kg
- conserves de fruits et légumes aigres-douces	100 mg/kg
- préparations de fruits et légumes à valeur énergétique réduite	50 mg/kg

Tableau III (suite): Denrées alimentaires pour lesquelles l'usage de la néohespéridine dihydrochalcone (E959) est autorisé. (73)

DENREES ALIMENTAIRES	DOSES MAXIMALES D'EMPLOI
Autres produits (Suite)	
- conserves et semi-conserves aigres-douces de poissons et marinades de poissons, crustacés et mollusques	30 mg/kg
- sauces	50 mg/kg
- moutarde	50 mg/kg
- potage à valeur énergétique réduite	50 mg/l
- *Feinkostsalat*	50 mg/kg
- produits de boulangerie fine destinés à une alimentation particulière	150 mg/kg
- préparations complètes de régime contre la prise de poids destinées à remplacer un repas ou le régime alimentaire d'une journée	100 mg/kg
- préparations complètes et apports nutritionnels à prendre sous surveillance médicale	100 mg/kg
- compléments alimentaires liquides	50 mg/kg
- compléments alimentaires solides	100 mg/kg
- compléments alimentaires à base de vitamines et/ou éléments minéraux sous forme de sirop ou à mâcher	400 mg/kg

Tableau III (suite) : Denrées alimentaires pour lesquelles l'usage de la néohespéridine dihydrochalcone (E959) est autorisé. (73)

1.2. Glycyrrhizine

N'étant pas considérée comme un édulcorant à part entière, la glycyrrhizine issue de la réglisse suit les dispositions fixées par la Pharmacopée Européenne (3ème édition), la Pharmacopée Française (Xème édition) et par l'AFSSAPS, anciennement Agence du Médicament. (12, 38, 51)

La Note Explicative de 1998 de l'Agence du Médicament précise en outre les précautions d'emploi :

- ✓ « Ne pas utiliser en cas d'hypertension sauf avis médical.
- ✓ Ne pas associer à un traitement corticoïde.
- ✓ Doses maximales : - infusion : 8 g de racines par 24heures
  -extrait : 3 mg/Kg de glycyrrhizine par 24 heures
  -poudre : 5 g par 24 heures.
- ✓ Tenir compte d'ingestion simultanée de réglisse (boisson, confiserie). » (6, 38)

En Allemagne, la Commission E souligne que des essais cliniques ont démontré l'effet cicatrisant de la glycyrrhizine et de l'acide glycyrrhétique sur l'ulcère gastrique et que les actions sécrétolylique et expectorante sont démontrées chez l'animal. Elle précise ensuite les doses journalières recommandées : 5-15 g de drogue, soit 200-600 mg de glycyrrhizine ; suc : 0,5-3 g selon l'indication. Les usages (faciliter la dissolution et l'élimination des sécrétions bronchiques, adjuvant au traitement de la gastrite chronique), les contre-indications (hépatite, cirrhose, hypertension, hypokaliémie), les interactions et les effets secondaires (très faibles quand la drogue est utilisée correctement) qu'elle recense trouvent leur prolongement dans les mentions obligatoires qui doivent figurer sur l'étiquetage des produits pré-conditionnés. (6)

Un avertissement doit attirer l'attention du consommateur sur le risque d'œdème, sur la possibilité d'une hypertension et sur le fait qu'une utilisation au long cours peut entraîner une potentialisation de l'effet des cardiotoniques, une difficulté à ajuster la posologie d'un traitement anti-hypertenseur ou qu'elle ne doit pas accompagner la prise de diurétiques antikaliurétiques (spironolactone, triamtérène, amiloride). La durée du traitement est de 4-6 semaines au maximum et il faut l'accompagner d'un régime riche en potassium (bananes, abricots). (6)

1.3. Critères de pureté

Les édulcorants mentionnés dans la directive 94/35/CE, notamment la thaumatine et la néohespéridine dihydrochalcone, sont issus de méthodes de production ou de matières premières significativement différentes de celles couvertes par l'évaluation du Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine.

Il est donc souhaitable d'établir des « critères de pureté spécifiques pour les édulcorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires » (Directive 95/31/CE transposée en droit français au titre II de l'arrêté du 2 octobre 1997 (Annexe VI-B)). (73, 74)

Chaque édulcorant est présenté sous forme d'une fiche où sont indiqués :

- Ses synonymes.
- Sa définition avec sa dénomination chimique, son numéro E, sa formule chimique, sa masse moléculaire, sa composition.
- Sa description (état physique, couleur, odeur, saveur et pouvoir sucrant).
- Les moyens d'identification (solubilité, absorption dans l'UV ou tests particuliers).
- Les critères de pureté (perte lors du séchage, cendres sulfatées, arsenic, plomb, critères microbiologiques). (73, 76)

Cas de la glycyrrhizine issue de la réglisse :

Les différents critères sont fixés par les Pharmacopées Européenne (3ème édition) et Française (Xème édition). Y figurent :

- Une description macro- et microscopique de la drogue.
- Les moyens d'identification.
- Les différents essais servant à déterminer le niveau de pureté de la drogue (chromatographie, matières extractibles à l'eau, les cendres sulfuriques et les cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique, perte à la dessiccation, cendres totales).
- La méthode de dosage, s'effectuant avec la solution à examiner, la solution mère, des solutions témoins et un essai à blanc, permettant de déterminer la teneur pour cent d'acide glycyrrhizique.
- Les conditions de conservation de la drogue.
- L'étiquetage. (12, 51)

2. Le règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil.

Stevia rebaudiana Bertoni, plantes et feuilles séchées, est un nouvel aliment au sens de ce règlement et il ne sera pas mis sur le marché communautaire car il n'a pas été démontré que le produit est conforme aux critères définis à l'article 3, paragraphe 1. En effet les aliments ou ingrédients alimentaires qui en relèvent ne doivent pas :

- présenter de danger pour le consommateur.
- induire le consommateur en erreur.
- différer des aliments et ingrédients alimentaires qu'ils sont destinés à remplacer à un point tel que leur consommation normale impliquerait des inconvénients nutritionnels pour le consommateur. (article 3, paragraphe 1 du règlement n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil) (74, 78)

2.1. Introduction.

Le problème de la sécurité des aliments se pose actuellement à l'échelle mondiale à l'égard des aliments nouveaux. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Organisation pour la Coopération et le Développement Economique (OCDE) ainsi que d'autres organismes nationaux et internationaux se sont penchés sur les aspects généraux aussi bien que sur les aspects spécifiques relatifs à l'innocuité des nouveaux aliments. Ce règlement se propose notamment de formuler les recommandations relatives aux aspects scientifiques des informations nécessaires pour étayer une demande de mise sur le marché de nouveaux aliments ou de nouveaux ingrédients alimentaires. (77)

2.2. Catégories de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires recensés par le règlement (CE) n° 258/97.

Différentes catégories ont été établies en fonction de l'origine ou de la nature des nouveaux aliments :

- Ils contiennent des organismes génétiquement modifiés (OGM). (catégorie a)
- Ils sont produits à partir d'OGM. (catégorie b)
- Ils présentent une structure moléculaire primaire nouvelle ou délibérément modifiée. (catégorie c)
- Ils sont composés ou isolés à partir de micro-organismes, de champignons ou d'algues. (catégorie d)
- Ils sont issus d'un nouveau procédé de production modifiant leurs propriétés. (catégorie f) (77)

Le « *Stevia rebaudiana* Bertoni : plantes et feuilles séchées » correspond à une sixième catégorie (catégorie e) dont l'intitulé exact est : « aliments et ingrédients alimentaires composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci et ingrédients alimentaires isolés à partir d'animaux, à l'exception des aliments et ingrédients alimentaires obtenus par des pratiques de multiplication ou de reproduction traditionnelle et dont les antécédents sont sûrs en ce qui concerne l'utilisation en tant qu'aliments ». (77)

2.3. Points clés pour l'évaluation de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires.

L'évaluation de la sécurité des denrées alimentaires pose un certain nombre de problèmes scientifiques. De nouvelles méthodes doivent être mises au point pour analyser et évaluer la sécurité des aliments et des principaux ingrédients alimentaires. Pour combiner les aspects nutritionnels et toxicologiques, il faut prévoir des tests préliminaires *in vitro* et des études *in vivo* sur des modèles animaux, complétés si nécessaire par des études sur l'homme. (77)

Dans le cas de « *Stevia rebaudiana* Bertoni : plantes et feuilles séchées », il faudra s'intéresser aux points suivants :

- ✓ Equivalence substantielle : cette notion exprime l'idée que les organismes existants qui sont utilisés en tant qu'aliments ou source d'aliments peuvent servir de base à une comparaison lors de l'évaluation de l'innocuité d'un aliment ou d'un ingrédient alimentaire nouveau ou modifié.

- ✓ Analyse de la composition : ces études sont fondamentales pour l'établissement d'une équivalence substantielle et pour les évaluations nutritionnelles et toxicologiques.

- ✓ Consommation : lors de la mise sur le marché d'un nouvel aliment ou ingrédient alimentaire, un programme de surveillance doit permettre de réunir des informations sur les modifications intervenues dans les conditions de transformation et de préparation de l'aliment, ainsi que sur les conséquences de la substitution éventuelle du nouvel aliment ou ingrédient alimentaire à d'autres aliments ou ingrédients alimentaires importants.

- ✓ Aspects nutritionnels des essais de toxicité chez l'animal : dans le cadre d'une évaluation globale, il est essentiel d'interpréter soigneusement tous les effets indésirables observés lors des études sur l'animal et de distinguer les effets toxiques de ceux qui résultent d'un déséquilibre nutritionnel du régime alimentaire à l'étude. Il est donc nécessaire de connaître ses propriétés nutritionnelles (notamment valeur énergétique, teneur en protéines et biodisponibilité des micro-éléments nutritifs).

- ✓ Exigences toxicologiques : elles sont, en principe, établies au cas par cas mais trois scénarios peuvent être envisagés :
  - ❖ Une équivalence substantielle peut être établie avec un aliment ou un ingrédient alimentaire traditionnel accepté, auquel cas il est inutile d'effectuer d'autres contrôles.
  - ❖ Une équivalence substantielle peut être établie, sauf en ce qui concerne une ou quelques rares caractéristiques spécifiques de l'aliment ou un ingrédient alimentaire, auquel cas toutes les autres investigations menées dans le cadre de l'évaluation de la sécurité doivent être axées sur ces caractéristiques.

- ❖ Aucune équivalence substantielle, même partielle, ne peut être établie ; dans ce cas, il convient d'évaluer l'innocuité du nouvel aliment par une approche appropriée combinant les aspects nutritionnels et toxicologiques.

- ✓ Conséquences des nouveaux aliments ou ingrédients alimentaires : l'évaluation globale des conséquences d'ordre nutritionnel doit tenir compte aussi bien d'une consommation usuelle (normale) prévue que d'une consommation maximale. Les caractéristiques physiologiques et les exigences métaboliques de groupes tels que les nourrissons, les enfants, les femmes enceintes ou qui allaitent, les personnes âgées et les patients atteints de maladies chroniques (comme diabète, malabsorption, hypertension) feront l'objet d'une attention particulière.

- ✓ Potentiel allergisant : les éventuelles réactions allergiques à de nouvelles protéines ou à d'autres constituants des nouveaux aliments ou ingrédients alimentaires doivent être recherchées.

- ✓ Evaluation des gènes marqueurs : ils sont actuellement utilisés pour identifier et sélectionner les cellules végétales ou les micro-organismes résultant d'une modification génétique. (77)

Dans d'autres cas, on pourra se servir des points suivants :

- ✓ Organismes génétiquement modifiés (OGM) : il s'agit de garantir la sécurité de l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) et l'innocuité de la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement. (directives 90/219/CEE et 90/220/CEE)

- ✓ Nouveaux micro-organismes utilisés dans les denrées alimentaires : ils sont utilisés pour produire des aliments, des ingrédients alimentaires ou des additifs alimentaires. Pour évaluer l'innocuité d'un MGM, il faut tenir compte de l'origine du matériel nouvellement introduit dans ce micro-organisme. (77)

2.4. Classification scientifique des nouveaux aliments en vue de l'évaluation de leur innocuité.

Pour faciliter l'évaluation toxicologique et nutritionnelle, les nouveaux aliments et ingrédients alimentaires (NA) ont été répartis dans six classes en fonction de leur complexité et des problèmes qu'ils posent. Le « *Stevia rebaudiana* Bertoni : plantes et feuilles séchées » appartient à la classe 2.1 d'après le tableau IV et le descriptif des différentes sous-classes. (77)

	a	b	c	d	e	f
Classe 1			x	x	x	
Classe 2				x	x	
Classe 3	x	x				
Classe 4	x	x				
Classe 5	x	x				
Classe 6						x

Tableau IV : Correspondance entre la classification du règlement (CE) n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires et les classes de NA établies par le SCF (Scientific Commitee on Food). (77)

Classe 1 : Produits chimiques purs ou mélanges simples issus de sources non génétiquement modifiées.

Classe 2 : Nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires complexes issus de sources non génétiquement modifiées.

Cette classe comprend les nouveaux aliments et ingrédients alimentaires complexes non génétiquement modifiés ou qui proviennent de sources non génétiquement modifiées. Les végétaux, animaux et micro-organismes intacts utilisés en tant qu'aliments ou ingrédients alimentaires en font partie. On peut distinguer deux sous-classes :

- **la source du nouvel aliment ou du nouvel ingrédient alimentaire a déjà été utilisée comme aliment dans la Communauté. (2.1)**
- la source du nouvel aliment ou du nouvel ingrédient alimentaire n'a jamais été utilisée comme aliment dans la Communauté. (2.2)

Classe 3 : Végétaux génétiquement modifiés et leurs produits.

Classe 4 : Animaux génétiquement modifiés et leurs produits.

Classe 5 : Micro-organismes génétiquement modifiés et leurs produits.

Classe 6 : Aliments produits par un procédé nouveau. (77)

2.5. Identification des informations essentielles requises pour l'évaluation de l'innocuité d'un nouvel aliment ou d'un nouvel ingrédient alimentaire (NA).

Différents types de protocoles sont requis pour établir l'innocuité des NA (cf. annexe 4). Dans le cas de «*Stevia rebaudiana* Bertoni :plantes et feuilles séchées », ce sont les informations suivantes qui sont nécessaires :

- ✓ Spécification du NA : L'origine et la composition du NA doivent être spécifiées pour garantir l'identité entre le produit testé/évalué et le produit à commercialiser. Cette spécification doit être fondée sur les paramètres (espèce, taxon, composition chimique) qui caractérisent le mieux le produit sur les plans de la sécurité et des aspects nutritionnels.

- ✓ Effet du procédé de production appliqué au NA (cas des NA ayant subi un traitement au cours du processus de production): La description technique doit être suffisamment détaillée pour permettre de
    - Distinguer les procédés nouveaux de ceux existant déjà.
    - Prédire si le procédé est susceptible d'introduire des modifications physiques, chimiques et/ou biologiques dans l'aliment, qui pourrait avoir un impact sur les paramètres nutritionnels, toxicologiques et microbiologiques essentiels du produit final.

- ✓ Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NA : Informations sur l'usage passé et actuel du végétal, de l'animal ou du micro-organisme et de ses produits dans l'alimentation humaine dans d'autres régions du monde. On précisera :
  - les méthodes utilisées autrefois et à l'heure actuelle pour obtenir les matières premières et l'aliment, par exemple les méthodes de récolte, d'élevage.
  - les procédures de fermentation et de préparation.
  - les conditions de transport et de stockage.
  - le rôle traditionnel de l'aliment dans le régime alimentaire en dehors de la Communauté.

- ✓ Consommation/niveau d'utilisation prévus du NA : Des estimations de la consommation sont nécessaires pour évaluer l'importance du NA sur le plan alimentaire et nutritionnel. Cette évaluation reposera sur les informations relatives à la nature du NA et à son utilisation prévue en fonction de ses propriétés.

- ✓ Informations fournies par une exposition humaine antérieure au NA ou à sa source : Une documentation sur l'utilisation antérieure de la source du NA dans la Communauté, ou de la source du NA et/ou du NA dans d'autres parties du monde, servira de base à l'évaluation. toutefois, le fait qu'un NA soit consommé en dehors de la Communauté ne garantit pas qu'il puisse être consommé sans danger dans la Communauté (méthodes traditionnelles de manipulation et de préparation).

- ✓ Informations d'ordre nutritionnel sur le NA : Une évaluation globale doit comporter un examen systématique de la composition du NA, de son mode de préparation et de la place qu'il tiendra probablement dans l'alimentation. Elle doit permettre d'établir une équivalence substantielle avec un aliment ou ingrédient alimentaire traditionnel. Si aucune équivalence n'est établie, il faudra effectuer des évaluations avec des objectifs nutritionnels et métaboliques précis, avec des niveaux de consommation normal et maximal et tenir compte des facteurs extérieurs tels que le stockage, la cuisson.

- ✓ Informations d'ordre microbiologique sur le NA : L'organisme choisi comme source de NA doit être un micro-organisme non pathogène et non génotoxique reconnu, dont la stabilité génétique est prouvée et qui n'altère pas les propriétés de la flore intestinale. L'examen d'un

NA doit comporter une caractérisation des micro-organismes présents et une analyse de leurs métabolites.

- ✓ Informations d'ordre toxicologique sur le NA : S'il est impossible d'établir une équivalence substantielle avec un produit classique correspondant, l'évaluation de la sécurité réalisée au cas par cas devra tenir compte :
  - de la toxicité éventuelle de chaque composant chimique identifié par l'analyse.
  - des études de toxicité *in vitro* et *in vivo* (mutagénicité, reproduction, tératogénicité et des études d'alimentation à long terme).
  - des études relatives au potentiel allergisant. (77)

Dans le cadre du Règlement (CE) n° 258/97, les instances scientifiques françaises ont émis un avis défavorable à la demande d'autorisation d'emploi de cette plante en alimentation humaine. D'autres Etats membres ont également émis des réserves quant à l'utilisation de ce produit en alimentation humaine. La Commission européenne, après consultation du SCF (Scientific Commitee on Food), a proposé d'émettre un avis défavorable le 17 juin 1999. Le 22 février 2000, la Commission des Communautés européennes a émis une Décision relative au refus d'autorisation de mise sur le marché de « *Stevia rebaudiana* Bertoni : plantes et feuilles séchées ». (56, 74, 78)

Vu les discordances entre les différentes études et le peu d'informations disponibles sur les extraits utilisés, il est tout à fait compréhensible que la Commission ait émis un tel avis. Mais il ne faut pas oublier que cette plante est couramment utilisée au Japon et que les quantités consommées se chiffrent en milliers de tonnes par an.

Conclusion

L'étude de la saveur sucrée a montré sa complexité et la difficulté de mettre au point un substitut du saccharose qui aurait les mêmes qualités gustatives que celui-ci. D'autre part, les édulcorants naturels ne sont pas dotés des même facilités de conservation, de transport et d'utilisation que le sucre.

L'emploi de la plante *Stevia rebaudiana* Bertoni sous forme de feuilles séchées et de son constituant, le stévioside est actuellement limité en Europe par le manque de données toxicologiques. La commission des Communautés européennes a, en effet, émis un Avis défavorable à la mise sur le marché du stévioside en tant qu'édulcorant et une Décision relative au refus de commercialisation de la plante sous forme de feuilles séchées. On s'interroge à propos de cette décision quand on sait que celle-ci est commercialisée à grande échelle dans d'autres parties du monde, notamment au Japon, au Paraguay, en Chine et au Brésil. Il serait urgent de fixer des doses maximales d'emploi afin de permettre son utilisation et de garantir sa sécurité d'emploi. Sa commercialisation n'est pas tout à fait suspendue car certains fabricants jouent sur les mots en substituant « édulcoré » par « adouci » pour pouvoir employer le stévioside.

Parmi les autres édulcorants naturels, seuls sont autorisés en Europe la thaumatine et la néohespéridine dihydrochalcone. La glycyrrhizine n'étant pas considérée comme un édulcorant à part entière, son utilisation n'est pas réglementée par les mêmes textes législatifs. Elle peut être considérée comme un édulcorant à pouvoir sucrant modéré mais elle joue surtout un rôle dans l'amélioration des arômes et des saveurs. De plus, elle est traditionnellement utilisée dans de nombreuses pathologies bénignes.

La plante *Stevia rebaudiana* et le stévioside montrent un certain nombre d'avantages, quant à leur emploi comme édulcorant : ils peuvent être facilement stockés, et donc transportés pour être commercialisés. Le stévioside est stable en solution à la température de 100° pendant 1 heure à pH acide ou neutre. Il est alors possible de l'utiliser en cuisine (avantage que n'a pas l'aspartame d'origine synthétique). D'autre part il présente un coût moindre par rapport à la thaumatine (édulcorant d'origine naturelle autorisé dans l'Union Européenne).

Son goût sucré est très constant ; un échantillon d'herbier vieux de 60 ans l'a conservé ! Ce pouvoir sucrant élevé, environ 300 fois celui du saccharose, permet de diminuer la ration

glucidique journalière d'où son emploi chez les diabétiques et dans les régimes hypocaloriques. Enfin, n'étant pas fermentescible, il n'est pas cariogène.

Sa facilité d'obtention, de stockage et d'utilisation et son pouvoir sucrant important font du stévioside un édulcorant de choix. Seul son arrière-goût particulier pourrait entraver son essor commercial mais de nombreuses études ont permis de trouver des alternatives pour l'améliorer. De plus, la qualité de son pouvoir édulcorant est jugée supérieure ou égale à la saccharine ou à l'aspartame.

Le regain d'intérêt du public pour le naturel laisserait présager un avenir à cette plante. Il est difficile d'entrevoir dès aujourd'hui quelle sera la place de *Stevia rebaudiana*. Les normes toxicologiques évoluent dans le temps et il n'est pas rare que les molécules rejetées réapparaissent sur le marché. A l'inverse, certaines très anciennement utilisées sont remises en question.

D'autres constituants de cette Asteraceae, et notamment le rebaudioside A, seront peut-être plus prometteurs à condition que des études toxicologiques poussées permettent de faire la preuve de leur innocuité.

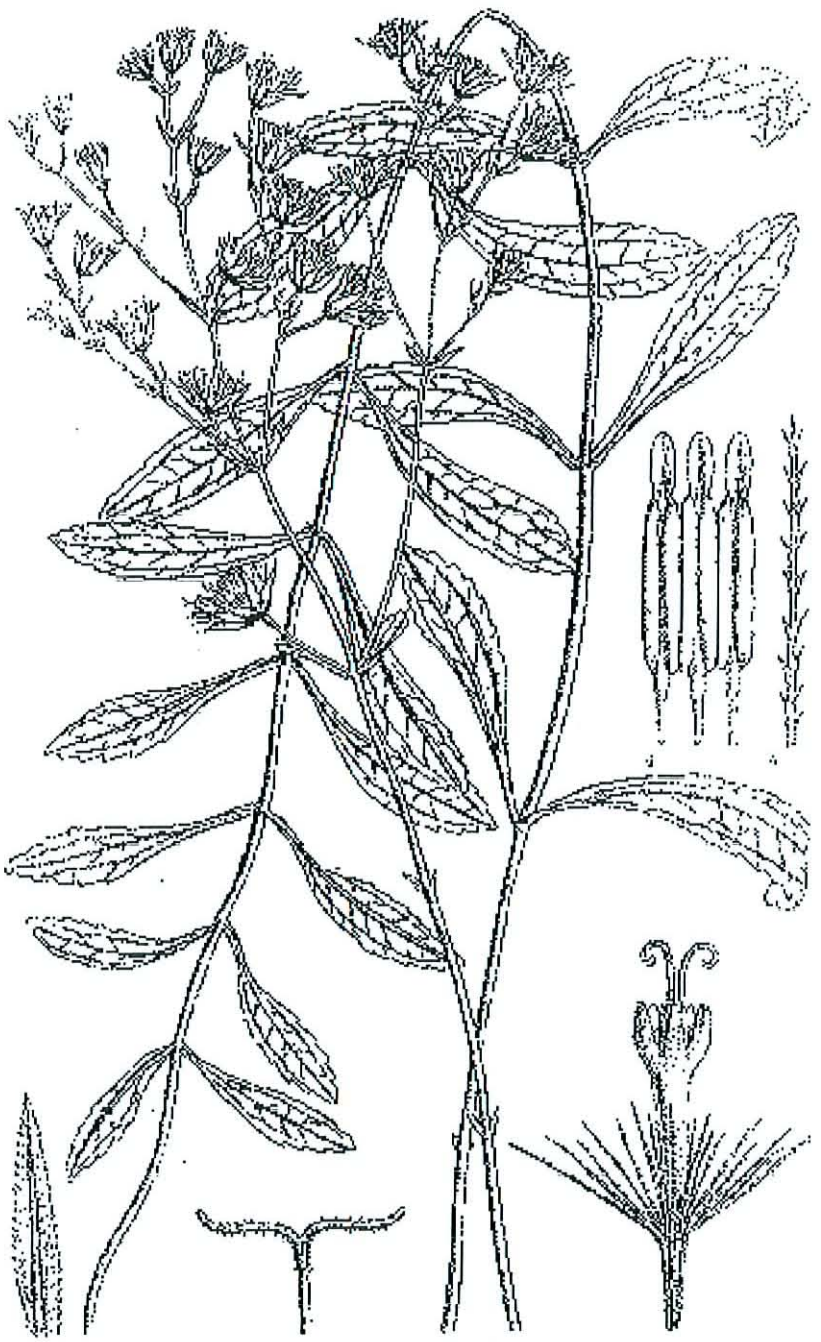
Annexes

Comparaison entre le stévioside et deux autres édulcorants intenses d'origine naturelle.

	Stévioside	**Thaumatine**	**Néohespéridine dihydrochalcone**
Plante	*Stevia rebaudiana* Bertoni	*Thaumatococcus danielli* Benth.	*Citrus aurantiacum* (essentiellement)
Famille	Asteraceae	Marantaceae	Rutaceae
Nature chimique	Hétéroside diterpénique	Protéines (thaumatines I et II)	Dérivés semi-synthétiques de glucosides de flavonoïdes naturels
Pouvoir sucrant	200 à 300 fois celui du saccharose	3000 fois celui du saccharose	1000 fois celui du saccharose
Saveur	Arrière-goût persistant avec astringence et amertume	Retardée dans le temps et persiste 15 à 20 minutes	Effet de « lingering »
Stabilité	Résiste à des températures élevées (180°C) et à des pH compris entre 3 et 9	Maximale à pH 2,7-3 Chauffage possible (pasteurisation)	Stable à pH neutre et pour entre 70 et 100°C (procédé UHT et pasteurisation)
Toxicologie	? mais utilisation au Japon sans aucun problème depuis 30 ans	Non toxique	Non toxique

Planche de botanique

Stevia rebaudiana Bertoni.(79)



Glossaire

Arille Production d'origine tégumentaire qui se développe au niveau ou autour d'une graine après la fécondation et jamais adhérente à celle-ci.

Asteraceae Aussi appelées Composées. Famille appartenant à la classe des Dicotylédones, à la sous-classe des Asteridae qui comporte le plus grand nombre d'espèces répandues dans le monde entier.

Auxine Régulateur de croissance des plantes stimulant l'allongement des cellules des pousses.

Baie Fruit charnu à pépins.

Cals Masse de cellules désorganisées formée dans des conditions *in vitro*.

Capitule Inflorescence à fleurs sessiles ou subsessiles portées par le sommet élargi du pédoncule (réceptacle).

Carpelle Feuille spécialisée sur laquelle sont portés les ovules. Les carpelles, uniques ou multiples, clos, plus ou moins soudés entre eux, constituent le pistil ou gynécée des fleurs d'Angiospermes.

Cytokine Régulateur de croissance des plantes stimulant la division cellulaire.

Déhiscent Qui s'ouvre spontanément.

Dicotylédones Cette famille est caractérisée par un embryon à 2 cotylédons, un appareil végétatif extrêmement varié :

- une racine principale pivotante pourvue de racines secondaires.
- les tiges sont ramifiées et peuvent devenir arborescentes.
- Les feuilles sont complètes, formées d'un limbe à nervation pennée ou palmée pouvant être composée de folioles, d'un pétiole et d'une base foliaire, exceptionnellement élargie en gaine, et munie de deux stipules.

De même, l'inflorescence peut appartenir à tous les types et le périanthe différencie deux enveloppes distinctes, le calice et la corolle. La formule florale est de type 5 (5S+5P+(5+5)E+5C).

Endocarpe Partie la plus interne du péricarpe d'un fruit (l'endocarpe d'une drupe est sclérifié [paroi du noyau]).

Epi Inflorescence indéfinie formée d'un axe portant des fleurs ou des groupes de fleurs (épillets) sessiles échelonnés sur l'axe (le rachis).

Etamine Organe mâle de la fleur.

Fabaceae Famille appartenant à la classe des Dicotylédones, la sous-classe des Rosidae et à l'ordre des Fabales. Elle est caractérisée par un nombre d'étamines réduit à 10 et par la fleur qui acquiert une corolle zygomorphe (un pétale dorsal appelé étendard ou vexillum, deux pétales latéraux ou ailes, deux pétales ventraux qui forment la carène).

Foliole Nom donné à chacune des divisions d'une feuille composée.

Gousse Fruit sec normalement déhiscent, formé d'un seul carpelle et s'ouvrant par deux fentes.

Grappe Inflorescence indéfinie formée d'un pédoncule portant, de façon alterne, des fleurs pédicellées s'épanouissant de la base au sommet.

Imparipennée Se dit d'une feuille composée pennée possédant une foliole terminale, donc un nombre impair de folioles.

Inflorescence Ensemble des fleurs regroupées sur le même axe. Elle peut être définie (cyme) ou indéfinie (grappe, épi, corymbe, ombelle, capitule).

Limbe Partie plate et élargie de la feuille.

Marantaceae Famille appartenant à la classe des Monocotylédones.

Menispermaceae Famille appartenant à la classe des Dicotylédones et à la sous-classe des Magnoliidae. Ce sont des plantes tropicales généralement lianescentes.

Monocotylédones Cette classe est caractérisée par un seul cotylédon, des feuilles toujours simples, réduites au pétiole et par aucunes formations secondaires.

Palmée Se dit d'une feuille dont le limbe est découpé en segments tous réunis au sommet du pétiole.

Pennée Se dit d'une feuille composée dont les folioles sont disposées de part et d'autre de l'axe principal.

Périanthe Ensemble des pièces protectrices de la fleur.

Péricarpe Paroi du fruit (épicarpe + mésocarpe +endocarpe).

Pétiole Partie amincie de la feuille reliant le limbe à la tige.

Protoplasme Cellule dont on a ôté la paroi cellulaire.

Rhizome Tige souterraine vivace émettant annuellement des tiges et des racines adventives.

Rutaceae Famille appartenant à la classe des Dicotylédones et à la sous-classe des Rosidae. Elle s'identifie par son appareil sécréteur constitué par des poches sécrétrices dites schizolysigènes rencontrées dans aucune autre famille.

Sapotaceae Famille appartenant à la classe des Dicotylédones, la sous-classe des Dilleniidae et à l'ordre des Ebénales. Ce sont des arbres tropicaux.

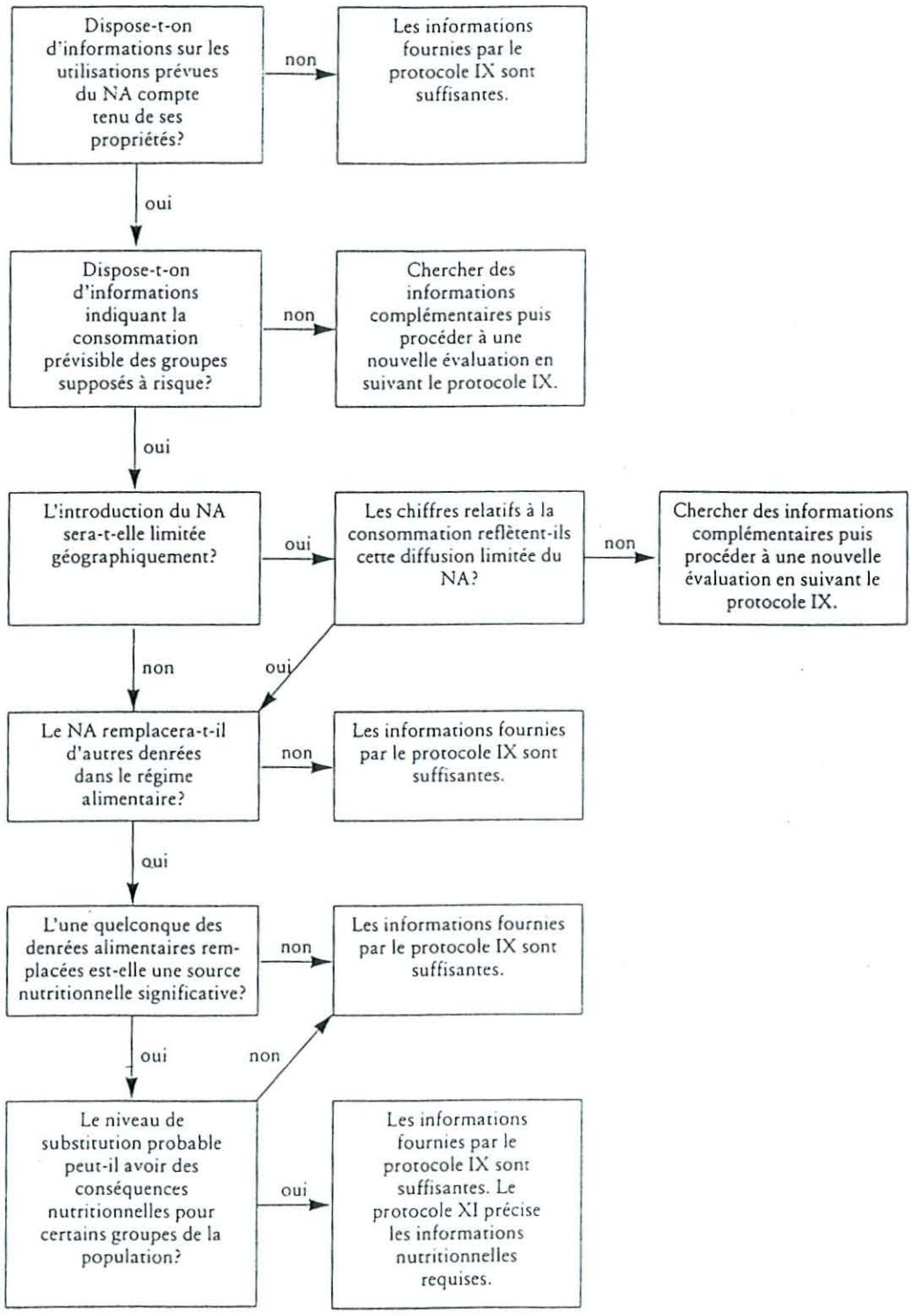
Schizolysigènes Se dit de poches sécrétrices dont la formation résulte à la fois d'un écartement et de la multiplication des cellules délimitant la cavité à l'origine de la poche, et d'une lyse des cellules les plus internes de celle-ci.

Taxon Unité systématique de rang quelconque. Ce sont le genre, le sous-genre, l'espèce, la sous-espèce, la variété. Aussi appelé unité taxonomique.

Zygomorphe Se dit d'une fleur « irrégulière » (à symétrie non axiale). La symétrie est souvent bilatérale ; elle est parfois inexistante.

Exemple de protocole servant à l'évaluation de l'innocuité d'un nouvel aliment ou d'un nouvel ingrédient alimentaire : cas du protocole IX intitulé « Consommation/Niveau d'utilisation prévus du NA. » (Règlement (CE) n°258/97)

IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévus du NA



Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1	: Les papilles linguales. (52)	p.5
Figure 2	: Un bourgeon du goût. (52)	p.6
Figure 3	: Structure des bourgeons du goût. (34)	p.6
Figure 4	: Systématisation de l'appareil du goût. (11)	p.7
Figure 5	: La transduction du signal gustatif. (52)	p.9
Figure 6	: La topographie de la sensibilité gustative sur le dos de la langue. (34)	p.10
Figure 7	: Modèle d'images gustatives. (17)	p.14
Figure 8	: Modèles de sites gustatifs (17)	p.16
Figure 9	: Les récepteurs impliqués dans la saveur sucrée. (33)	p.17
Figure 10	: *Stevia rebaudiana* Bertoni. (31)	p.21
Figure 11	: Stévioside. (25)	p.24
Figure 12	: Stéviol (a) et isostéviol (b). (25)	p.25
Figure 13	: Fruit de *Thaumathococcus danielli* Benth. (http://www.daniscosugar.com)	p.48
Figure 14	: Baies du Nigeria. (http://www.daniscosugar.com)	p.50
Figure 15	: *Syncepalum dulcificum* Dan . (49)	p.52
Figure 16	: « Fruit miracle ». (http://www.daniscosugar.com)	p.53
Figure 17	: Néohespéridine dihydrochalcone. (49)	p.56
Figure 18	: *Glycyrrhiza glabra* L. (6)	p.59
Figure 19	: glycyrrhizine. (6)	p.60
Figure 20	: phyllodulcine. (25)	p.63

Tableaux

Tableau I	: Rebaudiosides et dulcosides. (25)	p.26
Tableau II	: Denrées alimentaires pour lesquelles l'usage de la thaumatine (E957) est autorisé. (73)	p.68
Tableau III	: Denrées alimentaires pour lesquelles l'usage de la néohespéridine dihydrochalcone (E959) est autorisé. (73)	p.69-71
Tableau IV	: Correspondance entre la classification du règlement (CE) n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires et les classes de NA établies par le SCF (Scientific Commitee on Food). (77)	p.78

Bibliographie

1. **AZE Y., et al.**
Subchronic oral toxicity study of stevioside in F344 rats.
Eisei Shikenjo Hokoku, 1991, 109, p48-54

2. **BAILLET Jack, NORTIER Erik**
Précis de physiologie humaine.
Paris : Edition Marketing, 1992.-2 vol., 1549p.

3. **BORREGO F., CANALES I., LINDLEY M G.**
Neohesperidin dihydrochalcone : state of knowledge review.
Z. Lebensm .Unters. Forsch., 1995, 200, 1, 32-37

4. **BORREGO F., MONTIJANO H.**
Potential applications of the sweetener neohesperidin dihydrochalcone in drugs.
Pharm. Ind., 1995, 57, 10, 880-882

5. **BRUNETON Jean**
Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.-2e ed.
Paris : Tec&Doc, 1993. - 915p.

6. **BRUNETON Jean**
Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.-3e ed.
Paris : Tec&Doc, 1999. -1120p.

7. **CANALES I., BORREGO F., LINDLEY M G.**
Neohesperidin dihydrochalcone stability in aqueous buffer solutions.
J. Food Sci., 1993, 58, 3, 589-591

8. **CARDOSO VN., et al.**
Pharmacokinetic studies of 131I-stevioside and its metabolite.
Nucl. Chem. Biol., 1996, 23, 1, p97-100

9. **CHAN P., et al.**

The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously by hypertensive rats.

Life Sci., 1998, 63, 19, p1679-1684

10. **CHAN. P., et al.**

A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension.

Br. J. Clin. Pharmacol., 2000, 50, 3,p215-220

11. **CHEVREL JP, GUERAUD JP, LEVY JB.**

Anatomie générale.-6e Edition.

Paris : Masson, 1996.- 201p.

12. **Commission Nationale de la Pharmacopée.**

Pharmacopée Française.- X° Edition.

Paris : Adrapharm, 1982. -10 vol.

13. **COMPADRE CM., et al.**

Mass spectral analysis of some derivates and *in vitro* metabolites of steviol, the aglycone of the natural sweeteners, stevioside, rebaudioside A and rubusoside.

Biomed. Environ. Mass Spectrom., 1988, 15, 11, p211-222

14. **DAS S., et al.**

Evaluation of cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside andrebaudioside A.

Caries. Res., 1992, 26, 5, p363-366

15. **DEBRY Gérard**

Glucides à saveur sucrée, édulcorants et santé : sucre et santé.

Paris : John Libbey Eurotext, 1996.-1°vol., 850p.

16. **DEL RIO J A., FUSTER M D., et al.**

Sélection of *citrus* variants highly productive for the neohesperidin dihydrochalcone precursor.

Food Chem., 1997, 59, 3, 433-437

17. **FAURION A.**

La physiologie de la perception du goût sucré et la relation entre les structures moléculaires et le goût.

In : Le sucre, les sucres et les glucides de charge dans les IAA / ed. par JL MULTON.

Paris : Lavoisier, 1992.-816p. -(Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires)

18. **FAUS I., DEL MORAL C., et al.**

Secretion of the sweet-tasting protein thaumatin by recombinant strains of *Aspergillus niger* var. awamori.

Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998,49, 4, 393-398

19. **FAUS I. , PATINO C., et al.**

Expression of a synthetic gene encoding the sweet-tasting protein thaumatin in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti.*

Biotechnol. Lett., 1997, 19, 12, 1185-1191

20. **GIBBSB F., ALLI I. , MULLIGAN C.**

Sweet and taste-modifying proteins : a review.

Nut. Res., 1996, 16, 9, 1619-1630

21. **GRAS D.**

Les édulcorants naturels et de synthèse (2° partie).

Lyon Pharm., 1983, 34, 1, 29-36.

22. **GUIGNARD J.-L.**

Botanique.-10e éd.

Paris : Masson, 1996. -278p. -(Abrégés de pharmacie)

23. **GUYTON Arthur C.**
Précis de physiologie médicale.-8e édition.
Padoue : Piccin, 1996.-960p.

24. **HANDRO W., FERREIRA C.M.**
Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni : Production of Naturel Sweeteners.
In : Medicinal and Aromatic Plants II / ed. par Y.P.S. Bajaj.
Berlin: Springer-Verlag, 1989.-7°vol., p.468-487.-(Biotechnology in Agriculture and Forestry)

25. **HANSON JR., DE OLIVEIRA BH.**
Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides.
Nat. Prod. Rep ., 1993, 10, 3, p301-309

26. **HUBLER MO., et al.**
Influence of stevioside in hepathic glycogen levels in fasted rats.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 1994, 84, 1, p11-118

27. **ISHII-IWAMOTO EL., et al.**
Stevioside is not metabolized in the isolated perfused rat liver.
Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 1995, 87, 2, p167-175

28. **JEPPESEN PB., et al.**
Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insuline : actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K+-channel activity.
Metabolism, 2000, 49, 2, p208-214

29. **JUTABHA P., et al.**
Effect of stevioside on PAH transport by isolated perfused rabbit renal proximal tubule.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 2000, 78, 9, p737-744

30. **KINGHORN A.DOUGLAS, SOEJARTO DJAJA D.**
Current status of stevioside as sweetening agent for human use.
In : Economic and Medicinal Plant Resarch / ed. par H WAGNER., HIROSHI HIKINO etN.R. FARNSWORTH.
Londres : Academic Press, Inc., 1985.-1°vol., p.1-52

31. La Stévia : "la plante qui sucre."
Documentation du laboratoire Natessance.

32. Le goût et l'odorat : éléments du choix alimentaire
In : Nutrition du praticien /ed. par JL SCHLIENGER ;
Paris : Expansion Scientifique Française, 1991.-p15-17

33. **LINDEN R.W.A.**
The scientific Basis of eating.
Basel : Karger, 1998. -vol 9, 244p.-(Frontiers of oral biology)

34. **MARIEB Elaine N.**
Anatomie et physiologie humaine.-2e Edition.
Bruxelles : De Boeck, 1993.-1014p.

35. **MATSUI M., et al.**
Mutagenicity of steviol : an analytical approach using the Southern blotting system.
Eisei Shikenjo Hokoku, 1989, 107, p83-87

36. **MATSUI M., et al.**
Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays.
Mutagenesis, 1996, 11, 6, p573-579

37. **MATSUI M., et al.**
Regionally-targeted mutagenesis by metabolically-actived steviol : DNA sequence analysis of steviol-indiced mutants of guanine.
Mutagenesis, 1996, 11, 6,p565-572

38. Médicaments à base de plantes.
Paris : Agence du Médicament, 1998. -81p. -(Les Cahiers de l'Agence)

39. MELIS MS.
Influence of calcium on the blood pressure and renal effects of stevioside.
Braz. J. Med. Biol. Res., 1992, 25, 9, p943-949

40. MELIS MS.
Renal excretion of stevioside in rats.
J. Nat. Prod.,1992, 55, 5, p688-690

41. MELIS MS.
Stevioside effect on renal function of normal and hypertensive rats.
J. Ethnopharmacol.,1992, 36,3, p213-217

42. MELIS MS.
Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats : renal effects.
J. Ethnopharmacol., 1995, 47,3, p129-134

43. MELIS MS.
A crude extract of *Stevia rebaudiana* increases the renal plasma flow of normal and hypertensive rats ;
Braz. J. Med. Biol. Res.,1996, 29,5, p669-675

44. MELIS MS.
Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats.
J. Ethnopharmacol., 1999, 67, 2, p157-161

45. MELIS MS.
Effect of crude extract of *Stevia rebaudiana* on renal water and electrolytes excretion.
Phytomedicine, 1999, 6, 4, p247-250

46. **MELIS MS., SAINATI AR.**
Effect of calcium and verapamil on renal function of rats during treatment with stevioside.
J. Ethnopharmacol., 1991, 33, 3, p257-262

47. **MELIS MS., SAINATI AR.**
Participation of prostaglandins in the effects of stevioside on rat renal function and arterial pressure .
Braz. J. Med. Biol. Res., 1991, 24, 12, p1269-1276

48. **MONTIJANO H., TOMAS-BARBERAN F A., BORREGO F.**
Accelerated kinetics study of neohesperidin DC hydrolysis under conditions relevant to high-temperature-processed dairy products.
Food Res. Technol., 1997, 204, 3, 180-182

49. **MOYAL M.F.**
Les autres édulcorants non autorisés par la législation.
In : Le sucre, les sucres et les glucides de charge dans les IAA / ed. par JL MULTON.
Paris : Lavoisier, 1992. -p.527-547 -(Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires)

50. **PARIS R.R., MOYSE H.**
Précis de matière médicale.
Paris : Masson, 1971.-3°vol., 509p.

51. Pharmacopée Européenne (addendum 2000). - 3° Edition.
Strasbourg : Conseil de l'Europe, 1999. -1425p.

52. **POIRIER J., RIBADEAU DUMAS JL , CATALA M.**
Histologie moléculaire.-5e Edition.
Paris : Masson, 1997.-416p.

53. **PROCINSKA E., et al.**
Interpretation of results with the 8-azaguanine resistance system in *Salmonella typhimurium*: no evidence for direct acting mutagenesis by 15-oxosteviol, a possible metabolite of steviol.
Mutagenesis, 1991, 6, 2, p165-167

54. **RIOU Sylvie**
Le circuit des sens.
Impact Pharm., 1998, 32, p14

55. **SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, EUROPEAN COMMISSION.**
Opinion on stevioside as a sweetener (adopted on 17/6/99).
http://www.europea.eu.int/comm/dg24/health/sc/scf/index_en.html (page consultée le 17/01/01)

56. **SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, EUROPEAN COMMISSION.**
Opinion on *Stevia rebaudiana* Bertoni plants and leaves (adopted on 17/6/99).
http://www.europea.eu.int/comm/dg24/health/sc/scf/index_en.html (page consultée le 17/01/01)

57. **SUANARUNSAWAT T, et al.**
The effect of stevioside on glucose metabolim in rats.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 1997, 75, 8, p976-982

58. **SUTTAJIT M., et al.**
Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni.
Environ. Health Perspect., 1993, 101, 3, p53-56

59. **TAKAHASHI K., et al.**
Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*.
Antiviral Res., 2001, 49, 1, p15-24

60. **TEMCHAROEN P., et al.**
Evaluation of the effect of steviol on chromosomal damage using micronucleus test in three laboratory animal species.
J. Med. Assoc. Thai., 2000, 83,pS101-108

61. **TOLKULKAO C., et al.**

Inhibitory effect of steviol, a metabolite of stevioside, on glucose absorption in everted hamster intentine in vitro.
Toxicol. Lett., 1995, 80,1-3, p153-159

62. **TOMITA T., et al.**
Bactericidal activity of a fermented hot-water from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 : H7 and other food-borne pathogenic bacteria.
Microbiol. Immunol. , 1997, 41, 12, p1005-1009

63. **TOSKULKAO C., et al.**
Effects of stevioside and steviol on intestinal glucose absorption in hamsters.
J. Nutr. Sci. Vitaminol., 1995, 41, 1, p105-113

64. **TOSKULKAO C., et al.**
Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, ant its metabolite, steviol, in several animal, species.
Drug. Chem. Toxicol., 1997, 20, 1-2, p31-44

65. **TOYODA K, et al.**
Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats.
Food Chem. Toxicol., 1997, 35, 6,p597-603

66. **USAMI M., et al.**
Teratogenicity study of stevioside in rats.
Eisei Shikenjo Hokoku, 1995, 113, p31-35

67. **VAN ROSSEN T G J., VUALTO A G., et al.**
Review article : glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C.
Aliment. Pharmacol. Ther. , 1998, 12, 3, 199-205

68. **VAN ROSSUM T G J., VULTO A G., et al.**
Intravenous glycyrrhizin for the treatement of chronic hepatitis C : a double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial.
J. Gastroenterol. Hepatol., 1999, 14, 11, 1093-1099

69. **WASUNTARAWAT T., et al.**
Developmental toxicity of steviol, a metabolite of stevioside, in the hamster.
Drug. Chem. Toxicol., 1998, 21, 2, p207-222

70. **XILI L., et al.**
Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats.
Food Chem. Toxicol., 1992, 30, 11, p957-965

71. **YODYINGYAD V., et al.**
Effect of stevioside on growth and reproduction.
Hum. Reprod., 1991, 6, 1, p158-165

72. **ZEMANEK E C., WASSERMAN B P.**
Issues and advances in the use of transgenic organisms for the production of thaumatin, the intensely sweet protein from *Thaumatococcus danielli.*
Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1995, 35, 5, 455-466

Documents législatifs.

73. Arrêté du 2 octobre 1997 relatif aux additifs pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine.
JO du 08-11-1997.

74. Décision 2000/196/CE de la Commission du 22 février 2000 relative au refus d'autorisation de mise sur le marché de « *Stevia rebaudiana* Bertoni : plantes et feuilles séchées » en tant que nouvel aliment ou nouvel ingrédient alimentaire conformément au règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil.
JO des Communautés européennes n° L 61 du 8-3-2000, p. 14.

75. Directive 94/35/CE du Parlement européen et du Conseil du 30 juin 1994 concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires.
JO des Communautés européennes n° L 237 du 10-9-1994, p. 3.

76. Directive 95/31/Ce de la Commission du 5 juillet 1995 établissant des critères de pureté spécifiques pour les édulcorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires.
JO des Communautés européennes n° L 178 du 28-7-1995, p. 1.

77. Recommandation 97/618/CE de la Commission du 29 juillet 1997 concernant les aspects scientifiques relatifs à la présentation des informations requises pour étayer des demandes d'autorisation de mise sur le marché de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires et l'établissement des rapports d'évaluation initiale au titre du règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil.
JO des Communautés européennes n° L 253 du 16-9-1997, p. 1.

78. Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires.
JO des Communautés européennes n° L 43 du 14-2-1997, p. 1.

Planche de botanique

79. HOOKER William Jackson, Sir.
Icones plantarum ; or, Figures, with brief descriptive characters and remarks of new or rare plants, selected from theautor's herbarium.
London : Longman, Rees, Orme, Brown, Green & Longman, 1837-1919.-Tabula 2816.

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

DEMANDE D'IMPRIMATUR

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté par **Anne-Claire THINES**

Sujet :

La place de *Stevia rebaudiana* au sein des édulcorants d'origine naturelle.

Jury :

Président : M. François MORTIER, Professeur

Juges : Mme Marie Claude FUZELLIER, Maître de conférences
Mme Anne VOIRIN-TIERCELIN, Pharmacien, Nancy

Vu,

Nancy, le 21/03/2001

Le Président du Jury

M. F MORTIER
Professeur

Le Directeur de thèse

Mme M-C FUZELLIER
Maître de conférences

Vu et approuvé,

Nancy, le 22 mars 2001

P. Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré – Nancy I,

Le Vice Doyen,
Anne ROVEL

Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le 28 mars 2001
n° 1013

Le Président de l'Université Henri Poincaré – Nancy I

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I
LE PRÉSIDENT

Claude BURLET

N° d'identification : PH Nancy 01 n°19

La place de *Stevia rebaudiana* au sein des édulcorants d'origine naturelle.

Thèse soutenue le 19 avril 2001

Par Anne-Claire THINES

RESUME :

Stevia rebaudiana Bertoni (Asteraceae) est une plante originaire du Paraguay et du Brésil, connue pour ses propriétés édulcorantes. Le stévioside, un édulcorant intense, est extrait des parties aériennes de la plante, et notamment à partir des feuilles. Actuellement, la plante entière et le stévioside posent surtout des problèmes de nature toxicologique.

D'autres édulcorants d'origine naturelle existent mais seules la thaumatine et la néohespéridine dihydrochalcone sont autorisées en Europe par la Directive européenne 94/35/CE. De son côté, la glycyrrhizine suit les dispositions fixées par les Pharmacopées Européenne et Française et par l'AFSSAPS.

Par ailleurs, « *Stevia rebaudiana* Bertoni : plantes et feuilles séchées », examinée au titre du Règlement (CE) n°258/97, n'a pas reçu d'autorisation de mise sur le marché. De même, le stévioside n'est pas considéré comme acceptable en tant qu'édulcorant par le SCF.

MOTS CLES : édulcorants, législation, néohespéridine dihydrochalcone, *Stevia rebaudiana*, stévioside, thaumatine.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mme Marie Claude FUZELLIER	Pharmacognosie	Expérimentale ☐ Bibliographique ☒ Thème ☐

Thèmes

1- Sciences fondamentales
2- Hygiène/Environnement
3- Médicament
4- Alimentation – Nutrition
5- Biologie
6- Pratique professionnelle