

tre : 395

50376  
1986  
187

50376  
1986  
187

# MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGENIEUR EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

Bernard LAYOUS



## LE STEVIOSIDE : EDULCORANT DE *STEVIA REBAUDIANA BERTONI*

- 1 - MISE AU POINT D'UN PROCEDE DE PREPARATION INDUSTRIELLE
- 2 - ETUDE TOXICOLOGIQUE

*Exemplaire corrigé après avis du jury*

Présenté le 4 Juillet 1986 devant la Commission d'Examen

Président :	J. MONTREUIL
Rapporteurs :	S. BOUQUELET D. MARZIN
Examineur :	A. TARTAR

SCD LILLE 1



D 030 319255 9

50376  
1986  
187

50376  
1986  
187



*A mes parents  
A mon épouse*

Je tiens à remercier Monsieur A. TARTAR  
(Président Directeur Général de la Société SABE) ainsi que  
Monsieur le Professeur J. MONTREUIL (Directeur du Laboratoire de  
Chimie Biologique) qui m'ont permis de mener à bien cette étude.

Je veux aussi exprimer toute ma reconnaissance à  
Monsieur S. BOUQUELET, Professeur à l'Institut Universitaire de  
Technologie (I.U.T.) de Lille, qui m'a conseillé et guidé tout au  
long de mes recherches.

Je remercie également Monsieur D. MARZIN, Professeur  
de toxicologie, qui a largement participé aux études toxicologiques  
et qui me fait l'honneur de juger ce travail.

Enfin, j'adresse mes remerciements les plus sincères  
à tout ceux qui, de près ou de loin, par leurs conseils, leur expérience,  
leur collaboration, m'ont aidé à réaliser cette étude.

Ce travail a été réalisé pour la Société SABE (Président Directeur Général A. TARTAR) sous la direction de Monsieur le Professeur S. BOUQUELET dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, Unité Associée au C.N.R.S. n° 217 (Directeur : Professeur J. MONTREUIL).

Cette étude conduite sous contrat CIFRE a fait l'objet d'un contrat ANVAR n° O-81-08-057-N. Les études toxicologiques, réalisées à l'Institut PASTEUR de Lille dans le Service de toxicologie du Professeur D. MARZIN ont été financées par la Société SABE et le Ministère de la Recherche et de la Technologie (Contrat 84.5.1350).

## ABBREVIATIONS

C.C.M.	: chromatographie sur couche mince
D.	: dalton
D.L.	: dose létale
D.C.C.C.	: "Droplet counter current chromatograph"
EtOH	: éthanol
G.L.C.	: "gas liquid chromatography"
Glc	: D-glucose
H.P.L.C.	: "high performance liquid chromatography"
MeOH	: méthanol
M.S.	: matière sèche
P.S.	: pouvoir sucrant
Rb	: rébaudioside A
Rha	: rhamnose
St	: stéviolside
U.F.	: ultrafiltrat

# TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
INTRODUCTION	
GENERALITES	
LES EDULCORANTS	1
<u>I - DÉFINITIONS ET INTÉRÊTS</u>	1
A - <u>DEFINITIONS</u>	1
B - <u>INTERETS</u>	2
1) <u>INTERETS HEDONIQUES</u>	2
2) <u>INTERETS PHYSIOLOGIQUES</u>	4
<u>II - PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS ÉDULCORANTS</u>	8
A - <u>LES PROPRIETES GUSTATIVES ET PHYSICO-CHIMIQUES</u>	9
1) <u>LES EDULCORANTS NATURELS</u>	9
a - <i>A faible pouvoir sucrant</i>	9
b - <i>A haut pouvoir sucrant</i>	9
2) <u>LES EDULCORANTS SEMI-SYNTHETIQUES</u>	12
3) <u>LES EDULCORANTS DE SYNTHÈSE</u>	14
B - <u>ASPECT TOXICOLOGIQUE</u>	16
1) <u>LES EDULCORANTS NATURELS</u>	16
2) <u>LES EDULCORANTS SEMI-SYNTHETIQUES</u>	17
3) <u>LES EDULCORANTS SYNTHETIQUES</u>	17
C - <u>CONCLUSIONS</u>	20

	<u>Page</u>
<u>III - ASPECT LÉGISLATIF</u>	21
<u>A - LA LEGISLATION FRANCAISE</u>	21
1) <u>DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE</u>	21
2) <u>DANS LE DOMAINE ALIMENTAIRE</u>	22
<u>B - LA LEGISLATION COMMUNAUTAIRE ET QUELQUES             EXEMPLES EUROPEENS</u>	23
1) <u>LA LEGISLATION COMMUNAUTAIRE</u>	23
2) <u>LE ROYAUME UNI</u>	23
3) <u>LA BELGIQUE</u>	24
4) <u>L'ITALIE</u>	25
5) <u>L'ALLEMAGNE</u>	25
6) <u>LA SUISSE</u>	25
<u>C - LA LEGISLATION AMERICAINE</u>	25
<u>D - LA LEGISLATION JAPONAISE</u>	26
<u>IV - LES AUTORISATIONS</u>	27
<u>A - LES AUTORISATIONS EN FRANCE</u>	27
<u>B - LES AUTORISATIONS A L'ETRANGER</u>	28
<u>C - CONCLUSIONS</u>	28
<u>V - ASPECT TOXICOLOGIQUE. DEMANDE D'AUTORISATION D'EMPLOI</u>	30
<u>A - DANS LE DOMAINE ALIMENTAIRE</u>	30
1) <u>LE DOSSIER ANALYTIQUE</u>	30
2) <u>DOSSIER TECHNOLOGIQUE</u>	31
3) <u>DOSSIER TOXICOLOGIQUE</u>	31
a - <i>Epreuve de toxicité aiguë</i>	31
b - <i>Toxicité à terme</i>	31
c - <i>Etude des fonctions de reproductions</i>	32
d - <i>Epreuves de mutagénèse et cancérogénèse</i>	32
e - <i>Recherche des propriétés allergéniques et             des effets possibles sur les fonctions             immunitaires</i>	32
4) <u>NOTION DE DOSE JOURNALIERE ADMISSIBLE (DJA)</u>	33
5) <u>EXTRAPOLATION A L'HOMME DES RESULTATS OBTENUS SUR DES ANIMAUX</u>	33

	<u>Page</u>
B - <u>DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE</u>	34
VI - <u>LE MARCHÉ DES ÉDULCORANTS</u>	35
A - <u>LE MARCHÉ PHARMACEUTIQUE</u>	35
1) <u>EN FRANCE</u>	35
2) <u>A L'ETRANGER</u>	36
B - <u>LE MARCHÉ ALIMENTAIRE</u>	36
1) <u>EN FRANCE</u>	39
2) <u>A L'ETRANGER</u>	41
C - <u>CONCLUSIONS</u>	44
LE STEVIOSIDE	46
I - <u>HISTORIQUE ET PRÉSENTATIONS</u>	46
A - <u>INTRODUCTION</u>	46
B - <u>HISTORIQUE - STRUCTURE</u>	46
C - <u>LES DERIVES DU STEVIOSIDE</u>	48
D - <u>LA PRÉPARATION</u>	48
1) <u>LA CULTURE</u>	51
2) <u>METHODES DE DOSAGE</u>	51
3) <u>LA PRÉPARATION</u>	53
II - <u>LES PROPRIÉTÉS</u>	55
A - <u>LE POUVOIR SUCRANT</u>	55
B - <u>LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	57
C - <u>LES PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES</u>	57
1) <u>LES PROPRIETES PHYTOPHYSIOLOGIQUES</u>	57
2) <u>PROPRIETES DIVERSES</u>	61



	<u>Page</u>
III - <u>DONNÉES TOXICOLOGIQUES</u>	62
A - <u>LE STEVIOSIDE</u>	62
1) <u>TOXICITE AIGUË</u>	62
2) <u>TOXICITE A TERME</u>	64
a - <i>Analyses toxicologiques sub-aiguës</i>	64
b - <i>Toxicité chronique</i>	64
c - <i>Conclusions</i>	67
3) <u>PROPRIETES CONTRACEPTIVES</u>	67
4) <u>EFFETS MUTAGENES</u>	74
B - <u>LE STEVIOL</u>	76
1) <u>ACTIVITE ANTI-ANDROGENIQUE</u>	76
2) <u>ACTION SUR LA CHAÎNE DE PHOSPHORYLATION OXYDATIVE</u>	76
3) <u>ACTION MUTAGENE</u>	77
4) <u>PROPRIETES ANTITUMORALE</u>	78
C - <u>CONCLUSIONS TOXICOLOGIQUES</u>	78
IV - <u>APPLICATIONS ET UTILISATION DE LA STÉVIA</u>	79
A - <u>LES AUTORISATIONS</u>	79
B - <u>LES UTILISATIONS</u>	79
C - <u>CONCLUSION</u>	80
TRAVAUX PERSONNELS	
MATERIEL ET METHODES	
I - <u>LA PRÉPARATION</u>	81
A - <u>L'EXTRACTION</u>	81
B - <u>PREFILTRATION - CENTRIFUGATION</u>	82
C - <u>ULTRAFILTRATION</u>	82

	<u>Page</u>
D - <u>CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR RESINE ANIONIQUE AMBERLITE IRA 94 S</u>	82
E - <u>CONCENTRATION SUR RESINE AMBERLITE XAD<sub>2</sub></u>	84
F - <u>LA CRISTALLISATION</u>	84
G - <u>CHROMATOGRAPHIE A CONTRE-COURANT</u>	84
1) <u>MATERIEL</u>	84
2) <u>PREPARATION DES ECHANTILLONS</u>	84
3) <u>METHODES</u>	84
II - <u>CARACTÉRISATIONS ET DOSAGES</u>	85
A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE</u>	85
1) <u>LE STEVIOSIDE ET LE REBAUDIOSIDE</u>	85
2) <u>LE STEVIOL ET L'ISOSTEVIOL</u>	85
B - <u>CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE</u>	87
1) <u>LE STEVIOSIDE ET LE REBAUDIOSIDE</u>	87
a - <i>Le matériel</i>	87
b - <i>Préparation des échantillons</i>	87
c - <i>Méthode</i>	87
2) <u>LE STEVIOL ET L'ISOSTEVIOL</u>	89
a - <i>Matériel</i>	89
b - <i>Préparation des échantillons</i>	89
c - <i>Méthodes</i>	89
C - <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	89
1) <u>LE STEVIOSIDE ET LE REBAUDIOSIDE</u>	89
a - <i>Matériel et méthodes</i>	91
b - <i>Préparation des échantillons</i>	91
2) <u>LE STEVIOL ET L'ISOSTEVIOL</u>	91
a - <i>Matériel et méthodes</i>	91
b - <i>Préparation de l'échantillon</i>	91
III - <u>HYDROLYSE DU STÉVIOSIDE</u>	92
A - <u>HYDROLYSE CHIMIQUE : L'ISOSTEVIOL</u>	92
1) <u>REACTIFS</u>	92
2) <u>METHODE</u>	92

	<u>Page</u>
B - <u>HYDROLYSE ENZYMATIQUE : LE STEVIOL</u>	92
1) <u>REACTIFS</u>	92
2) <u>METHODE</u>	92
IV - <u>MÉTABOLISME DU STÉVIOSIDE ET DU RÉBAUDIOSIDE</u>	93
A - <u>ACTION DE LA FLORE CAECALE "IN VITRO"</u>	93
1) <u>MATERIEL</u>	93
a) <i>Produit</i>	93
b) <i>Matériel biologique</i>	93
c) <i>Milieu de culture</i>	93
2) <u>PROTOCOLE</u>	93
3) <u>ANALYSES</u>	94
B - <u>ACTION DE LA FLORE CAECALE "IN VIVO"</u>	94
1) <u>LE TRAITEMENT</u>	94
a) <i>Les produits</i>	94
b) <i>Les animaux</i>	94
c) <i>Méthode</i>	94
2) <u>ANALYSES</u>	95
a) <i>Dosage du stéviol</i>	95
b) <i>Dosage du stévioside et du rébaudioside</i>	95
V - <u>ÉTUDES TOXICOLOGIQUES</u>	96
A - <u>TRAITEMENT PAR GAVAGE</u>	96
B - <u>PRODUIT AJOUTÉ A L'EAU DE BOISSON</u>	98
RESULTATS	99
I - <u>CARACTÉRISTIQUES DE LA MATIÈRE PREMIÈRE</u>	99
A - <u>ASPECT EXTERIEUR DU LOT</u>	99
B - <u>TENEUR EN STEVIOSIDE ET REBAUDIOSIDE</u>	99
C - <u>DOSAGE DU STEVIOL</u>	101
D - <u>GRADIENT APICO-BASAL</u>	101
E - <u>CONCLUSION</u>	101

	<u>Page</u>
II - <u>PURIFICATION DU PRODUIT</u>	104
A - <u>L'EXTRACTION</u>	104
B - <u>PREFILTRATION ET CENTRIFUGATION</u>	110
C - <u>L'ULTRAFILTRATION</u>	111
1) <u>AU NIVEAU LABORATOIRE</u>	111
2) <u>AU NIVEAU INDUSTRIEL</u>	112
a - <i>Sur module SFEC</i>	112
b - <i>Ultrafiltration sur module MILLIPORE</i>	119
3) <u>CONCLUSIONS</u>	122
D - <u>DECOLORATION ET PURIFICATION SUR RESINE</u>	123
E - <u>CONCENTRATION SUR XAD<sub>2</sub></u>	129
F - <u>CRISTALLISATION</u>	130
G - <u>PURIFICATION SUR DCCC</u>	130
H - <u>CONCLUSIONS</u>	130
III - <u>CONTRÔLE QUALITÉ</u>	133
A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE</u>	133
B - <u>CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION</u>	133
C - <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	137
D - <u>POINT DE FUSION</u>	141
E - <u>CONCLUSIONS</u>	141
IV - <u>MÉTABOLISME DU STÉVIOSIDE ET DU RÉBAUDIOSIDE</u>	141
A - <u>ESSAIS PRELIMINAIRES IN VITRO : HYDROLYSE PAR LA FLORE CAECALE</u>	143
B - <u>METABOLISME DU STEVIOSIDE ET DU REBAUDIOSIDE IN VIVO</u>	145
1) <u>SOURIS GNOTOBIOTIQUES</u>	145
2) <u>SOURIS AXENIQUES</u>	149
3) <u>CONCLUSIONS</u>	153

	<u>Page</u>
V - <u>ÉTUDES TOXICOLOGIQUES</u>	153
A - <u>ETUDES PRELIMINAIRES</u>	155
1) <u>PREMIER ESSAI</u>	155
2) <u>DEUXIEME ESSAI</u>	158
3) <u>CONCLUSION DES ESSAIS PRELIMINAIRES</u>	159
B - <u>ETUDE DE TOXICITE FOETALE CHEZ LA SOURIS</u>	159
1) <u>OBSERVATION DES ANIMAUX, EVOLUTION PONDERALE</u>	159
2) <u>CRITERES DE FERTILITE</u>	161
3) <u>CONCLUSIONS</u>	162
C - <u>PRODUIT AJOUTE A L'EAU DE BOISSON</u>	164
1) <u>CONSOMMATION DE STEVIOSIDE</u>	164
2) <u>OBSERVATION DES ANIMAUX, EVOLUTION PONDERALE</u>	164
3) <u>CRITERES DE FERTILITE</u>	167
4) <u>CONCLUSION</u>	159
D - <u>CONCLUSIONS TOXICOLOGIQUES</u>	170
IV - <u>FAISABILITE DU PROJET</u>	171
A - <u>FAISABILITE INDUSTRIELLE</u>	171
B - <u>FAISABILITE SCIENTIFIQUE</u>	172
C - <u>FAISABILITE ECONOMIQUE</u>	172
CONCLUSION GENERALE	177

## BIBLIOGRAPHIE

## INTRODUCTION

Depuis 1977, le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Directeur : J. MONTREUIL) et la Société SABE (Directeur : A. TARTAR) sont confrontés aux problèmes nombreux engendrés par l'extraction d'édulcorants à partir de *Stévia Rebaudiana Bertoni*, plante du Paraguay. Ces études étaient entreprises dans le but de commercialiser le stévioloside, principe actif de la plante.

Le travail qui nous a été confié au départ a consisté à la mise au point d'un nouveau procédé industriel d'extraction. Cette étude a bénéficié d'une aide de l'ANVAR.

Une fois ce contrat rempli, nous nous sommes heurtés à des problèmes législatifs qui nous ont amenés à entreprendre l'étude toxicologique du stévioloside. Nous avons plus particulièrement étudié les propriétés de l'édulcorant vis-à-vis des fonctions de reproduction chez la souris.

Enfin, devant l'importance d'un tel projet, nous avons analysé la faisabilité au niveau scientifique, industriel et économique.

## GENERALITES

## LES EDULCORANTS

### I - DÉFINITIONS ET INTÉRÊTS

#### A - DEFINITION

Comme les définitions du dictionnaire pour "édulcorer" et "édulcorants" sont ambiguës, il nous a paru plus intéressant de comparer les verbes "sucrer" et "édulcorer" : ainsi,

- sucrer : c'est ajouter du sucre à un liquide, un aliment, c'est aussi adoucir avec du sucre ;
- édulcorer : c'est adoucir une boisson ou un médicament en y ajoutant du sucre.

Malgré ces deux définitions quasiment identiques il faut souligner qu'à l'origine, la notion d'édulcoration touchait plus le domaine pharmaceutique que le domaine alimentaire. En effet, il est certain que l'addition de sucre (37 000 tonnes en 1982) dans les préparations pharmaceutiques (sirop, comprimés...) a permis et permet encore des traitements thérapeutiques que le malade (essentiellement l'enfant) n'accepterait certainement pas dans d'autres conditions.

Ce n'est cependant pas une forte consommation de médicaments qui explique pourquoi le Français consomme 40 kg de saccharose par an ! C'est pourtant cette consommation excessive de sucre qui a nécessité la recherche de produits de substitution (les édulcorants) susceptibles de résoudre les problèmes nutritionnels. De plus l'application des édulcorants dans le domaine alimentaire fait que les intérêts économiques sont énormes et explique pourquoi les laboratoires intensifient leur recherche dans ce domaine.

S'il n'existe pas de définition classique pour le terme édulcorant, son emploi doit répondre à certains critères :

- donner une saveur sucrée aux aliments naturels ou de régime :
- l'édulcorant est un additif alimentaire ou un ingrédient ;



ou

- aider au traitement de divers troubles nutritionnels : l'édulcorant est une substance pharmaceutique ;

ou

- faciliter ou rendre plus agréable l'administration d'un médicament : l'édulcorant est un excipient.

Pour cela on demande à un édulcorant d'avoir :

- un fort pouvoir sucrant ;
- une grande stabilité ;
- des propriétés organoleptiques proches de celles du saccharose ;
- de ne pas laisser d'arrière-goût.

Le pouvoir sucrant (P.S.), principale propriété des édulcorants, est défini comme le rapport entre la concentration d'une solution de saccharose et celle d'un édulcorant donnant la même intensité sucrée (Tableau I p. 3). Il faut signaler que cette valeur varie en fonction de la concentration de la solution de saccharose (20 g/l ou 60 g/l), de l'individu, des conditions ou déterminations du pouvoir sucrant.

## B - INTERETS

### 1) INTERETS HEDONIQUES

L'effet hédonique (PANGBORN, (1)) correspond à la notion globale de plaisir éprouvé à la dégustation. Il intègre en dehors du goût sucré proprement dit, d'autres sensations telles que "viscosité", plénitude ou durée de la sensation, etc...

A l'heure actuelle, on pense que c'est au niveau de l'hypothalamus que les stimuli sensoriels gustatifs sucrés sont appréciés en tant que "plaisir" ou "non-plaisir". Enfin, il semble que la réponse hédonique au plaisir sucré soit innée et qu'elle existe dès les premières heures de la vie. Elle serait programmée avec l'espèce, jouerait un rôle physiologique et ne serait pas liée à l'éducation. Par ailleurs, les travaux de FAURION et Mac LEOD (2) montrent qu'il y a probablement

TABLEAU I : Les différents édulcorants

NATURE	DENOMINATION	POUVOIR SUCRANT
GLUCIDES	Saccharose *	1
	Lactose	0,4
	Maltose	0,5
	Galactose	0,6
	Glucose	0,7
	Fructose	1,5
POLYOLS	Sorbitol	0,6
	Xylitol	1
	Mannitol	1
	Maltitol	0,9
SYNTHESES	Saccharine	300
	Aspartame	200
	Cyclamate	30-50
	Acésulfame K	150-200
	Chlorogalactosaccharose	600
NATURELS	Thaumatine	1600
	Dihydrochalcone	2000
	Stéviolside	200
	Monelline	2500
	Miraculine	-
	Glycyrrhizine	50
	Hernandulcine	1000

\* Le saccharose est pris comme référence à  $20 \text{ g.l}^{-1}$



pluralité des récepteurs pour le sucré. Ceci explique qu'il puisse y avoir dans une population donnée des cas de "daltonisme" pour tel ou tel édulcorant.

Toutes ces données expliquent pourquoi l'homme a toujours été attiré par les aliments sucrés et qu'il s'en prive avec beaucoup de difficultés. Pendant des siècles, il a utilisé le miel, puis les sucres de canne et de betterave. Produit de luxe avant la révolution, le sucre fait partie intégrante de l'alimentation en 1900. Depuis le début du siècle, la consommation de sucre n'a cessé de croître dans les pays industrialisés. Les Français par exemple consomment dix fois plus de sucre qu'il y a cent ans.

De plus, si on en juge par l'expérience de panels de goûteurs, la perception et l'analyse des phénomènes gustatifs sont susceptibles d'être affinées exactement comme s'éduque l'oreille du musicien.

## 2) INTERETS PHYSIOLOGIQUES

L'évolution de l'alimentation est en grande partie la conséquence des progrès techniques obtenus en agriculture, en élevage et dans les diverses étapes de la chaîne agro-alimentaire jusqu'à la mise sur le marché de produits transformés souvent très élaborés.

Confrontés à de nouvelles conditions de vie et de travail, les Français ont réagi par des modifications sélectives de leur alimentation. Délaissant les aliments réputés "nourrissants" comme les céréales (le pain en particulier), les pommes de terre, les légumes secs, la population s'est tournée vers des aliments jugés "moins nourrissants" mais plus agréables comme la viande, les produits sucrés et ceux de consistance onctueuse.

D'une manière générale, la place des féculents dans la ration journalière a fortement diminué au cours des dernières décennies. En effet, en deux générations, les Français consomment deux fois moins de pain (1936 : 325 g/jour ; 1980 : 172 g/jour) et de pommes de terre (1925 : 178 kg/an ; 1975 : 90 kg/an). Si de nos jours, la consommation de sucre nature

(en poudre et en morceaux) est relativement stable (74 800 tonnes en 1982), les quantités incorporées à nos aliments et à nos boissons ont largement augmenté (987.000 tonnes en 1982). En effet, les boissons dites rafraîchissantes (sodas, fruités, Coca-Cola...) contiennent pour la plupart 90 à 130 g de sucre par litre, ce qui représente un apport de 1 500 à 2 200 kilojoules par litre (Tableau II p. 6).

Globalement, l'utilisation du sucre par les industries agro-alimentaires est passée de 450 000 tonnes en 1960 à 1 021 000 tonnes en 1982. Cette évolution a été particulièrement rapide ces dernières années dans certains secteurs comme la chocolaterie, la confiserie, les boissons rafraîchissantes, les sirops, les confitures, les conserves de fruits et les pâtisseries. Cette consommation intense de "sucre" représente plus de 50 p. 100 de l'apport calorique total.

A eux seuls le saccharose (40 kg/an) et le fructose (7 kg/an dans les fruits) représentent 16 p. 100 de l'apport calorique total (soit 14 000 kilojoules/jour). La diététique sépare les glucides à chaîne courte, dits sucres solubles des glucides à chaîne longue insolubles ou amyliacés. Les premiers étaient considérés comme des sucres rapides, les seconds comme des sucres lents. A l'heure actuelle, ces données sont à réviser et le facteur essentiel qui module l'absorption d'un glucide est son temps de séjour dans l'estomac qui est fonction de nombreuses variables (HERAUD (3)).

En effet, les disaccharides (saccharose) et les polysaccharides (amidon) sont rapidement hydrolysés (Figure 1 p. 7). L'absorption de tous ces monosaccharides se fait au niveau de l'intestin grêle et ils se retrouvent ainsi directement dans le sang. Ces sucres sont ensuite métabolisés et stockés sous forme de glycogène dans nos organes de réserve (foie, muscles) et de dérivés lipidiques au niveau des adipocytes pour servir aux dépenses d'énergie.

Il faut noter que l'absorption du fructose est lente (diffusion passive "facilitée") et que le lactose connaît un facteur limitant au niveau de son absorption entérale, par insuffisance ou absence de lactase. Enfin, seuls les amidons des légumineuses (haricots, lentilles, pois chiches) peuvent être considérés comme des glucides lents.

TABLEAU II : Teneur en saccharose de différentes boissons rafraîchissantes

MARQUES DE BOISSON	TENEUR EN SACCHAROSE g.l <sup>-1</sup>
Coca-Cola	108
Schweppes	78
Gini	112
Liptonic	90
Oasis orange	105
Banga orange	103
Joker	125



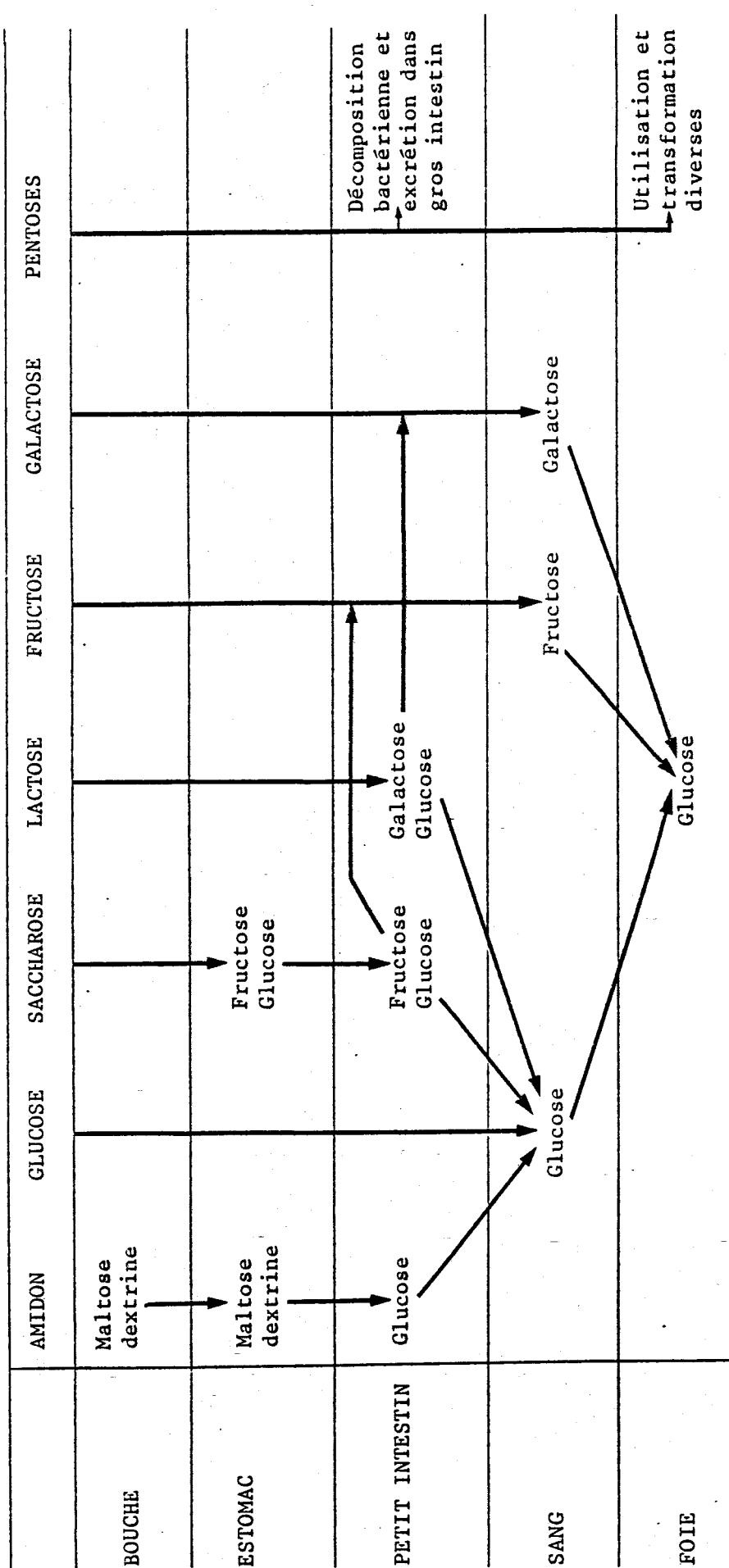


FIGURE 1 : Digestion et absorption des glucides



Ainsi depuis quelques années, le sucre ou plus exactement l'excès de consommation de sucre est devenu la cible des nutritionnistes. En effet, cet excès d'énergie est responsable de nombreuses situations pathologiques : excès de masse pondérale, obésité, diabète, hyperlipidémie, hypertriglycéridémie, caries dentaires... Pour ces malades, la réduction des glucides est une nécessité médicale. Le médecin nutritionniste dispose de deux moyens diététiques :

- le régime hypocalorique par l'absence de glucides qui prive le consommateur de toute saveur sucrée ;
- l'aide diététique où peuvent intervenir les édulcorants pour les personnes ne pouvant se passer de la saveur sucrée.

Par ailleurs, les nutritionnistes ont également mis en évidence un certain nombre d'intolérances aux sucres : une d'origine intestinale et l'autre d'origine hépatique. La première comprend l'intolérance au saccharose, à l'isomaltose (troubles dus à une perte d'activité de la saccharase et de l'isomaltase) au lactose (déficit en lactase) et la malabsorption du glucose et du galactose (trouble héréditaire dû à un défaut du transport actif du glucose et du galactose). Les intolérances d'origine hépatique sont la galactosémie et l'intolérance héréditaire au fructose (blocage de la transformation du fructose-1-phosphate en trioses phosphate, l'une des étapes de transformation du fructose en glucose).

*Le développement des édulcorants est né de cette situation.*

## II - PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS ÉDULCORANTS

Limité à une dizaine vers 1950, leur nombre a crû très rapidement et peut être estimé à plusieurs centaines. Compte-tenu de l'enjeu économique énorme, les recherches s'intensifient, d'une part, sur la synthèse chimique aidée par l'amélioration des connaissances de la chimio-perception du goût sucré (SHALLENBERGER (4), KIER (5), SCHIFFMAN (6)) et d'autre part, sur la recherche d'édulcorants naturels extraits d'espèces végétales d'Afrique ou d'Amérique du Sud.

L'avenir de ces molécules dépend tout d'abord de leurs propriétés gustatives et physico-chimiques et ensuite du dossier toxicologique qui est le véritable facteur limitant au développement de tout édulcorant.

## A - LES PROPRIETES GUSTATIVES ET PHYSICO-CHIMIQUES

### 1) LES EDULCORANTS NATURELS

#### a - *A faible pouvoir sucrant*

Le saccharose est l'édulcorant naturel le plus utilisé. Il est présent dans un grand nombre de plantes (racines, tiges ou fruits). Les plus utilisées pour son extraction sont la betterave à sucre et la canne à sucre. On en extrait aussi de la sève de l'érable à sucre du Canada et de certaines variétés de dattes.

La sensation de goût sucré du saccharose est remarquable et ce n'est pas par hasard qu'il est pris comme référence dans la détermination du pouvoir sucrant. Si les qualités du saccharose sont certaines, ses défauts et ses insuffisances appellent l'usage d'autres édulcorants. Aussi, les dérivés de l'amidon (glucose, sirop de glucose, fructose, sirop de fructose) sont en plein développement. La solubilité de ces édulcorants est supérieure à celle du saccharose et leur cristallisation plus difficile. Ils sont également plus hygroscopiques et réduisent ainsi le risque de développement microbien. On définit ces produits de la façon suivante :

- Les sirops de glucose sont des mélanges de glucose, de maltose et d'oligosaccharides obtenus par hydrolyse de l'amidon ;
- L'isoglucose est un sirop de glucose ayant une teneur minimale de 10 p. 100 en fructose ;
- Les sirops de fructose contiennent au minimum 95 p. 100 de fructose ;
- Le fructose est un produit pur à 99 p. 100.

#### b - *A haut pouvoir sucrant*

Le fort pouvoir sucrant de certains végétaux a attiré depuis longtemps l'attention des spécialistes. Cependant, les produits extraits de ces plantes sont inconnus du grand public car non encore commercialisés. Parmi ces édulcorants, le plus connu est la glycyrrhizine. Les autres sont



la thaumatine, la monelline, la miraculine, l'hernandulcine, les dihydrochalcones et le stéviol. Ils sont moins connus, mais possèdent également des propriétés remarquables (Tableau III p. 11).

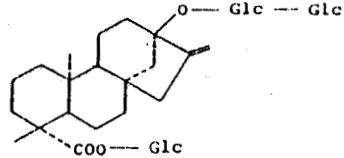
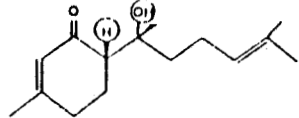
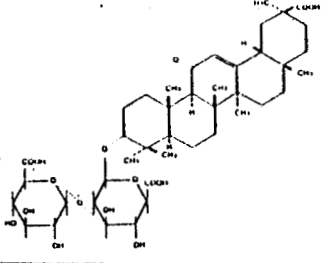
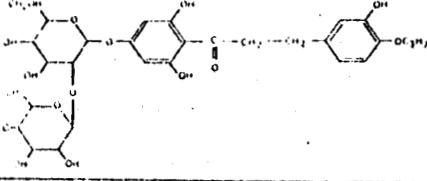
La glycyrrhizine est un glucoside dont l'aglycone est un triterpène pentacyclique de la famille des  $\beta$ -amyrines extrait de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*). Elle est plus connue comme additif liquoreux et produit à masquer le goût médicamenteux que comme édulcorant. Sous la forme de sel d'ammonium, elle possède un pouvoir sucrant 50 fois supérieur à celui du saccharose. Le sel d'ammonium très soluble dans l'eau est stable jusqu'à 105°C. Son arrière-goût intense limite fortement son emploi.

Le talin ou thaumatine est un mélange de protéines extraites du fruit *Thaumatococcus Daniellii* (plante d'Afrique occidentale). En 1974, VAN DER WEL (7) extrait les thaumatines I et II qui ne diffèrent que par cinq acides aminés. Ces protéines basiques sont composées de 207 acides aminés et ont une masse moléculaire d'environ 22 000 daltons. Mille six cents fois plus sucrantes que le saccharose, leur saveur sucrée n'est pas immédiate mais persistante avec un léger arrière-goût de réglisse. Leur stabilité est très variable suivant les milieux. Elles sont ainsi irréversiblement dénaturées à 55°C à pH 3,2. La dénaturation des protéines entraîne une perte du pouvoir sucrant. En dehors de ses propriétés sucrantes, il a été récemment découvert que la thaumatine était un exhausteur d'arômes surtout si ceux-ci sont volatils comme la menthe ou le café.

Extraite du fruit de *Dioscoreophyllum cumminsii*, plante de l'Ouest Africain, la monelline possède un pouvoir sucrant de 2 500 fois celui du saccharose. Elle est composée de deux chaînes d'acides aminés dont la séquence a été établie par FRANK et ZUBER (8). Protéine très fragile, son goût s'altère par hydrolyse à un pH inférieur à 2 ou pour une température supérieure à 60°C. La conservation du fruit et l'extraction de la molécule sont les principaux facteurs limitants au développement de la monelline.

Glycoprotéine extraite des fruits de *Sinsepalum dulcificum* la miraculine n'est pas un édulcorant mais un agent qui change le goût des produits acides en goût sucré. En fait, les physiologistes pensent que la

TABLEAU III : Les édulcorants naturels à haut pouvoir sucrant

Édulcorants Naturels	Année de la découverte	Origine de la plante	P.S.	Structures	Avantages	Inconvénients
Stéviolside	1931	Stevia Rebaudiana (Paraguay)	200		Stabilité	<ul style="list-style-type: none"> <li>- solubilité</li> <li>- goût</li> <li>- toxicologie</li> </ul>
Thaumatine	1974	Thaumatococcus Daniellii (Afrique occidentale)	1600	Protéine P.M : 21.500	Exhausteur d'arome "non toxique"	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stabilité</li> <li>- goût</li> </ul>
Monelline	1978	Dioscoreophyllum cumminsii (Afrique)	2500	Protéine P.M : 11.500		- stabilité
Miraculine	1974	Synsepalum dulcificum		Glycoprotéine P.M : 42.000		- stabilité
Hernandulcine	1570 1985	Lippia Dulcis (Mexique)	1000		stabilité	- arrière goût
Glycyrrhizine		Glycyrrhiza glabra	50		solubilité stabilité	<ul style="list-style-type: none"> <li>- arrière goût</li> <li>- toxicologie</li> </ul>
Dihydrochalcone NHDC	1968	Citrus aurantium (Espagne)	2000		"non toxique"	<ul style="list-style-type: none"> <li>- goût</li> <li>- solubilité</li> </ul>



saveur naturelle de cette glycoprotéine est sucrée mais que cette propriété ne peut se révéler qu'en présence d'acide. En effet, celui-ci modifierait le récepteur et permettrait l'interaction structure glucophore/structure glucosensible.

Il existe plusieurs dihydrochalcones obtenus à partir des constituants flavonoïdiques amers des fruits de la famille des *Citrus* (HOROWITZ, (9)). Des glycosides, on passe aux chalcones par action d'une base suivie d'une précipitation acide puis aux dihydrochalcones par hydrogénation catalytique. Le mieux connu, le néohespéridine dihydrochalcone (Neo HDC) possède un pouvoir sucrant de 2 000 fois celui du saccharose. Il est instable en milieu acide et à haute température. Sa solubilité est de  $1,2 \text{ g.l}^{-1}$ . Le principal inconvénient est lié aux effets hédoniques. On remarque, en effet, un délai de perception du goût sucré et un arrière-goût légèrement amer et liquoreux avec un effet réfrigérant similaire à celui du menthol (DUBOIS, (10)).

L'hernandulcine extraite de *Lippia dulcis* plante mexicaine décrite en 1570 par Francisco HERNANDEZ a été isolée et purifiée récemment par COMPADRE (11). Certains auteurs pensent que le principe sucré est volatil et différent de la glycyrrhizine.

## 2) LES EDULCORANTS SEMI-SYNTHETIQUES

Ces édulcorants proviennent d'extraits végétaux modifiés chimiquement de façon à faire apparaître un pouvoir sucrant ou à l'exacerber.

La figure 2 page 13 regroupe les différents polyalcools que l'on peut trouver sur le marché ainsi que leurs origines. La plupart de ces dérivés sont obtenus par hydrogénation catalytique de mono ou d'oligosaccharides mais ils existent également à l'état naturel dans de nombreux végétaux. Ils possèdent un pouvoir sucrant proche de celui du saccharose. Ces polyalcools sont particulièrement intéressants du fait de leur

- grande stabilité chimique ;
- propriétés physico-chimiques ;
- propriétés rhéologiques ;
- activité pharmacodynamique.

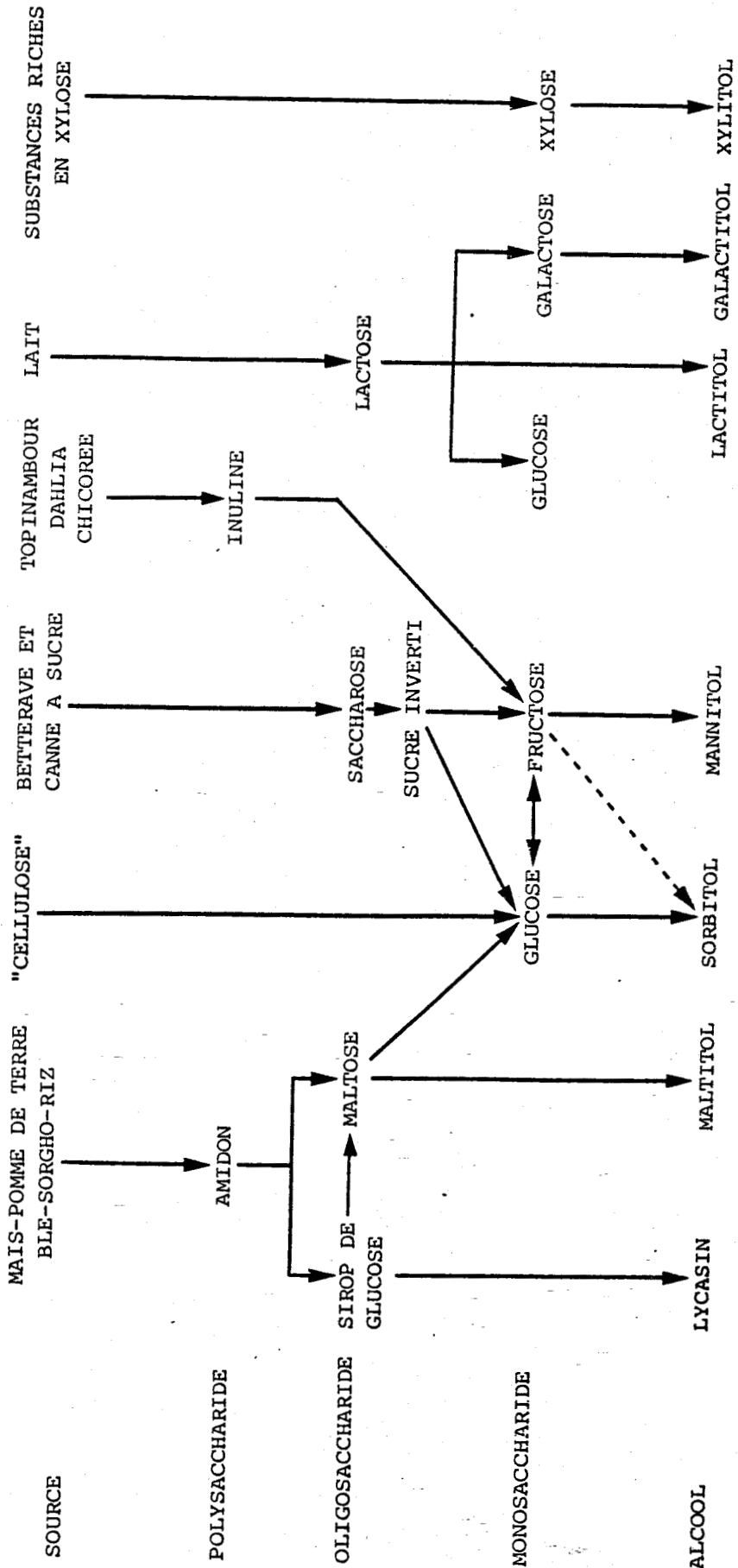


FIGURE 2 : Les polyalcools et leurs sources



Le chloro-galacto-saccharose a été synthétisé récemment (KHAN (12)) et a fait l'objet d'une prise de brevet (Tate & Lyle). Il possède un pouvoir sucrant de 600 fois celui du saccharose.

### 3) LES EDULCORANTS DE SYNTHÈSE

Ces molécules nouvelles, fruits du hasard ou d'une recherche délibérée des chimistes, possèdent un fort pouvoir sucrant et un certain nombre de propriétés en relation directe avec leur structure (Tableau IV p. 15).

Découverte de façon tout à fait fortuite en 1879 par REMSEN et FAHLBERG (13) la saccharine ou sulfimide benzoïque est l'édulcorant de synthèse le plus anciennement connu et utilisé. Son pouvoir sucrant est très élevé : 300 à 500 fois celui du saccharose. Sa saveur sucrée est franche mais accompagnée d'un désagréable arrière-goût amer. Sa faible solubilité ( $3 \text{ g.l}^{-1}$ ) nécessite son utilisation sous forme de sel ; le plus utilisé est le saccharinate de sodium qui possède une solubilité de  $830 \text{ g.l}^{-1}$ . On peut la trouver également sous forme de sel d'ammonium. La saccharine est stable jusqu'à  $500^{\circ}\text{C}$ .

Le cyclamate ou acide cyclo-hexylsulfamique synthétisé en 1937 est utilisé sous forme de sel de sodium ou de calcium. Son pouvoir sucrant n'est pas très élevé : 50 fois celui du saccharose. Il est surtout employé en mélange avec la saccharine. Il est acalorique, stable à la température et assez soluble ( $210 \text{ g.l}^{-1}$ ).

Isolé en 1965 par des chercheurs qui essayaient de synthétiser la gastrine, l'aspartame résulte de l'association de deux amino-acides naturels, l'acide L-aspartique et la L-phénylalanine sous forme d'ester méthylique. Son pouvoir sucrant est égal à 200 fois celui du saccharose mais contrairement à la saccharine, au cyclamate et autres édulcorants de synthèse, l'aspartame est calorique ( $1 \text{ g} = 16,7 \text{ kilojoules}$ ). Il apporte cependant 200 fois moins de calories que le sucre. Sa sensation sucrée est forte, proche de celle du saccharose et dépourvue d'arrière goût. Il est soluble dans l'eau ( $10 \text{ g.l}^{-1}$ ) et stable jusqu'à  $105^{\circ}\text{C}$ . Selon DUMAS (14), en solution aqueuse l'aspartame est stable 3 semaines à  $4^{\circ}\text{C}$ , 1 semaine à  $20^{\circ}\text{C}$  et 15 minutes à  $120^{\circ}\text{C}$ . Il s'hydrolyse avec formation d'aspartyl-phénylalanine qui se cyclise en dicétopiperazine (DKP). Ce dernier composé ne possède pas de saveur marquée et existe d'ailleurs déjà

TABLEAU IV : Les édulcorants de synthèse et semi-synthétiques

	Année de la découverte	P.S.	Structures	Inconvénients	Avantages
Saccharine	1879	300		<ul style="list-style-type: none"> <li>- problèmes toxicologiques</li> <li>- arrière-goût amer</li> </ul>	sa stabilité
Cyclamate	1957	30-50		<ul style="list-style-type: none"> <li>- problèmes toxicologiques</li> <li>- faible P.S.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>masque le goût amer de la saccharine</li> </ul>
Aspartame	1965	200		<ul style="list-style-type: none"> <li>- sa stabilité</li> </ul>	goût proche du saccharose
Acésulfame K	1973	150 200		<ul style="list-style-type: none"> <li>- léger arrière-goût</li> </ul>	sa stabilité
Chloro-galacto-saccharose	1980	600		<ul style="list-style-type: none"> <li>- problèmes toxicologiques</li> </ul>	



dans l'aspartame commercialisé (2 p. 100). Enfin, l'aspartame n'est pas stable en milieu alcalin.

L'acésulfame K ou dioxyde de l'oxathiazinone découvert en 1973 par CLAUSS et JENSEN (16) est le dernier né des édulcorants de synthèse. Son pouvoir sucrant est de l'ordre de 150 à 200 fois celui du saccharose. Il présente une parenté de structure avec la saccharine. Sa saveur sucrée est agréable et proche de celle du saccharose avec cependant un léger arrière-goût amer. Il est très stable à la température (jusqu'à 500°C) et très soluble (270 g.l<sup>-1</sup>).

## B - ASPECT TOXICOLOGIQUE

### 1) LES EDULCORANTS NATURELS

En dehors de la glycyrrhizine, de la thaumatine et du stéviolside, les édulcorants naturels ont fait l'objet de peu d'études toxicologiques.

En effet, en ce qui concerne les molécules protidiques, leur très faible stabilité en limite le développement et n'incite pas les laboratoires à se lancer dans des études toxicologiques longues et coûteuses.

Bien que possédant quelques vertus thérapeutiques (anti-inflammatoire, anti-ulcéreux) la glycyrrhizine présente une certaine toxicité à forte dose. En effet, bien que reconnue comme substance G.R.A.S. (Generally Recognized As Safe) elle peut entraîner la formation d'œdèmes des membres inférieurs, provoquer une hypertension artérielle (HERAUD, (15)), favoriser la polyurie associée à une polydypsie et être à l'origine de crises de tétanie. On attribue les effets toxiques de la glycyrrhizine à sa parenté structurale avec les hormones corticosurrénales, et notamment la désoxycorticostérone précurseur de l'aldostérone.

Enfin, en ce qui concerne la thaumatine, la connaissance de la séquence de la protéine laisse supposer une digestion protéolytique

aisée. Ceci a été amplement démontré par des études in vitro et in vivo. De plus, depuis 1976, la thaumatine a été soumise à un programme étendu d'évaluation de la sécurité du consommateur comprenant des études de toxicités aiguës et sub-aiguës de 90 jours, sur rats et chiens ; des études de tératologie et de mutagénicité ainsi que des études d'allergie et de digestion sur des animaux et des volontaires humains. Tous ces essais ont démontré qu'il n'y avait pas d'effet nocif même à des doses allant jusqu'à 80 000 fois la dose normale. Le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine de la Communauté Européenne a jugé la thaumatine temporairement acceptable.

Les propriétés toxicologiques du stéviolside seront analysées ultérieurement (cf chapitre : Le stéviolside § III p. 62).

## 2) LES EDULCORANTS SEMI-SYNTHETIQUES

Le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine qui s'est réuni le 14 septembre 1984 à Bruxelles, n'a pas fixé de D.J.A. (Doses Journalières Admissibles, définies au § V-A-4 p. 33) pour le sorbitol, le xylitol, le lactitol, le mannitol et le maltitol. Ils sont néanmoins considérés comme toxicologiquement acceptables avec certaines restrictions.

Un effet laxatif pourrait être observé après une ingestion élevée, ce qui a entraîné la Commission à fixer une consommation maximale journalière de polyols équivalente à 20 g.

En ce qui concerne le chloro-galacto-saccharose, les études toxicologiques sont en cours. Il faut cependant souligner que le tribromo-galactosaccharose est apparu comme un inhibiteur de la fertilité chez le Rat (effet "pilule masculine").

## 3) LES EDULCORANTS SYNTHETIQUES

La saccharine, l'aspartame, le cyclamate et l'acésulfame, quatre édulcorants largement utilisés, subissent de nombreuses attaques et doivent sans cesse prouver leur innocuité.

En effet, bien qu'anciennement et largement utilisée, la saccharine est au centre des polémiques sur la non-toxicité des édulcorants de synthèse.



Alors qu'elle est utilisée depuis 1900, pour l'alimentation des diabétiques, on n'a relevé aucune toxicité particulière. De nombreuses études toxicologiques menées ces dernières années ont abouti à des résultats contradictoires. Par exemple des cancers de la vessie ont été observés par PRICE (16) et ALLEN (17) puis confirmés par BRYAN (18). Ces études effectuées chez le Rat montrent une augmentation significative de l'apparition de tumeurs vésicales pour une forte absorption de saccharine (au moins 5 p. 100 du régime). Des études épidémiologiques ont montré une différence de comportement entre le Rat et l'Homme. Cependant le National Cancer Institute ainsi que MORISSON et BURING (19) n'ont trouvé aucune relation entre le cancer de la vessie et l'utilisation de saccharine. L'incohérence des résultats observés et décrits pourrait être due à la présence d'impuretés contenues en quantités différentes suivant la méthode de préparation. Ainsi, la saccharine fabriquée suivant la méthode de MAUMEE (20) contient moins d'orthotoluène sulfamide (OTS) (principale impureté) que celle fabriquée suivant la méthode de REMSEN et FAHLBERG (13).

Par ailleurs, des études pharmacocinétiques ont montré que la saccharine est rapidement résorbée par le tube digestif et excrétée telle quelle dans les urines à raison de 98 p. 100 de la dose ingérée. Cette absence de biotransformation est confirmée aussi bien chez l'Homme que chez le Rat.

Au vu de tous ces résultats contradictoires, l'innocuité de la saccharine est un problème souvent remis en question. Il est toutefois certain que l'état de pureté du produit est un facteur très important. Encore de nos jours, de nombreuses autres études toxicologiques sont entreprises dans le monde.

La toxicité du cyclamate est également discutée et semble être liée à ses trois métabolites : le cyclohexylamine (CHA), le cyclohexanol et le cyclohexane.

En 1970, BRYAN et ERTURKE (21) démontrent que le cyclamate provoque des cancers de la vessie. Des contre-expertises réalisées par MOSTARDI en 1972 (22), BRANTOM en 1973 (23), DICK en 1974 (24), HARDY en 1976 (25), ERSHOFF en 1977 (26) dans des conditions strictes et contrôlées, aboutissent toujours à une absence de potentiel cancérigène. En 1976, le

National Cancer Institute a publié un rapport précisant qu'il n'existait, à l'heure actuelle, aucune preuve de cancérogénicité des cyclamates et de la cyclohexylamine chez l'Homme. Pourtant, en 1970, TUCHMANN-DUPLESSIS (27) ont noté une baisse de la fertilité chez le Rat.

Interdits aux Etats-Unis depuis 1970, les cyclamates font toujours l'objet de recherches par les laboratoires ABBOT. Même si la F.D.A. (Food and Drug Administration) et la National Academy of Science admettent que les cyclamates ne sont pas cancérogènes, il sera cependant nécessaire de poursuivre les recherches et de s'assurer que les cyclohexylamines n'ont pas d'autres effets toxiques. Toutes les études réalisées depuis conduisent une fois encore à des résultats contradictoires (FERRANDO (28), WOLF (29)). Les études de métabolisme réalisées chez l'Homme montrent que le cyclamate est métabolisé et excrété sous forme de cyclohexylamine en quantité variable (1 à 40 p. 100). Il semblerait que le rôle de la flore intestinale soit essentiel dans l'apparition de ce composé. De nombreuses bactéries (entérocoques chez l'Homme, clostridium chez le Rat) transforment le cyclamate en cyclohexylamine.

Au vu de tous ces résultats, la saccharine et le cyclamate semblent être des promoteurs de tumeurs et se situent dans le groupe 3 de la classification du I.A.R.C. (International Agency of Research on Cancer).

A l'heure actuelle, l'aspartame est certainement l'édulcorant dont les données toxicologiques sont les plus complètes. Elles représentent pour le Laboratoire SEARLE vingt ans de recherche. Le premier dossier toxicologique de l'aspartame a été soumis à la F.D.A en 1973. Incomplet ce dossier a nécessité de nouvelles études tant sur le produit que sur ses métabolites. En effet, dans l'organisme, l'aspartame s'hydrolyse au niveau intestinal libérant de la phénylalanine, de l'acide aspartique et du méthanol. Des travaux in vivo (RANNEY (30)) ont montré que ces composés n'interféraient avec aucun métabolisme. On a examiné avec beaucoup d'attention le problème de la réaction possible de l'aspartame et de la dicétopiperazine (DKP) avec les nitrites pour former des nitrosamines (FONDU (31)). Il semble en effet possible qu'en solution, l'aspartame se cyclise légèrement et donne naissance à des traces de dicétopiperazine. Ces travaux n'ont mis en évidence aucune formation de nitrosamine dans l'estomac.

Au total, toutes ces études toxicologiques démontrent que l'aspartame, la DKP et leurs produits de dégradation sont dénués de toute toxicité et ce, à des doses atteignant 5 g/kg/jour. De même en administration chronique, l'aspartame n'a provoqué la survenue d'aucune pathologie tumorale, d'aucune lésion organique et d'aucune variation des constantes biologiques. Les études des pouvoirs mutagène, cancérigène, tératogène ainsi que les études sur les fonctions de reproduction se sont révélées négatives tant avec l'aspartame qu'avec la DKP. Par ailleurs, l'aspartame est dénué de tout effet pharmacologique propre. Les sujets diabétiques ont fait l'objet d'études de tolérance et il a été établi que l'aspartame ne présentait aucun inconvénient pour ces sujets.

Enfin, comme aucun édulcorant n'est parfait, il faut signaler que certains travaux ont démontré une toxicité de l'aspartame due à une estérification de la phénylalanine. Plus récemment, OLNEY (32) a déclaré que l'ingestion d'aspartame pouvait endommager les cellules nerveuses et créer des tumeurs cérébrales bénignes.

La dernière remarque concernant l'aspartame est que la formation de phénylalanine est une contre-indication majeure pour les individus présentant certaines déficiences enzymatiques d'origine héréditaire conduisant à des maladies connues : la phényl-cétonurie et l'alcaptonurie. En fonction de tous ces résultats, la D.J.A. a été fixée à 50 mg/kg/jour.

Enfin, au cours des 15 dernières années de nombreuses études toxicologiques ont été effectuées sur l'acésulfame. Elles comprenaient des études de toxicité chronique aux Pays-Bas ainsi qu'en Allemagne, aux U.S.A. et en Suisse. Par ailleurs, de part sa faible stabilité en milieu acide (pH inférieur à 3), son principal produit de dégradation, l'acéto-acétamide est également étudié du point de vue sécurité dans une étude subchronique. En conclusion, ces dossiers toxicologiques déposés depuis 1979 auprès de la FDA devraient faire l'objet d'une autorisation d'emploi avant 1987.

#### C - CONCLUSIONS

Comme nous venons de le voir, aucun édulcorant n'est parfait. Aussi, chaque édulcorant et principalement ceux à haut pouvoir

sucrant nécessitent des études nombreuses et complexes pour plusieurs raisons :

- Il s'agit pour la plupart de molécules nouvelles n'ayant pas un long passé dans l'alimentation humaine. La fragilité de certaines molécules (en particulier l'aspartame, la saccharine et la thaumatine) peut amener l'apparition de produits de dégradation nécessitant leur propre étude toxicologique.

- Certaines molécules présentent du point de vue chimique des analogies avec des composés hormonaux par exemple, d'où des risques d'interférences lors du métabolisme (cas du stéviolside, de la glycyrrhizine).

- Certains procédés de fabrication peuvent conduire à la formation de produits annexes toxiques comme l'orthotoluène sulfamide de la saccharine par exemple.

Toutes ces raisons font que des organismes comme la Food and Drug Administration ou le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine sont très prudents et très exigeants sur la qualité des dossiers toxicologiques pour délivrer des autorisations d'emploi d'édulcorants même temporaires.

Enfin, il faut souligner que si les propriétés gustatives et physiologiques des différentes molécules sont utilisées comme arguments commerciaux, les problèmes toxicologiques sont exploités par la concurrence afin de protéger leurs produits sur un marché en plein développement.

### III - ASPECT LÉGISLATIF

#### A - LA LEGISLATION FRANCAISE

##### 1) DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE

Il n'existe pas en pharmacie de liste positive d'emploi des édulcorants (liste positive : tout ce qui n'est pas autorisé expressément est interdit). Leur utilisation, soit en tant qu'agent sucrant pour diabétiques, soit comme excipient doit faire l'objet d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) après avis de la Commission compétente du Ministère de la Santé sur examen des dossiers analytiques toxicopharmacologique et

alimentaire (cf § V p. 30). Toutefois, l'emploi comme adjuvant de fabrication est possible si la substance est déjà autorisée comme principe actif ou si elle est inscrite à la Pharmacopée Française.

## 2) DANS LE DOMAINE ALIMENTAIRE

Dans le domaine alimentaire, la réglementation française des édulcorants s'appuie essentiellement sur deux lois remontant au début du siècle.

- La loi du 30 mars 1902 stipule qu'il "est interdit pour tout usage autre que la thérapeutique, la pharmacie et la préparation de produits non alimentaires, l'emploi de la saccharine ou de toutes autres substances édulcorantes artificielles possédant un pouvoir sucrant supérieur à celui du sucre de canne ou de betterave sans en avoir les qualités nutritives".

La loi de 1902 interdit donc l'emploi en alimentation de toute substance qui présente en même temps les caractères suivants :

- être artificielle ;
- posséder un pouvoir sucrant supérieur à celui du sucre ;
- être dépourvue des qualités nutritives du sucre.

Cette loi : - concerne donc les édulcorants de synthèse à haut pouvoir sucrant (saccharine, aspartame, cyclamate, acésulfame K).

- ne concerne pas les sucres et les polyols à faible pouvoir sucrant et présentant certaines propriétés nutritives.

Seules les molécules extraites de végétaux posent un problème. En effet, est-ce que le stéviolside et la thaumatococine, par exemple, sont concernés par cette loi ? Ils possèdent un fort pouvoir sucrant mais sont naturels et présentent certaines qualités nutritives par l'intermédiaire de leur glucose ou de leurs acides aminés obtenus après hydrolyse.

Il faut souligner que cette loi a été suspendue pendant les guerres de 1914-1918 et de 1940-1945 et a ainsi autorisé la saccharine en alimentation. Enfin, il semble que l'interprofession des sucriers ne soit pas étrangère au maintien de cette loi qui est pourtant couverte par celle de 1905.

- La loi du 1er Août 1905 sur la répression des fraudes permet de réglementer les aliments, les processus de fabrication et les conditions de détention et de vente des aliments. Elle réglemente l'utilisation des sucres en alimentation et a ainsi conduit l'administration à interdire le xylitol pour raisons médicales, à réduire l'emploi du sorbitol, du mannitol et du fructose pour des raisons d'usage ou de réglementation.

Sur le plan juridique, il convient donc de distinguer les édulcorants "artificiels" entrant dans le champ d'application de la loi du 30 mars 1902 et les autres édulcorants considérés comme des additifs et, à ce titre, visés par le décret du 15 avril 1912 modifié.

#### B - LA LEGISLATION COMMUNAUTAIRE ET QUELQUES EXEMPLES EUROPEENS

Il est difficile de décrire d'une manière précise toutes les réglementations étrangères relatives aux édulcorants. Cependant, quelques indications peuvent être données sur les prescriptions en vigueur dans certains pays.

##### 1) LA LEGISLATION COMMUNAUTAIRE

Actuellement, il n'existe pas de législation communautaire concernant les édulcorants. Cependant, le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine à Bruxelles a examiné en septembre 1984 le statut toxicologique des édulcorants les plus couramment utilisés : Aspartame, saccharine, cyclamate, acésulfame K, polyols, thaumatine, stéviolside. Il est probable qu'à la suite de cet avis (cf D.J.A. Tableau VIII p. 38), les services de la Commission élaborent un projet de directive destiné à établir la liste des substances susceptibles d'être utilisées comme substituts du sucre dans l'alimentation humaine.

##### 2) LE ROYAUME UNI

La législation anglaise sur les édulcorants est fondée sur la loi du 6 septembre 1983 élaborée à partir des travaux du comité d'étude sur les additifs alimentaires et les contaminants publiés en 1982.

Ce comité a classé les édulcorants dans 5 groupes (de A à E) selon l'importance des expérimentations toxicologiques complémentaires devant être réalisées.

Dans le groupe A, à savoir les substances dont l'emploi dans les denrées alimentaires est acceptable sans nécessité de fournir des informations complémentaires, figurent l'aspartame et l'acésulfame.

Dans le groupe B, c'est-à-dire celui des substances qui peuvent être acceptées pour leur usage en alimentation mais pour lesquelles certaines informations sont requises, sont mentionnés la saccharine et ses sels, les cyclamates et les polyols.

### 3) LA BELGIQUE

L'incorporation d'édulcorants dans les "denrées alimentaires préparées sans sucre" est autorisée. L'arrêté royal du 12 juillet 1984 a rendu licite l'incorporation des édulcorants cités ci-après dans les conditions suivantes :

Xylitol : dose maximale : 500 mg/kg	confitures et gelées "sans sucres"
dose maximale : 3 g/pièce	confiserie
Aspartame : dose maximale : 500 mg/l	limonades préparées "sans sucres"
Saccharine : dose maximale : 125 mg/l	limonades préparées "sans sucres"
Néohespéridine dihydrochalcone :	
dose maximale : 50 mg/l	limonades "sans sucres"
dose maximale : 400 mg/kg	gommes à mâcher

En outre, l'emploi de la saccharine et de la néohespéridine dihydrochalcone est autorisé dans la bière acide de catégorie S.

Par ailleurs, l'arrêté royal du 18 janvier 1984 réglemente le commerce des édulcorants destinés à être livrés directement au consommateur. Ce texte fixe la liste des substances pouvant être mises en vente avec la dénomination "édulcorant" et prévoit les critères de pureté et les caractéristiques auxquels doivent satisfaire les dites substances. Il s'agit des produits suivants : la saccharine et ses sels de sodium et de calcium, les cyclamates de sodium et de calcium, et l'aspartame.

#### 4) L'ITALIE

Le décret loi du 25 février 1980 relatif à la fabrication, à l'emploi et à l'importation de la saccharine et des autres édulcorants artificiels, interdit l'utilisation de ces substances dans les boissons et les denrées alimentaires.

Cependant des autorisations peuvent être accordées par le Ministre de la Santé, pour l'incorporation d'édulcorants artificiels dans les produits diététiques et de régime.

Le dossier de l'aspartame serait en cours d'examen.

#### 5) L'ALLEMAGNE

Les édulcorants sont soumis à la réglementation générale sur les additifs alimentaires et, à ce titre, ils sont régis par l'ordonnance du 22 décembre 1981, modifiée par l'ordonnance du 13 mars 1984, sur l'autorisation d'emploi des additifs.

#### 6) LA SUISSE

L'ordonnance sur les denrées alimentaires, dans sa version modifiée du 11 avril 1984, prévoit que les édulcorants autres que ceux avec un pouvoir sucrant supérieur à celui du saccharose et possédant une valeur nutritive faible, ne peuvent être additionnés aux denrées alimentaires que pour des raisons diététiques.

Par ailleurs, le commerce des préparations édulcorantes est soumis à une autorisation préalable de l'office fédéral.

#### C - LA LEGISLATION AMERICAINE

La fabrication et la commercialisation des produits alimentaires aux Etats-Unis sont régies par diverses lois dont le "Food, Drug and Cosmetic Act" qui interdit notamment la mise sur le marché de produits frelatés, contenant des substances estimées nocives ou dangereuses, non convenablement étiquetés ou présentés d'une manière susceptible de tromper l'acheteur sur la nature ou la quantité du produit proposé à la vente.

Cette loi a été complétée par le "Fair Packaging and



Labeling Act" de 1966 qui a fixé d'une manière plus précise les règles d'étiquetage des produits conditionnés pour la vente au détail.

En fonction de la nature des produits, plusieurs organismes sont chargés de l'application de ces lois :

- l'"Animal and Plant Health Inspection Service (A.P.H.I.S.) - Meat and Poultry Products Inspection" du Département de l'Agriculture, pour les viandes, les volailles et les produits dérivés, à l'exception du gibier ;
- le "Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms" (B.A.T.F.) du Département du Trésor, pour les boissons alcoolisées ;
- La "Food and Drug Administration" (F.D.A.) du Département de la Santé et du Bien-Etre Social, pour les autres produits alimentaires.

La politique de la F.D.A. vise pour l'essentiel à contrôler la salubrité des produits offerts au consommateur et à fixer, pour certains d'entre eux, des règles de composition impératives ("Standards of identity") de manière que, sur l'ensemble du territoire des Etats-Unis, les produits vendus sous une appellation donnée correspondent à une composition définie.

Si après analyse du dossier toxicologique et publication des résultats dans le Registre Fédéral, aucune réclamation n'est enregistrée, la F.D.A. inscrit l'édulcorant sur une liste d'additifs préconisés G.R.A.S. (Generally Recognized As Safe).

#### D - LA LEGISLATION JAPONAISE

La législation japonaise classe les additifs alimentaires en deux catégories :

- les additifs synthétiques qui ont été synthétisés artificiellement à partir de substances chimiques ;
- les additifs naturels qui ont été extraits ou fabriqués à partir de matériel naturel.

L'autorisation d'utilisation des additifs de synthèse (347 en 1984) n'est donnée que lorsque le Ministère de la Santé, après consultation du F.S.S.C. (Food Sanitation Study Committee), a vérifié que le produit ne présentait pas de danger pour la santé humaine.

En ce qui concerne les additifs naturels, les utilisations sont généralement libres. Une qualité standard a été définie pour tous les édulcorants de synthèse et une partie des édulcorants naturels. Cette liste de standards établie par la Food Sanitation Act. précise la nature de l'aliment concerné, l'édulcorant utilisé et les normes d'utilisation. L'obligation de préciser sur l'étiquetage la mention naturel ou synthétique a affecté ou favorisé le développement d'un certain nombre d'édulcorants (Tableau X p. 43).

#### IV - LES AUTORISATIONS

##### A - LES AUTORISATIONS EN FRANCE

Au niveau français, devant les demandes d'autorisation d'emploi formulées par différents industriels, le Conseil Supérieur d'Hygiène Public (C.S.H.P.) a créé en son sein une Commission particulière qui est chargée de redéfinir la classification des édulcorants et d'évaluer les risques toxicologiques. Les deux commissions spécialisées (hygiène alimentaire et sécurité alimentaire) du C.S.H.P. se sont d'ores et déjà prononcées pour une refonte de la réglementation qui pourrait aboutir à l'autorisation en France de ces succédanés du sucre.

Néanmoins, l'attente d'une décision communautaire pourrait retarder la mise en place d'une réglementation française.

A l'heure actuelle, la situation est assez simple. Le glucose ne fait l'objet d'aucune réglementation particulière ce qui n'est pas le cas de l'isoglucose dont la production est limitée depuis 1979 par un jeu de quotas comparables à ceux qui régissent la production de sucre.

Les polyols autorisés en thérapeutique et en alimentation sont remis en cause pour leurs effets laxatifs.

En ce qui concerne les édulcorants à haut pouvoir sucrant, seuls la saccharine, l'aspartame et les cyclamates sont autorisés dans le domaine pharmaceutique.

## B - LES AUTORISATIONS A L'ETRANGER

Si pour la France la situation est assez simple, il n'en est pas de même au niveau international. L'histoire de la saccharine et du cyclamate en sont de bons exemples.

En effet, aux Etats-Unis les édulcorants de synthèse ont subi de nombreuses attaques plus ou moins justifiées. La saccharine introduite à grand fracas en 1907 fut retirée en 1912. Le cyclamate commercialisé en 1950 fut interdit en 1969. De même l'aspartame commercialisé en 1974, après autorisation de la F.D.A fut retiré par cette même F.D.A, le 5 décembre 1975.

A l'heure actuelle, la saccharine est autorisée aux Etats-Unis mais pas au Canada, alors que le cyclamate est autorisé au Canada mais pas au U.S.A. En France, la saccharine et le cyclamate sont autorisés en pharmacie mais pas en alimentation. L'acesulfameK autorisé au Royaume Uni et bientôt en R.F.A. n'est pas autorisé aux U.S.A.

Enfin, l'aspartame qui semble dépourvu de toxicité est autorisé dans pratiquement tous les pays en tant que produit pharmaceutique mais pas en alimentation. Seuls les Etats-Unis, le Canada, le Japon et quelques pays Européens autorisent l'aspartame dans les boissons. En ce qui concerne sa présence dans l'alimentation, il fait encore l'objet de discussions à la F.D.A. Le Japon, enclin aux molécules naturelles, a autorisé la thaumatine en mai 1979 ainsi que le stéviolside dans les domaines pharmaceutique et alimentaire.

## C - CONCLUSIONS

Il est à remarquer que les pays où la législation est la plus large, comme la Grande Bretagne, le Japon, la Suisse sont des pays où le sucre consommé est en grande partie importé. On constate (Tableau V p. 29) que la France est le pays où la législation est la plus stricte : aucun édulcorant n'est utilisable dans l'industrie alimentaire. Par contre, les Etats-Unis qui dépendent de la F.D.A, réputée pour sa sévérité, sont souvent innovateurs dans le lancement de nouvelles molécules. Les autres pays "plus soucieux de la santé de leurs citoyens" attendent les résultats de telles initiatives.

TABLEAU V : Les autorisations en France et à l'étranger

PAYS	EDULCORANTS						
	SACCHARINE	ASPARTAME	CYCLAMATE	ACESULFAME	THAUMATINE	STEVIOSIDE	DIVERS
FRANCE	P - -	P - -	P - -	P - -	-	-	-
U.S.A	P B A	P B A	-	-	-	-	-
JAPON	P B A	P B A	-	P B A	P - A	P B A	-
G.B.	P B A	P B A	-	P B A	- B A	-	-
R.F.A.	P B <sup>*</sup> A	P B A	P B A	P - -	-	-	-
BELGIQUE	P B A	P B -	P - -	P <sup>*</sup> B <sup>*</sup> -	-	P - -	NeO-DHC - B A
ITALIE	P B A	P - -	P B A	P <sup>*</sup> - -	-	-	-
SUISSE	P B A	P B A	P B A	P B A	- - A	-	-
ESPAGNE	P B A	P <sup>*</sup> B <sup>*</sup> A <sup>*</sup>	P B A	-	-	-	-

Source : International Sweeteners Association (I.S.A.)

P : Autorisé en pharmacie  
 B : Autorisé dans les boissons  
 A : Autorisé dans l'alimentation  
 \* : Autorisation temporaire  
 - : Non autorisé



Même au niveau européen, les autorisations ne sont pas uniformes. Une telle situation reste inextricable car d'un côté le traité de Rome exige la libre circulation des produits, et d'autre part, celle-ci peut être entravée par l'article 36 qui prévoit qu'un pays peut interdire l'importation ou l'exportation de denrées afin de préserver la santé et la vie de ses ressortissants.

A ce titre, le Comité mixte FAO/OMS fixe des doses journalières admissibles (D.J.A. : cf Tableau VIII p. 38) qui permettent de connaître la quantité d'édulcorants qu'un individu pourra consommer sans risque pendant tous les jours de son existence.

## V - ASPECT TOXICOLOGIQUE, DEMANDE D'AUTORISATION D'EMPLOI

Il est certain qu'à l'heure actuelle, les problèmes toxicologiques existants pour tous les édulcorants sont le principal frein au développement de ces nouvelles molécules.

### A - DANS LE DOMAINE ALIMENTAIRE

L'autorisation d'emploi d'un édulcorant en alimentation dépend d'une décision des Ministères de l'Agriculture, de l'Industrie, de la Santé et de la Consommation par l'intermédiaire du service de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité (33).

L'industriel désireux d'employer un édulcorant non autorisé doit pouvoir - caractériser et définir aussi rigoureusement que possible la substance pour laquelle l'autorisation est demandée ;

- établir son innocuité dans les conditions normales d'emploi par un consommateur quelque soit son âge.

La réponse à ces deux objectifs nécessite l'établissement de dossiers analytique, technologique et toxicologique. Ces exigences réglementaires ont été actualisées dans la circulaire du 8 Août 1980 publiée au J.O. du 25 Septembre 1980 relative aux demandes d'autorisations d'emploi de substances destinées à être introduites intentionnellement dans les aliments.

### 1) LE DOSSIER ANALYTIQUE

Le dossier analytique doit permettre de réaliser l'identification de l'édulcorant dans l'aliment. Pour cela, il faut mettre en oeuvre des méthodes de contrôle et de dosage garantissant la conformité des échantillons. Le procédé de fabrication doit être bien défini afin de connaître les caractéristiques du produit fini standard.

Des normes de pureté sont établies pour chaque édulcorant. La réglementation aurait tendance à différencier les produits naturels et les substances obtenues par synthèse chimique. A ce sujet, on peut souligner les problèmes toxicologiques de la saccharine consécutifs à la présence d'impuretés dans le produit (cf § II-B-3 p. 18).

### 2) DOSSIER TECHNOLOGIQUE

Ce dossier doit insister sur l'efficacité de l'édulcorant. Ainsi, - une analyse sensorielle doit permettre de juger la saveur du produit ;

- une étude des propriétés physico-chimiques (influence de la température, de l'humidité, de la concentration, du milieu, de la durée d'action...) doit démontrer la stabilité et le comportement de l'édulcorant dans l'aliment.

Un deuxième critère important concerne la justification de l'emploi de l'édulcorant : intérêt organoleptique, intérêt économique, intérêt pour le consommateur.

### 3) DOSSIER TOXICOLOGIQUE

Ce dossier comporte cinq grandes sections.

#### a - *Epreuve de toxicité aiguë*

Cette étude permet de déterminer les doses létales (DL 50) c'est-à-dire les doses uniques de produit qui donnent dans un délai de 14 jours la mort à 50 p. 100 des animaux traités.

#### b - *Toxicité à terme*

Ces épreuves porteront au moins sur 2 espèces de mammifères dont l'une n'appartient pas à l'ordre des rongeurs : par exemple Rat et Chien. La durée d'administration du produit testé est de 18 mois. Cette étude permet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou

anatomo-pathologiques de l'animal qui résulteraient de l'administration réitérée de l'édulcorant à moyen ou à long terme.

*c - Etude des fonctions de reproduction*

Le but des études de reproduction est de fournir des informations sur l'augmentation possible, au fil des générations de la sensibilité de l'animal à l'édulcorant. On étudie les effets sur la fertilité des animaux mâles et femelles, les effets pré-, péri- et post-nataux sur l'embryon, le fœtus et le jeune.

Au cours de ces études, toutes les observations conventionnelles relatives aux comportements et aux aspects cliniques sont effectuées. On détermine également les indices habituels de conception et de gestation, le nombre et la taille des portées, le poids des jeunes à la naissance, leur viabilité, le nombre de survivants et la croissance au cours de la période de lactation. Ces études sont réalisées sur plusieurs générations d'animaux.

*d - Epreuves de mutagénèse et cancérogénèse*

Les risques de mutagénèse pourront être appréciés par les tests permettant de mettre en évidence d'éventuels effets mutagènes soit sur certaines souches de bactéries, de champignons microscopiques, de levures, soit sur des drosophiles, soit encore sur des cultures de cellules de mammifères.

Bien que les mécanismes de la cancérogénèse ne soient pas encore clairement compris, l'analyse de certains facteurs physiques, chimiques, biochimiques, hormonaux, nutritionnels, génétiques, viraux et autres peut contribuer à la détermination des risques de cancérogénèse.

*e - Recherche des propriétés allergéniques et des effets possibles sur les fonctions immunitaires*

L'étude des propriétés allergéniques a pour but d'informer les sujets sensibles et de prévenir le risque de sensibilisation pouvant survenir à la longue dans une population normale. Un certain nombre de techniques applicables sur les animaux (test d'allergie retardée chez le cobaye, test d'antigénicité, recherche d'anticorps dans le sérum de Lapin) permet de mettre en évidence les effets allergènes.

Un édulcorant ne sera jamais absolument sûr. A cet effet, on doit interpréter le risque potentiel que représente l'édulcorant dans les conditions normales de consommation. Il y a donc lieu de procéder à une estimation de la quantité totale de l'édulcorant contenue dans la ration alimentaire.

Enfin, l'objectif de l'analyse toxicologique est de définir la sécurité d'emploi de l'édulcorant et cela aboutit à la fixation d'une Dose Journalière Admissible (DJA) pour l'Homme.

#### 4) NOTION DE DOSE JOURNALIERE ADMISSIBLE (DJA)

Cette dose a été définie par le Comité Mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires comme représentant la quantité moyenne d'une substance, exprimée en mg/kg de poids corporel qui peut être ingérée chaque jour par le biais des aliments pendant la vie entière sans qu'il en résulte des dommages manifestes pour la santé.

Cette DJA s'obtient en faisant le rapport de la dose sans effet par le facteur de sécurité. La dose sans effet est déterminée en exposant un nombre "important" d'animaux à des doses croissantes et en examinant les effets obtenus. On remarque des doses pour lesquelles aucun phénomène toxique ne se produit et des doses pour lesquelles il y a une réponse de l'animal. Entre ces deux groupes de doses se produit "une coupure" qui peut être considérée comme représentant la dose sans effet observable (DSE). Un facteur de sécurité tient compte des variations individuelles chez les animaux et de l'importance du risque. Un facteur classique de 100, établi arbitrairement, a été largement accepté mais il serait peu raisonnable de l'appliquer absolument à toute situation. En effet, il peut être de 10 si on dispose d'une bonne expérience humaine mais au contraire de 1.000 et plus si le risque est important (cancérogène). Enfin, il est difficile de fixer d'emblée une DJA : une valeur temporaire est parfois retenue avant de pouvoir la considérer comme définitive.

#### 5) EXTRAPOLATION A L'HOMME DES RESULTATS OBTENUS SUR DES ANIMAUX

La circulaire d'août 1980 précise qu'une étude clinique portant sur des volontaires sains pourra être entreprise si l'innocuité de l'édulcorant a été démontrée chez l'animal. Cette étude mettra en oeuvre des quantités faibles de l'édulcorant et des bilans permettant de vérifier



que le métabolisme de la substance chez l'Homme ne diffère pas de celui observé chez l'animal. L'étude des effets toxicologiques de l'édulcorant peut être faite par l'observation et par l'expérimentation. L'observation accroît certes la sécurité du consommateur mais donne peu de renseignements scientifiques sur un danger toxicologique potentiel.

L'expérimentation reste donc la seule méthode permettant d'étudier le danger éventuel d'une substance aussi bien sur l'organisme sain que sur l'organisme malade. Se posent alors les problèmes éthiques et juridiques de l'expérimentation humaine.

#### B - DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE

Il n'y a pas de réglementation spéciale relative aux tablettes médicamenteuses ou autres formes galéniques comportant comme principe actif un édulcorant. L'édulcorant suit les mêmes règles que les produits pharmaceutiques pour obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM). En outre, si l'on veut développer une présentation pharmaceutique comportant l'édulcorant comme adjuvant de fabrication et non comme principe actif, il faut que celui-ci ait déjà été autorisé comme principe actif d'une spécialité pharmaceutique ou qu'il soit inscrit à une pharmacopée.

Les caractéristiques de l'autorisation de mise sur le marché d'un médicament sont précisées dans l'article L601 du code de la Santé Publique. L'autorisation n'est accordée que lorsque le fabricant justifie :

- qu'il a fait procéder, d'une part, à la vérification de l'innocuité du produit dans les conditions normales d'emploi et de son intérêt thérapeutique et d'autre part, à l'analyse qualitative et quantitative de l'édulcorant ;

- qu'il dispose d'une méthode de fabrication et de procédés de contrôle de nature à garantir la qualité du produit final au stade de la fabrication en série.

Cette autorisation est délivrée pour une période de cinq ans et est renouvelable par période quinquennale. Le contenu du dossier de demande d'AMM pour cette catégorie de médicament "grand public" est peu différent de celui présenté pour les autres spécialités.

Un certain nombre de points sont à signaler :

- le comportement de la substance dans les différentes conditions d'emploi et notamment à la chaleur ;
- les essais toxicologiques sont semblables à ceux cités au paragraphe V-A p. 30 ;
- l'expertise clinique est basée sur la vérification de l'efficacité de l'édulcorant et de la bonne tolérance du produit.

## VI - LE MARCHÉ DES ÉDULCORANTS

Si au niveau français, le marché des édulcorants se limite essentiellement au domaine pharmaceutique, il n'en est pas de même au niveau européen et mondial. L'utilisation des édulcorants dans des produits alimentaires (essentiellement les "soft drinks") fait que ce marché est en pleine expansion et que les intérêts économiques sont très importants.

### A - LE MARCHÉ PHARMACEUTIQUE

#### 1) EN FRANCE

16 p. 100 des foyers français utilisent plus ou moins régulièrement des édulcorants. 77 p. 100 des utilisateurs sont des femmes, âgées de 30 à 50 ans. Quant aux utilisateurs masculins, ils se rencontrent surtout dans les tranches d'âge de 50 ans et plus.

Si initialement, les édulcorants étaient utilisés uniquement à des fins thérapeutiques (diabète), ils sont actuellement de plus en plus consommés par toute une population sédentaire soucieuse de lutter contre l'excès pondéral. En effet, les diabétiques représentent 22 p. 100 des consommateurs d'édulcorants et les obèses 50 p. 100.

La consommation des édulcorants se fait essentiellement sous forme de comprimés (88,2 p. 100) qui représentent la forme galénique la plus proche du morceau de sucre et la plus commode d'usage. Les poudres et liquides représentent le reste du marché (11,8 p. 100).

Cinq grands laboratoires représentent à eux seuls 90 p. 100

de la production des édulcorants de synthèse (Tableau VI p. 37). Le principe actif de ces différents édulcorants ainsi que les laboratoires distributeurs sont indiqués dans le Tableau VII p. 37.

La consommation totale d'édulcorants est en France de 60 t/an soit 10 millions d'unités sucrantes pour une valeur de 100 millions de Francs. Les parts du marché en chiffre d'affaire des différents produits

sont	Canderel	: 28 p. 100
	Sun Suc/Skun Suc	: 24 p. 100
	Sucrédulcor	: 14 p. 100
	ODA	: 12 p. 100
	Sucaryl	: 9 p. 100
	Sucrettes	: 6 p. 100
	Autres	: 7 p. 100

Il est à remarquer le fléchissement du marché des produits à base de saccharine (Edulcor et ODA faisaient 60 p. 100 des ventes en 1979) au bénéfice de l'aspartame (Candérel).

## 2) A L'ETRANGER

En 1983, deux ans après l'introduction de l'aspartame, 44 millions d'Américains (de plus de 13 ans) consommaient régulièrement de la saccharine sous forme directe ou en tant qu'ingrédient dans les produits de régime.

En 1984, Equal, le nom commercial de l'aspartame, détient déjà 60 p. 100 du marché des édulcorants (utilisation domestique) alors que les ventes de saccharine sont restées inchangées. Autant dire que l'aspartame attire surtout des consommateurs qui n'utilisaient pas d'édulcorant artificiel auparavant, les utilisateurs de saccharine étant restés fidèles à leur produit.

### B - LE MARCHE ALIMENTAIRE

Sur le marché du sucre et des substituts du sucre (qui se concurrencent entre-eux autant qu'ils concurrencent le sucre) trois forces sont en présence :

- l'industrie du sucre : le saccharose
- l'industrie de l'amidon : l'isoglucose
- l'industrie chimique : les édulcorants (Tableau VIII p.38)

TABLEAU VI : Parts de marché des différents producteurs d'édulcorants

LABORATOIRES	PARTS DE MARCHÉ
Human Pharm.	28,6 %
Searle	20,2 %
Laboratoire Européen du Médicament	17,8 %
Lafon	14,4 %
Abbott	8,9 %

Source : Info Chimie, Mars 1984

TABLEAU VII : Spécialités pharmaceutiques françaises contenant des édulcorants

Nom commercial	Principe actif	Date de commercialisation	Laboratoire
Canderel	aspartam	1980	Searle
D. sucrlil	aspartam	1983	Pierre Fabre
Edulcor	saccharine Na	1978	Européen du Médicament
Gaosucryl	saccharine Na	1978	Pharminter
Oda	saccharine Na	1977	L. Lafon
Pouss'suc	aspartam	1983	Human Pharm
SKun Suc		1978	
SLun Suc	saccharine NH <sub>4</sub>		Human Pharm
SPun Suc		1977	
Sucaryl	d. saccharine Na 10 d. cyclamate Na	1966	Abbott Fr
Sucrédulcor	saccharine Na	1906	Européen du Médicament
Sucrettes	saccharine Na	1911	Vernin
Sucromat	saccharine Na	1978	Nigy
Sucrum 7	cyclamate Na	1966	Lelong
Sun Suc	saccharine Na	1977	Human Pharm

Sources : Biofutur Mars 1984



TABLEAU VIII : Les édulcorants commercialisés

EDULCORANTS	FABRICANTS	D.J.A. Décision du 14/09/84
Saccharine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The Sherwin-Williams Co. Ohio/U.S.A</li> <li>- Choheung Chemical Ind. Co. Ltd. Seoul/Corée</li> <li>- Jeil Moolsan Company Inc. Seoul/corée</li> </ul>	0-2,5 mg/kg
Cyclamate	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abbott Laboratoires Chicago/USA</li> <li>- Brasfanta S.A. Sao Paulo/Brésil</li> <li>- San Fu Chemicals Taipei/Taiwan</li> <li>- Productos Aditivos Barcelone/Espagne</li> <li>- Bayer Wuppertal/R.F.A</li> </ul>	11 mg/kg
Aspartame	<ul style="list-style-type: none"> <li>- G.D. Searle Skokie/illinois</li> <li>- Ajinomoto/japon</li> <li>- Pierrel S.p.A. Milan/italie</li> </ul>	0-40 mg/kg
Acésulfame K	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hoechst/R.F.A</li> </ul>	0-9 mg/kg
Thaumatine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tate &amp; Lyle/G.B.</li> </ul>	*
Stéviolside	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toyo Sugar/Japon</li> <li>- Tama Biochemical/Japon</li> </ul>	**

Source : Biofutur Mars 1984

\* Temporairement acceptable

\*\* Dossier toxicologique incomplet : non toxicologiquement acceptable



Cette compétition triangulaire est actuellement largement dominée par les sucriers.

La consommation mondiale de sucre a été en 1982 de 91,8 millions de tonnes. Le problème majeur que connaît le monde du sucre est le déséquilibre important (100 millions de tonnes) entre la consommation et la production. Parmi les pays industrialisés, le Tableau IX p. 40, montre la consommation de saccharose par habitant. La consommation en tout sucre est en France de 45 kg/habitant/an tandis qu'aux U.S.A. elle est de 57 kg/habitant/an.

Ces dernières années, le marché mondial du saccharose a été progressivement influencé par la mise sur le marché de nouveaux édulcorants. Le remplacement du saccharose dans les préparations alimentaires pose de nombreux problèmes technologiques. D'une part, peu d'édulcorants supportent la chaleur ce qui ne permet pas leur introduction dans des produits cuits (pâtisserie, confiserie, biscuiterie). D'autre part, les édulcorants à haut pouvoir sucrant ne remplissent qu'une des deux fonctions attendues d'une matière sucrante ; s'ils apportent bien la saveur sucrée, ils n'apportent pas la "charge" indispensable pour certains produits. Aussi, il n'est pas surprenant de constater que les boissons constituent le premier marché des édulcorants concurrençant ainsi le sucre car les problèmes de masse sont plus faciles à résoudre.

#### 1) EN FRANCE

De part la législation française, la concurrence sucre, isoglucose, édulcorant n'existe pas. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les édulcorants à haut pouvoir sucrant sont interdits en alimentation. Seuls sont autorisés et sous certaines conditions les dérivés de l'amidon.

Seul producteur français, la Société ROQUETTE bénéficie d'un modeste quota de 20 022 t/an pour la période 1981-1985.

Les dérivés de l'amidon ont des propriétés technologiques qui varient en fonction du degré d'hydrolyse : pression osmotique, viscosité, brunissement à la cuisson... D'autre part, la solubilité des édulcorants issus de l'amidon est supérieure à celle du sucre et leur cristallisation parfois impossible ce que recherchent les fabricants de confiture et les confiseurs.

TABLEAU IX : Consommation totale de saccharose en kg/habitant/an comprenant le saccharose consommé directement et celui incorporé aux produits sucrés, en 1982.

U.R.S.S.	43,1	France	35,7
Suisse	42,3	Canada	35,1
Danemark	41,2	U.S.A.	33,1
Pays-Bas	39,4	Italie	27,7
Royaume Uni	37,5	Espagne	26,9
R.F.A.	36,9	Grèce	26,5
Belgique	36,1	Japon	24,0

Source : C.E.D.U.S. (Centre d'Etudes et de Documentation du Sucre)



## 2) A L'ETRANGER

A l'étranger et plus particulièrement aux U.S.A., la compétition saccharose, isoglucose et édulcorants à haut pouvoir sucrant est intense. En effet, le libre développement de l'isoglucose dans certains pays entraîne une concurrence directe avec le "sucre" utilisé dans les Industries Agro-Alimentaires qui représente 70 p. 100 du sucre consommé aux U.S.A. et 65 p. 100 au Japon. De part ses propriétés technologiques, l'isoglucose ne peut prétendre au grand maximum qu'à 50 p. 100 du marché du sucre industriel. Parmi les atouts des sirops de fructose, il faut citer le prix qui dépend de celui des céréales plus stable que celui du sucre. Ce n'est pas un produit de campagne, sa fabrication s'étale sur toute l'année engendrant de nombreux sous-produits. Enfin, il diminue la dépendance des pays non producteurs de sucre mais sa fabrication n'est possible que dans les pays industrialisés. Les équipements sont coûteux bien qu'inférieurs de 25 à 30 p. 100 à ceux d'une sucrerie à quantité égale de produit sec. Aux Etats-Unis la production d'isoglucose est de 3,3 millions de tonnes soit 11 milliards de dollars. En mai 1983, Pepsi-Cola autorise l'incorporation d'isoglucose dans les colas, ce qui a stimulé le marché comme l'avaient déjà fait les décisions similaires de Coca-Cola et Royal Crown Cola. L'isoglucose tient actuellement 33 p. 100 du marché américain des sucres et des édulcorants utilisés dans les boissons.

Depuis deux ans, l'isoglucose est également touché par le développement des édulcorants hypocaloriques dans le domaine des boissons diététiques. A l'heure actuelle, trois produits se partagent le marché mondial des édulcorants : la saccharine (qui est le plus ancien), le cyclamate (controversé et interdit pour les usages alimentaires aux U.S.A.) et le plus récent, l'aspartame, en plein développement. Ils représentent un marché considérable avec des intérêts financiers énormes.

En 1981, la F.D.A. a autorisé la vente au public de l'aspartame ainsi que son utilisation industrielle dans un certain nombre de produits sous le nom de "Nutrasweet"

- les céréales pour petits déjeuners prêtes à l'emploi ;
- les chewing-gums ;
- les préparations instantanées à base de café et de cacao ;



- les gélatines ;
- les poudres aromatisées pour boissons froides ;
- Les puddings, flans et glaçages pour gâteaux.

En 1983, la F.D.A. a autorisé l'emploi de l'aspartame dans les boissons gazeuses.

Avec son seul édulcorant, Searle a réalisé un chiffre d'affaire de 13 millions de dollars en 1981, de 74 millions en 1982, de 336 millions en 1983 et plus de 600 millions en 1984. En 1983, les bénéfices ont été de 151 millions de dollars. Aux dires des spécialistes, le marché mondial des édulcorants de synthèse dépassera, avant 1990, le milliard de dollars. A lui seul, l'aspartame pourrait prendre 10 p. 100 du marché des sirops de fructose dans les boissons gazeuses soit une perte de 100 à 150 millions de dollars.

Le lancement de l'aspartame aux U.S.A. en 1983 dans les "soft drinks" a stimulé le marché des "diet drinks" qui représente, en 1985, 20 p. 100 du marché des "soft drinks". En dehors du problème de stabilité de l'aspartame, les industriels se trouvent devant un problème de production. En effet, le prix de l'aspartame traduit la difficulté d'obtenir la phénylalanine dont le prix courant est de 55 dollars le kg.

Une vive concurrence oppose d'ailleurs les entreprises japonaises, américaines et européennes, toutes désireuses de se placer comme fournisseur des deux amino-acides (l'acide L-aspartique et la L-phénylalanine) qui constituent les matières premières de l'aspartame. Enfin, les filières chimiques et biotechnologiques restent en concurrence pour fournir un produit à faible coût de production.

Au Japon, la situation est quelque peu différente. Tout d'abord, le Japonais ne consomme que 23 kg de sucre/an. L'analyse du tableau X p. 43 montre que la consommation de saccharose est stable depuis 5 ans, par contre les nouveaux sucres sont en pleine expansion. On remarque enfin un fléchissement de la saccharine et de la glycyrrhizine qui favorise le développement de la thaumatococine et du stéviol. L'aspartame récemment autorisé est également en pleine expansion.

TABLEAU X : Evolution du marché des édulcorants au Japon

EN TONNES	1980	1981	1982	1983	1984	VARIATIONS
Saccharose	2,8 M	2,7 M	2,8 M	2,7 M	-	→
Sucre isomérisé	380.000	525.000	588.000	603.000	-	↗
Sirop	550.000	571.000	617.000	623.000	-	↗
Glucose	131.000	134.000	132.000	131.000	-	→
Maltitol	6.000	6.700	7.500	8.200	8.900	↗
Sorbitol	83.000	90.000	99.000	107.000	113.000	↗
Glycyrrhizine	450	340	280	240	210	↘
Thaumatine	2	2,3	2,6	2,8	3	↗
Stéviolside	20	33	50	80	125	↗
Saccharine	225	210	200	195	190	↘

↗ augmentation

→ stable

↘ diminution



Source : Centre Japonais du Commerce Extérieur

Enfin, si dans le passé l'industrie alimentaire n'utilisait que la saccharine et le cyclamate, la récente autorisation de l'aspartame offre de nouvelles perspectives. En effet, la combinaison de différents édulcorants offre de nombreux avantages. D'une part, des propriétés technologiques nouvelles (stabilité) et d'autre part, une amélioration du goût soit par effet masquant (par exemple, saccharine/cyclamate) soit par augmentation du pouvoir sucrant (aspartame/cyclamate ; aspartame/saccharine ; cyclamate/saccharine). Enfin, cet effet synergique permet de diminuer la quantité totale d'édulcorants tout en conservant la même saveur sucrée et donc de diminuer le prix de vente. La liste des combinaisons n'est pas close. En effet, l'acésulfame et la thaumatine sont deux autres édulcorants qui ont déjà reçu leur agrément en Grande Bretagne. Leur approbation est imminente dans un certain nombre d'autres pays.

#### C - CONCLUSIONS

Malgré tous les efforts, les coûts et la détermination de nombreuses années de recherche et de développement, on n'a trouvé encore aucun substituant idéal pour le saccharose offrant sa qualité de goût sucré et sa large gamme d'application. Les calories apportées par le saccharose ne peuvent être éliminées qu'en compromettant la qualité, et occasionnellement la stabilité du produit. A l'heure actuelle et au fur et à mesure des autorisations, les industriels disposent d'un plus grand nombre d'alternatives qui permettent de satisfaire le mieux possible le consommateur. Toutefois, tous ces édulcorants de synthèse sont encore loin d'être parfaits et leur utilisation est limitée. Il est possible que dans quelques années, ils s'effacent devant des édulcorants naturels extraits de plantes à moins que les mélanges d'édulcorants de synthèse ne permettent de nouvelles utilisations.

Le marché des produits de régime est l'un des secteurs de l'alimentaire où l'on enregistre la plus forte croissance. En effet, depuis l'introduction de l'aspartame aux Etats-Unis, le nombre de personnes utilisant les édulcorants a fortement augmenté et il semble que la consommation moyenne approche la dose journalière admissible. Aussi, la position de la F.D.A. est actuellement d'autoriser, dans la mesure où les données toxicologiques sont favorables, le plus grand nombre possible

d'édulcorants de telle sorte que la consommation moyenne de chacun d'entre eux reste inférieure à la D.J.A. Ceci pourrait d'ailleurs mener à la ré-introduction des cyclamates interdits depuis 1970.

En France, les perspectives d'évolution dans le domaine pharmaceutique seront vite limitées. Seul un déblocage de la législation française permettrait l'ouverture dans un premier temps d'un nouveau marché, les "soft drinks". Certes, avec une consommation de 27 litres/an, le buveur français se situe loin derrière l'Anglais (36 l/an), le Belge (63 l/an) et surtout l'Américain avec 152 l/an. Pourtant, le marché français des boissons sans alcool a progressé de 9,7 % entre 1980 et 1983. Les multinationales de la soif comme les producteurs nationaux se livrent à une guerre sans merci pour emporter une part du marché potentiel. Aussi sont-ils prêts à conquérir le marché des boissons diététiques dès l'accord des autorités compétentes.

Il faut souligner enfin que des chercheurs lyonnais C. NOFRE et J.M. TINTI ont découvert une famille de molécules dérivées de l'aspartame. Sous couvert de l'ANVAR, du Ministère de l'Industrie de la Recherche (MIR) et avec le C.N.R.S. et l'I.N.S.E.R.M., le Laboratoire a déposé un brevet auprès de 23 pays. Ce super aspartame présente d'une part un fort pouvoir sucrant (10 à 55 000 fois celui du saccharose) et d'autre part une plus grande stabilité. Bien que français et promu certainement à un bel avenir, c'est pourtant le Laboratoire américain G.D. SEARLE qui s'est adjugé le contrat d'exclusivité de cette molécule et s'octroie ainsi le seul édulcorant susceptible de détrôner l'aspartame. Ce marché perdu par les industriels français devrait représenter en 1990 un marché mondial d'un milliard de dollars.

## LE STEVIOSIDE

### I - HISTORIQUE ET PRÉSENTATION

#### A - INTRODUCTION

Les nombreux travaux réalisés sur le stéviolside depuis le début du siècle montrent l'intérêt de cette molécule aussi bien au niveau de la recherche fondamentale que de la recherche appliquée. En effet, plus de 200 articles et quelques 130 brevets ont déjà été publiés dans le monde. Ce sont les japonais qui sont en tête de ce palmarès avec 40 p. 100 des publications et 97 p. 100 des prises de brevets. Avec une quarantaine de publications et cinq brevets, les américains montrent un intérêt certain vis-à-vis de cet édulcorant naturel. Enfin, les brésiliens (une vingtaine de publications) font régulièrement des congrès sur la *Stevia Rebaudiana Bertoni* (1981, 1982, 1984). Les français, qui ont pourtant été les premiers à découvrir le principe sucré de la *Stevia Rebaudiana* avec BRIDEL en 1931 (34) ne se sont que tardivement intéressés au stéviolside en tant qu'édulcorant potentiel.

#### B - HISTORIQUE - STRUCTURE

C'est en 1797 que CAVANILLES définit le genre *Stevia*. En 1899, BERTONI donne à la Kaa-hê-e le nom d' *Eupatorium rebaudianum* et en 1905 il démontre que cette plante appartient au genre *Stevia*. La plante prend alors le nom définitif de *Stevia Rebaudiana Bertoni*.

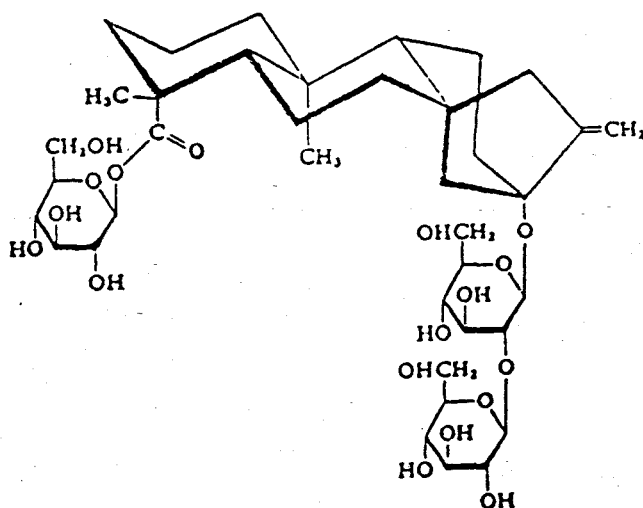
La *Stevia Rebaudiana Bertoni* est une composée originaire du Paraguay que l'on rencontre sur les hauts plateaux du Nord. Les autochtones de ce pays utilisent les feuilles séchées de *Stevia* pour sucrer leur thé. Les feuilles présentent une saveur sucrée absolument remarquable. C'est pourquoi de nombreux chercheurs se sont efforcés d'isoler et de déterminer le principe sucré de la plante. Les premiers travaux sur le principe sucré de la *Stevia Rebaudiana Bertoni* sont dus à O. REBAUDI en 1900 (35). Ce chercheur n'a cependant pas réussi à extraire le principe sucré à l'état cristallisé mais il a trouvé que ses caractères correspondaient à la glycyrrhizine, glucoside sucré de la réglisse.

Quelques années plus tard, en 1908, RASENACK (36) a isolé et montré la différence existant entre le principe sucré du kaa-hê-e et celui de la réglisse. Il donne deux types de préparation et propose la formule suivante :  $C_{42} H_{72} O_{21}$ .

En 1909, K. DIETERICH (37) extrait des feuilles de *Stevia Rebaudiana Bertoni* un produit cristallisable, l'eupatorine et un produit non cristallisable, la rébaudine. Aucune formule n'est avancée. Ce n'est qu'en 1924 que le nom de stéviósíde est apparu pour la première fois après une décision de l'Union Internationale de la Chimie.

En 1931, BRIDEL et LAVIEILLE complètent les études biochimiques jusqu'alors entreprises sur le principe sucré du *Stevia Rebaudiana Bertoni*. Dans un premier mémoire (34), ils donnent deux procédés d'extraction du stéviósíde : l'un utilise l'éthanol absolu et l'éther (le rendement est de 4,5 p. 100) ; l'autre utilise l'éthanol bouillant et le rendement est de 6 p. 100. Ils déterminent également un certain nombre de propriétés du stéviósíde.

Ce n'est qu'en 1955 que WOOD (38) et VIS (39) ont déterminé la structure du stéviósíde : le stéviol-13-O- $\beta$  sophorosíde-19-O- $\beta$ -D-glucopyranosylester.



La *Stevia Rebaudiana Bertoni* contient également d'autres molécules sucrées du type diterpène glucoside (Tableau XI p. 49). En effet, en 1976, KOHDA (40) isole et détermine la structure de deux nouveaux glucosides : le rebaudioside A et le rebaudioside B.

Quelques années plus tard, en 1977, des études faites par SAKAMOTO (41) en RMN  $^{13}\text{C}$  ont révélé l'existence des rebaudiosides C, D et E. Simultanément, KOBAYASHI (42) découvre les structures des dulcosides A et B : le dulcoside B étant le rebaudioside C de SAKAMOTO.

#### C - LES DERIVES DU STEVIOSIDE

En 1931, BRIDEL (43) décrit l'hydrolyse enzymatique du stéviocide par le suc digestif d'*Helix pomatia* qui permet d'obtenir du D-glucose et du stéviol. L'hydrolyse par l'acide sulfurique donne 60 p. 100 de glucose et 40 p. 100 d'un produit non glucidique appelé isostéviol. Enfin, il démontre qu'en milieu acide le stéviol se transforme en isostéviol.

En 1955, WOOD (38) montre qu'en milieu basique le stéviocide donne le stéviolbioside après hydrolyse de la liaison ester.

Ce n'est qu'en 1963 que MOSETTIG et al. (44) ont déterminé la configuration absolue du stéviol et de l'isostéviol. Comme l'avait déjà démontré BRIDEL, le stéviol est obtenu par hydrolyse enzymatique tandis que l'isostéviol est obtenu par hydrolyse acide. L'isostéviol peut également être obtenu par un réarrangement de Meerwein après un traitement acide du stéviol. Les différentes formes moléculaires sont rassemblées dans la figure 3 p. 50.

#### D - LA PREPARATION

Le stéviocide est généralement extrait de la *Stevia Rebaudiana*. Il est à noter cependant que XU WEIKU et al. (45) en 1982 ont caractérisé et isolé du stéviocide à partir de feuilles de *Rubus suavissimus*. La teneur en stéviocide et rébaudioside dans les feuilles de *Stevia Rebaudiana* est variable. Elle est fonction des méthodes de dosage, des méthodes d'extraction et surtout de la culture.

TABLEAU XI : Les différents rébaudiosides

Rébaudioside A	
Rébaudioside B	
Rébaudioside C	
Rébaudioside D	
Rébaudioside E	
Dulcoside A	





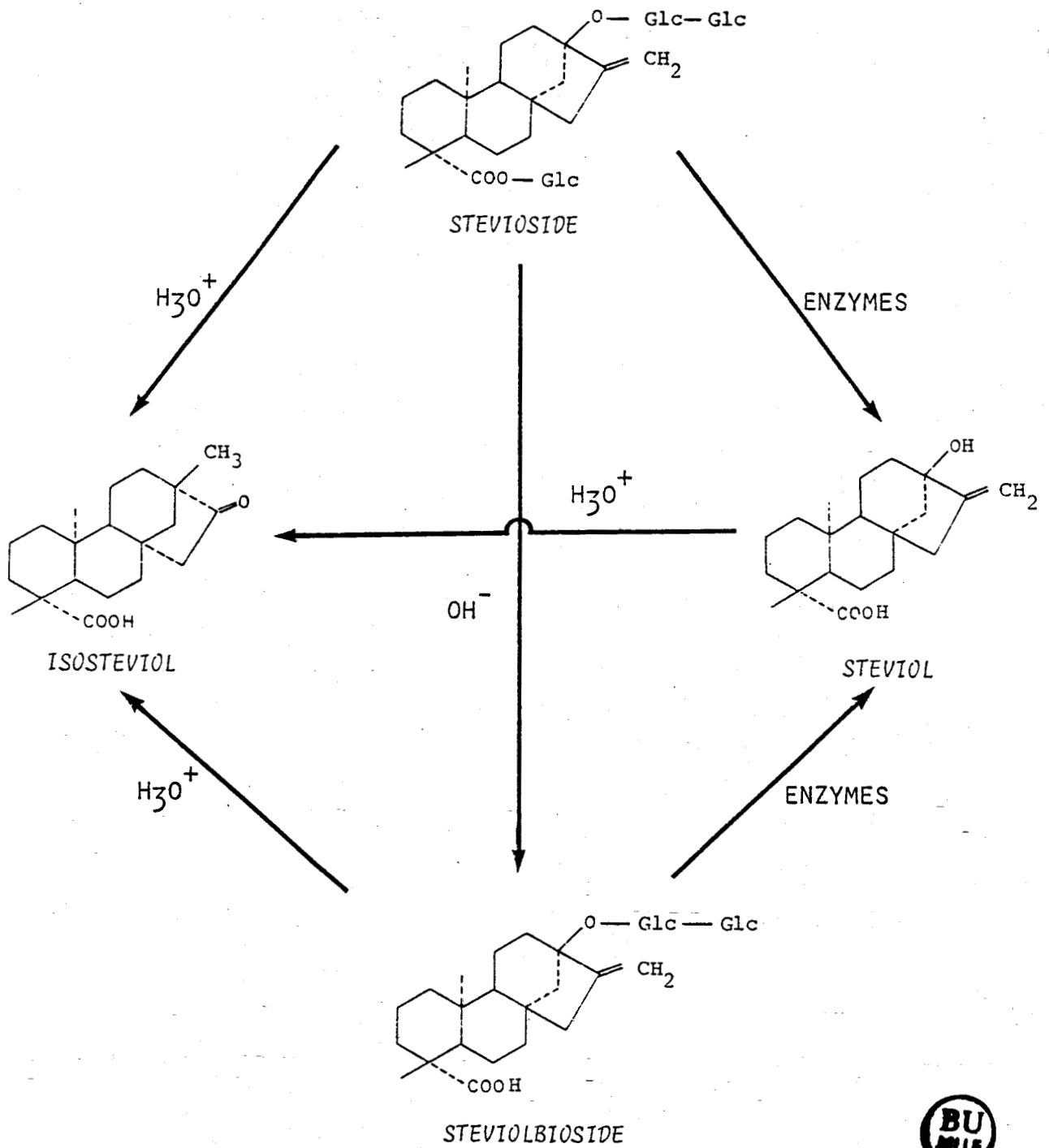


FIGURE 3 : Les dérivés du stéviol

## 1) LA CULTURE

Nous avons peu d'information à ce sujet en dehors du fait que de nombreux pays (Brésil, Paraguay, Japon, Chine Populaire, Taiwan, Corée du Sud, Indonésie, Laos, et depuis peu Israël) s'intéressent à cette plante. Les travaux concernant l'amélioration de la culture de *Stevia* sont essentiellement orientés vers :

- la multiplication in vitro de plantes sélectionnées riches en stévioloside et rébaudioside ;
- l'obtention de colonies tissulaires et de suspension cellulaire synthétisant du stévioloside et du rébaudioside.

Actuellement, la culture au Paraguay reste très artisanale et permet un rendement de 1,2 tonnes de feuilles sèches par hectare. Les Japonais, les plus avancés dans ce domaine, ont mis au point de nouvelles variétés et des hybrides qui sont cultivés dans le sud du Japon avec un rendement double de celui des plantes d'origine. Tous ces travaux nécessitent de bonnes méthodes de dosage du stévioloside et du rébaudioside afin de sélectionner les bons clones.

## 2) METHODES DE DOSAGE

C'est en 1979 que METIVIER (46) met au point la première méthode de dosage du stévioloside dans les feuilles de *Stevia*. Par chromatographie bidimensionnelle sur plaque de silicagel, il sépare le stévioloside des autres constituants de la plante. Le stévioloside, dérivé à l'antrone sulfurique, est dosé par spectrophotométrie après récupération des tâches sur la plaque de chromatographie.

Depuis, de nombreuses autres méthodes ont été mises au point en utilisant soit la chromatographie en phase gazeuse (SAKAMOTO (47), MITSUHASHI (48)) soit la chromatographie liquide haute performance (AHMED (49-51), HASHIMOTO (52), MAKAPUGAY (53)).

Toutes ces méthodes de dosage permettent de quantifier la teneur en stévioloside et rébaudioside dans la plante. Le tableau XII p. 52 montre que la teneur en édulcorant varie en fonction de l'origine de la plante.

TABLEAU XII : Teneur en stéviolside et rébaudioside dans des plantes d'origines différentes

ORIGINE	STEVIOSIDE (p. 100 de matière sèche)	REBAUDIOSIDE A (p. 100 de matière sèche)
JAPON 1 *	5,4	1,5
JAPON 2 *	2	0,8
JAPON 3 *	7,7	1,9
JAPON 4 *	7,4	2,3
JAPON 5 ***	3,8	-
JAPON 6 ***	15,9	-
JAPON 7 ***	18,5	-
COREE 1 *	2,6	1,9
COREE 2 **	5,5	2,5
CHINE **	6,6	3,7
TAIWAN **	8,1	3,5
BRESIL 1 *	6	1,8
BRESIL 2 *	5,5	1,6
PARAGUAY 1 **	4,6	1,9
PARAGUAY 2 **	5,5	3,4
PARAGUAY 3 *	6,1	2,9

\* Dosage par HPLC NH<sub>2</sub> : MAKAPUGAY (53)

\*\* Dosage par HPLC OH pack M414 : HASHIMOTO (52)

\*\*\* Dosage par GLC : SAKAMOTO (47)

- : non déterminé



### 3) LA PREPARATION

Au niveau laboratoire la plupart des méthodes de préparation dérivent de la méthode BRIDEL-LAVIEILLE (34). Elles utilisent toutes de nombreux solvants organiques et le principe de cristallisation comme méthode de purification (FIGURE 4 p. 54). En 1982, KINGHORN et al. (54) mettent au point une méthode de séparation du stéviolside et de tous les rébaudiosides par chromatographie à contre-courant. Cette méthode est cependant inexploitable au niveau industriel.

Au niveau industriel, seuls les Japonais ont déposé de nombreux brevets sur la préparation du stéviolside (55). Une interrogation de la banque de données ARIST nous a permis d'en répertorier 133. Entre 1975 et 1980, les Japonais ont pris 76 brevets essentiellement sur les méthodes de préparation du stéviolside. Ces brevets déposés uniquement au Japon sont inexploitable car intégralement écrits en japonais. Seuls les Chemicals Abstracts en donnent un résumé, en anglais, très succinct. Ils décrivent une multitude de procédés. Des extractions, éthanolique, aqueuse etc... des purifications par précipitation, par chromatographie sur colonne etc... des cristallisations (FIGURE 5 p. 54).

Depuis 1981, les Japonais ont pris 50 brevets, les Américains 4, les Anglais 2 et 1 pour les Brésiliens. Ces brevets concernent essentiellement l'utilisation du stéviolside et les transformations de la molécule. Il est à noter qu'il y a très peu de publications sur la préparation du rébaudioside et aucun brevet exploitable industriellement. Et pourtant le rébaudioside possède plusieurs avantages :

- un meilleur goût ;
- il est plus sucré ;
- il est plus stable.

Cependant, sa faible teneur dans la plante et ses difficultés d'extraction incitent les chercheurs à trouver un procédé de transformation du stéviolside en rébaudioside par voie chimique ou enzymatique. D'ailleurs, en 1977, KANEDA (56) réalise la conversion du stéviolside en rébaudioside A par voie enzymatique et chimique.

FIGURE 4 : Purification au niveau laboratoire

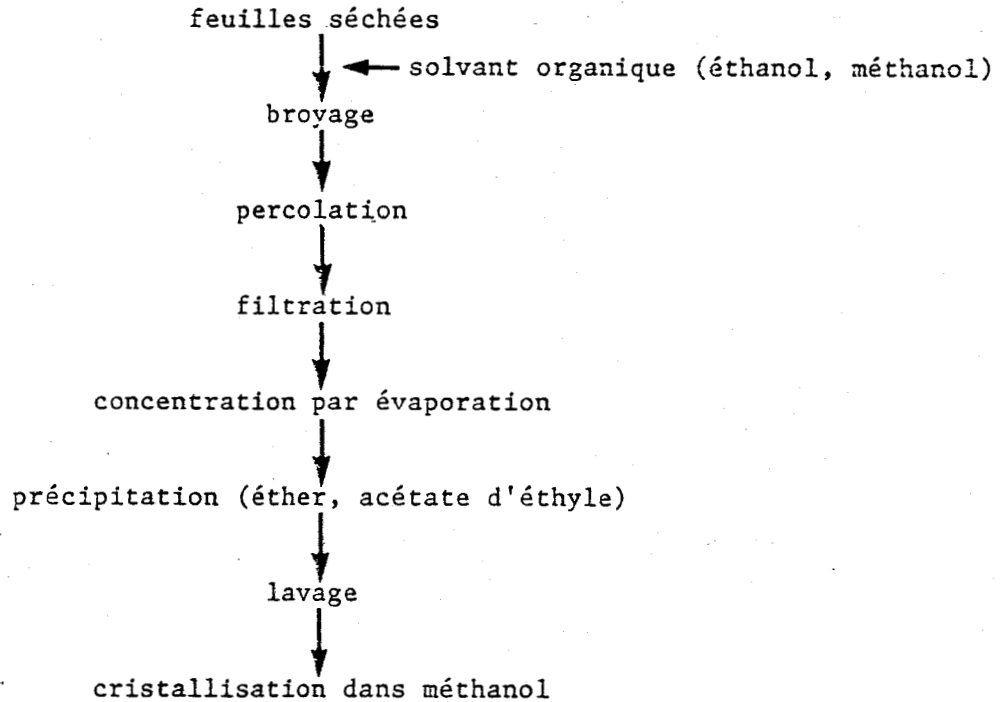
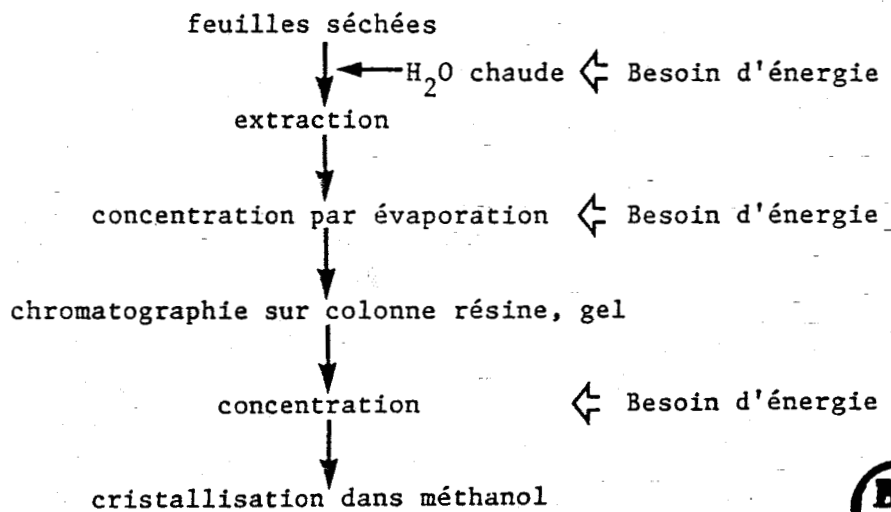


FIGURE 5 : Purification au niveau industriel



## II - LES PROPRIÉTÉS

### A - LE POUVOIR SUCRANT

Le pouvoir sucrant de ces différentes molécules, de structures très semblables, a fait l'objet de nombreuses analyses sensorielles. Leurs valeurs restent cependant subjectives et ne peuvent être données qu'à titre comparatif (TABLEAU XIII p. 56). Par ailleurs, de nombreux travaux ont été réalisés sur ces molécules afin de comprendre et d'améliorer leurs propriétés sucrantes.

En 1968, ISHIMA et al (57) montrent que la substitution d'un D-glucose par un  $\alpha$ -L-rhamnose sur le C-13 diminue considérablement le pouvoir sucrant de la molécule.

En 1979, KAMIYA et al (58) étudient, sur le stéviolside, les relations structure-pouvoir sucrant en s'appuyant sur les théories de SHALLENBERGER (4) et KIER (5). Ils démontrent que la double liaison = CH<sub>2</sub> du noyau stéviol joue un rôle important dans l'intensité du pouvoir tandis que le glucose ester n'est pas indispensable et peut être remplacé par d'autres groupements à l'exclusion d'un radical méthyl qui fait apparaître une certaine amertume.

En 1984, ESAKI et al. (59) synthétisent des analogues du stéviolside (substitution du glucose ester) afin d'en déterminer le pouvoir sucrant. Parallèlement, DUBOIS et al. (60) s'intéressent à la substitution du glucose ester afin d'empêcher l'hydrolyse possible du stéviolside et de ce fait d'éviter l'absorption au niveau de la muqueuse intestinale. En 1981, DUBOIS (61) a montré que le groupement 19-O- $\beta$ -D-glucose pouvait être remplacé par un groupement sodiosulfopropyl qui augmente le pouvoir sucrant du stéviolside. Ces travaux sont couverts par un certain nombre de brevets (DUBOIS (62-64)).

En 1985, d'autres travaux de DUBOIS (65) ont été réalisés par la même équipe sur le stéviolside et le rébaudioside. Ils démontrent que l'amertume de ces deux composés peut être éliminée en augmentant le caractère hydrophile de la molécule. Comme précédemment, ils synthétisent des analogues structuraux du stéviolside et du rébaudioside A par substitution du 19-O- $\beta$ -D-glucose.

TABLEAU XIII : Pouvoir sucrant de différentes molécules extraites de *Stevia Rebaudiana Bertoni*

	POUVOIR SUCRANT	CARACTERISTIQUES
Stéviolside	200	sucré
Rébaudioside A	350	très sucré
Rébaudioside B	ND	sucré
Rébaudioside C	75	amer
Rébaudioside D	ND	sucré
Rébaudioside E	ND	sucré
Dulcoside A	30	amer
Stéviolbioside	200	sucré
Stéviol	0	non sucré
Isostéviol	0	non sucré
Saccharose	1	sucré idéal

ND : Non Déterminé



Ces résultats confirment les travaux de HODGE et INGLET (66) qui ont étudié les relations structure et saveur sucrée de différents édulcorants naturels. Ils ont découvert l'existence de structures communes :

- une structure aglycane-hydrophobe ;
- un disaccharide avec une liaison  $\beta$ 1-2 glucosidique ;
- un groupement hydrophile (sucre, anions carboxyls).

#### B - LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Le stéviolside est une molécule amphiphile. Son noyau diterpénique la rend peu soluble dans l'eau. L'addition de groupements hydrophiles augmente la solubilité de la molécule (DUBOIS (65)).

La stabilité du stéviolside est essentiellement fonction du pH. En milieu basique, il s'hydrolyse en stéviolbioside (TABLEAU XIV p. 58) sans pour autant affecter ses propriétés sucrantes (FUJITA (67)). D'autres études (CHANG, (68)) montrent qu'en milieu acide, le stéviolside et le rébaudioside se dégradent lentement en fonction du temps et de la température (TABLEAUX XV - XVI p. 58, 59).

Les propriétés sucrantes et physico-chimiques (TABLEAU XVII p. 60) des différents stéviolsides substitués ou non ont été testées par DUBOIS et al. (65). Ils démontrent que le groupement 19-O- $\beta$ -D-glucoside n'est pas impliqué dans les propriétés sucrantes des différentes molécules et pourtant une substitution de ce groupement par des groupements de plus en plus hydrophiles diminue l'amertume existant dans les produits de départ. D'après ces études, les meilleurs composés sucrant sont : le 19-O-sodiosulfopropyl stéviolbioside et le 13-O( $\beta$ -D-glucopyranosyl(1  $\rightarrow$  2) ( $\beta$ -D-glucopyranosyl(1  $\rightarrow$  3)) $\beta$ -D-glucopyranosyl) (19-O-sodiosulfopropyl) stéviol correspondant à une valeur optimale d'hydrophilie. Ces composés ne présentent aucune amertume et possèdent des qualités sucrantes proches du saccharose.

#### C - LES PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES

##### 1) LES PROPRIETES PHYTOPHYSIOLOGIQUES

Ces propriétés sont largement controversées. En effet, certains auteurs (RUDDAT et al. (69)) démontrent que le stéviol possède une



TABLEAU XIV : Hydrolyse du stéviolside à 100°C pendant une heure

pH	Quantité de stéviolside hydrolysé en p. 100
3	2
5	1
7	0
8	3
9	1
10	53

TABLEAU XV : Hydrolyse du stéviolside et du rébaudioside à 100°C pH7 et pH 2,4

Temps en heure	QUANTITE DE STEVIOSIDE NON HYDROLYSE EN p. 100		QUANTITE DE REBAUDIOSIDE NON HYDROLYSE EN p. 100	
	pH 7	pH 2,4	pH 7	pH 2,4
0	100	100	100	100
4	-	46,2	-	56,8
10	-	21,9	-	19,2
12	83,7	-	-	-
13	-	13,7	-	13,2
22	79,4	-	88,6	-
48	66	-	68,5	-
65	38,2	-	-	-



- : non déterminé

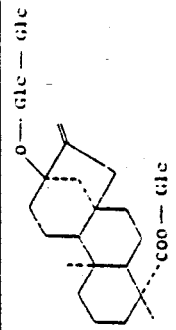
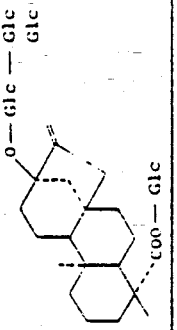
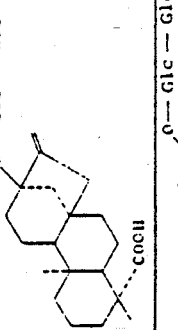
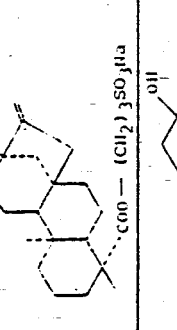
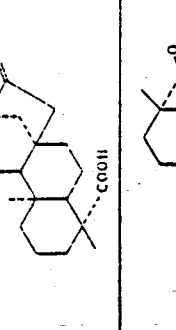
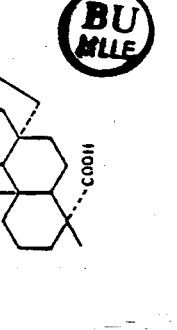
TABLEAU XVI : Stabilité en milieu acide du stéviolside et du rébaudioside en fonction des conditions de stockage

Durée en mois	p. 100 DE DEGRADATION DE STEVIOSIDE			p. 100 DE DEGRADATION DE REBAUDIOSIDE		
	4°C	22°C	37°C	4°C	22°C	37°C
0	0	0	0	0	0	0
0,6	0	0	0	-	-	-
1	-	-	-	0	0	0
2	-	-	-	0	0	0
2,3	0	0	17	-	-	-
3	-	-	-	0	0	12
4	0	0	36	0	11	19
5	0	0	40	-	-	25

- : non déterminé



TABLEAU XVII : Propriétés des analogues du stévioloside

STRUCTURES	P. S.	RAPPORT SUCRE/AMER (DUBOIS (65))	HYDROLYSE PAR LA FLORE INTESTINALE	STABILITE TEMPERATURE	STABILITE ACIDE BASIQUE	SOLUBILITE
<p>Stévioloside</p> 	200	62/32	oui stéviol	> 100°C	non stéviol bioside	1,2 g/l à 20°C eau
<p>Rébaudioside A</p> 	350	85/15	oui stéviol	> 100°C	non stéviol rébau.B	eau
<p>Stéviolbioside</p> 	200	65/35	oui stéviol	> 100°C	non stéviol bioside	eau
<p>19-O-sodiosulfo- propyl stéviol- bioside</p> 	500	92/8	non	> 100°C	oui stéviol bioside	eau
<p>Stéviol</p> 	-	-	-	> 100°C	non stéviol bioside	chloroforme
<p>Isostéviol</p> 	-	-	-	> 100°C	oui stéviol bioside	chloroforme



activité d'élongation des tiges comparable aux gibberellines alors que d'autres travaux (VALIO (70)) mettent en évidence un effet inhibiteur du stéviol sur la croissance végétative et la reproduction de la *Stevia Rebaudiana*. Si d'autres travaux (KOMAI (71)) montrent que le stéviocide présente une certaine activité, il semble néanmoins que ce soit le stéviol qui posséderait l'activité de type gibberelline la plus importante.

Tous ces résultats ont incité des chercheurs (RUDDAT (69), HANSON (72), BEARDER (73), MUROFUSHI (74), GIANFAGNA (75)) à analyser plus en détail les mécanismes de transformation du stéviol en analogues structuraux des facteurs à activité gibberelline.

## 2) PROPRIETES DIVERSES

Depuis sa découverte, de nombreuses propriétés ont été attribuées au stéviocide sans pour autant avoir fait l'objet d'études sérieuses. Actuellement, bien que les publications scientifiques soient peu nombreuses, il semble que les plus intéressés dans ce domaine soient les Brésiliens.

C'est en 1967, que VON SCHMELLING (76) décrit le stéviocide comme un produit acalorique. Cependant, en faisant abstraction du facteur pouvoir sucrant, cette propriété peut être mise en doute par les travaux de WINGARD (77) qui mettent en évidence l'hydrolyse du stéviocide en stéviol et glucose par la microflore intestinale.

De même, les propriétés hypoglycémiantes sont très controversées. En effet, d'après certains auteurs (VON SCHMELLING (76), AMARAL (78), SOEJARTO (79), OVIEDO (80)) l'extrait de feuilles de *Stevia* semble posséder ce type de propriété alors que d'autres travaux (USAMI (81)) prouvent le contraire. Cependant, les travaux de BRACHT (82) ont mis en évidence que le stéviocide mais surtout le stéviol inhibent la néoglucogénèse. En effet, comme le confirme un certain nombre d'expériences sur le 3-mercapto-piconilate, les indoles et les dérivés quinoléiques, il est généralement admis que les inhibiteurs de la néoglucogénèse entraînent une hypoglycémie.

Par ailleurs, une activité antibactérienne du stéviocide a été également mise en évidence (YAKU (83)). En effet, mis en incubation avec *L. plantarum*, *L. casei* et *S. mutans*, le stéviocide inhibe la

croissance de ces microorganismes responsables de la formation des caries dentaires. De plus, un brevet japonais montre que deux molécules purifiées à partir d'un extrait de *Stevia Rebaudiana* auraient des propriétés bactéricides dirigées contre *P. aeruginosa* et *Proteus vulgaris*. Enfin, certains auteurs (MITSUHASHI, (84)) parlent de propriétés tonicardiaques.

## II - DONNÉES TOXICOLOGIQUES

L'extrait de feuille de *Stevia Rebaudiana* et plus particulièrement le stéviolside ont fait l'objet de nombreuses études toxicologiques. En effet, la commercialisation du produit au Japon explique les nombreux travaux japonais. De plus, l'intérêt commercial d'une telle molécule (naturelle, très sucrante, stable) a incité également d'autres grands laboratoires à s'intéresser aux problèmes toxicologiques du stéviolside.

### A - LE STEVIOSIDE

#### 1) TOXICITE AIGUE

Bien que la notion de DL 50 soit abandonnée au profit de la Dose Journalière Admissible (DJA) un certain nombre de travaux ont été réalisés dans ce domaine. Les valeurs de la DL 50 varient en fonction du mode d'administration du produit, de l'animal traité et de la composition du produit. Les nombreuses valeurs sont reportées dans le tableau XVIII p. 63.

AKASHI (85) montre que la mort des animaux est due à "une coagulation dans l'estomac". MITSUHASHI (84) trouve que la paralysie des centres vasomoteurs et respiratoires dans la "medulla oblongata" est responsable de la mort des animaux.

Ces résultats japonais ne peuvent en aucun cas être utilisés pour constituer le dossier toxicologique. Et cela, pour trois raisons :

- Ils sont scientifiquement très incomplets ;
- Ils n'ont pas été obtenus suivant un protocole classique ;

TABLEAU XVIII : Doses létales

PRODUIT	p. 100 DE STEVIOSIDE	ANIMAUX	DL 50 g/kg				REFERENCES
			V.O.	S.C.	I.P.	I.V.	
Extrait brut	20	Souris	17				AKASHI, 1975 (85)
Extrait semi purifié	41	Souris	> 42				AKASHI, 1975 (85)
	50	Rats			3,4		LEE SANG JIK, 1979 (86)
	70	Souris	> 16	1,7	1,4	0,9	KURAHASHI, 1982 (87)
Extrait purifié	93,5	Souris	> 15				AKASHI, 1975 (85)
	100	Rats			> 3,4		LEE SANG, 1979 (86)
	100	Rats	8,2	8,2	1,6 1,9		TAMA BIOCHEMICAL, 1981 (84) MITSUHASHI
	100	Souris	8,2	8,2	2,4 3		TAMA BIOCHEMICAL, 1981 (84) MITSUHASHI

V.O. : Voie orale ; S.C. : Sous cutanée ; I.P. Intra-peritonéale ; I.V. : Intra-veineuse.



- Ce sont des rapports internes, propriété des sociétés japonaises qui ne les ont jamais publiés dans des revues scientifiques.

## 2) TOXICITE A TERME

### a - *Analyses toxicologiques sub-aiguës*

Ces études de toxicité ont été effectuées sur des extraits semi-purifiés (40 p. 100 de stéviolside) et sur du stéviolside pur, par AKASHI (85) et MITSUHASHI (84). Après une période de 1 et 3 mois, un certain nombre d'analyses ont été effectuées sur les rats (Tableau XIX p. 65).

Ces travaux montrent une légère diminution du poids à la plus forte dose correspondant à 3 g/kg/jour de stéviolside. Ils observent également des différences significatives dans les analyses sanguines (numération des globules rouges et blancs, taux d'hémoglobine) et biochimiques du sérum sans pour autant mettre en évidence une corrélation dose-effet. La biopsie des différents organes montre de légères anomalies en ce qui concerne le coeur, les poumons et la rate.

### b - *Toxicité chronique*

Un résumé des études de toxicologie chronique (Tableau XX p. 66) a été publié en 1984, par TAMA BIOCHEMICAL et complète les données toxicologiques de la *Stevia Rebaudiana*. Ces études ont été faites sur les bases suivantes : un Japonais mange 80 g de sucre par jour pour un poids moyen de 50 kg soit 1,6 g/kg/j. En prenant ensuite comme hypothèse que cette ration peut être remplacée à 50 p. 100 par du stéviolside (P.S. = 200) la quantité de stéviolside par jour et par kilo serait :

$$\frac{1,6 \times 0,5}{200} = 0,004 \text{ g/kg/jour soit } 4 \text{ mg/kg/jour}$$

Pour une prise de nourriture de 50 g/kg/jour, la dose maximale de 1 p. 100 correspond à une dose de 500 mg/kg/jour soit un facteur de sécurité de 125.

L'analyse des résultats montre certaines variations qui ne sont pourtant pas en corrélation avec les doses administrées. Il faut noter cependant que plus de mâles que de femelles sont morts avant la fin

TABLEAU XIX : Analyses toxicologiques sub-aiguës

	AKASHI (85)	MITSUHASHI (84)
Produit testé	Extrait semi purifié (41 % de stéviolside)	Stéviolside pur
Méthode d'administration	Produit mélangé à la nourriture	par gavage
Doses	0 % (témoin)    0,28 %    1,4 %    7 %	0 % (témoin)    0,28 %    1,4 %    7 %
Animaux	15 rats mâles, 15 rats femelles pour chaque dose	6 rats mâles et 6 rats femelles pour chaque dose
Durée	3 mois	1 mois
Analyses effectuées	<ul style="list-style-type: none"> <li>- variation de poids</li> <li>- prise de nourriture</li> <li>- analyses sanguines</li> <li>- analyses biochimiques du sérum</li> <li>- analyses d'urine</li> <li>- analyses des différents organes</li> <li>- analyses histopathologiques</li> </ul>	





TABLEAU XX : Toxicité chronique (Tama Biochemical, 1984 (88))

	TOXICITE CHRONIQUE	TEST DE CARCINOGENESE
Composition du produit testé	74,5 % de stéviolside 16,3 % de Rébaudioside A	74,5 % de stéviolside 16,3 % de Rébaudioside A
Administration	Voix orale Produit mélangé à la nourriture	idem
Animaux	Rats du type F344/DuCrj-Strain	idem
Doses p. 100 g/j	0 (témoin)      0,1      0,3      1	0      0,3      1
Doses en mg de produit/kg/j	0                  100      300      1000	0      300      1000
Groupes	30 mâles et 30 femelles par doses	50 mâles et 50 femelles par doses
Méthodes et analyses	10 animaux sont tués pour analyses au bout de 6, 12 et 24 mois - variation de poids - stabilité du produit - analyse d'urine - analyse de sang - biopsie - analyse histopathologique	Animaux tués après 24 mois et 39 organes analysés : histologiquement et pathologiquement



de l'expérience. En effet, après 22 mois d'expérience le taux de mortalité des mâles a dépassé les 60 p. 100. L'analyse de ces rats morts précocement a révélé des abcès et une atrophie des testicules. Malgré ces quelques résultats inquiétants les auteurs concluent qu'aucun trouble significatif n'apparaît après administration de stévioside.

Dans des conditions semblables, des tests de carcinogénèse ont été réalisés sur 39 organes. Après les examens histologiques et pathologiques, ils concluent que le stévioside n'a aucune incidence sur la cancérogénèse. Enfin, dans des travaux récents, HAGIWARA (89) a montré que le stévioside à une dose de 5 p. 100 donné à des rats pendant 36 semaines ne provoque pas de cancer de la vessie.

### c - Conclusions

Comme précédemment, ces résultats ne sont pas exploitables scientifiquement. D'une part, nous ne possédons que des résumés d'études et d'autre part, les travaux n'ont pas été effectués suivant les normes du Journal Officiel.

En effet, les preuves de toxicité à terme doivent porter sur au moins deux espèces de mammifères dont l'un n'appartient pas à l'ordre des rongeurs (par exemple, Rat et Chien). Les Japonais n'ont fait aucune expérience sur le Chien. De plus, l'expérimentation doit se faire sur cinq lots minimum dont un lot témoin (uniquement trois doses dans les études japonaises).

### 3) PROPRIETES CONTRACEPTIVES

Bien qu'aucune étude sérieuse n'ait été entreprise à ce sujet, une tradition paraguayenne prétend que les indiennes du Matto Grosso utiliseraient les feuilles de *Stevia Rebaudiana* en décoction afin de réguler les naissances. En tenant compte de cette pratique et surtout des travaux de PLANAS en 1968 (90) un doute s'est installé sur les propriétés contraceptives de la *Stevia Rebaudiana*. La figure 6 p. 68 résume le protocole des expériences réalisées par PLANAS. Dans cette étude, la dose d'extrait brut de *Stevia* a été calculée en s'appuyant sur les habitudes des indiennes qui prennent par jour une décoction de 15 g de feuilles dans 300 ml d'eau. Le traitement des rats a donc été de 10 ml/jour d'une décoction de *Stevia* à 5 p. 100.

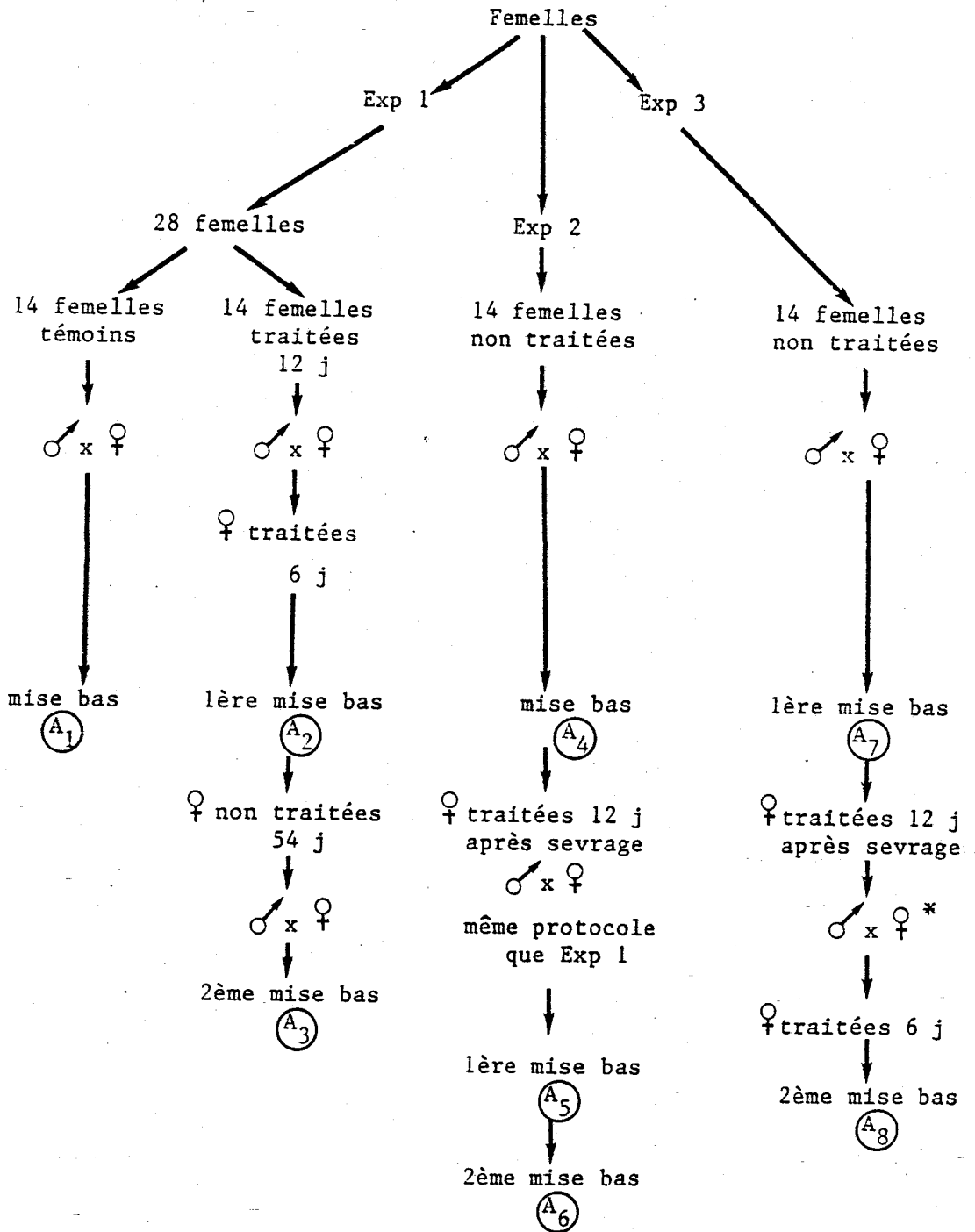


FIGURE 6 : Protocole des expériences de PLANAS (99)



♂ x ♀ : accouplement mâles et femelles au hasard  
 ♂ x ♀\* : accouplement même mâle, même femelle qu'au premier accouplement

Exp : expérience

(A<sub>1</sub>) (A<sub>2</sub>) .. : analyse des résultats dans le tableau XXI

J : jour

Le tableau XXI p. 70 nous montre qu'il y a une forte diminution de la fertilité pour les premiers accouplements après traitement. On remarque qu'après arrêt du traitement, le taux de fertilité redevient plus important (expérience 1 et 2). Ces résultats tendent à prouver que l'action de l'extrait de *Stevia Rebaudiana* serait réversible.

Les travaux japonais récapitulés dans le tableau XXII p. 71 ont été réalisés dans le but de contredire les travaux de PLANAS. L'analyse de ces résultats (Tableaux XXIII à XXV, p. 72, 73) montre peu d'anomalies. Cependant, si dans la majorité des études la plupart des auteurs ont fait des analyses classiques (variation de poids, quantité de produit pris par jour, taux d'accouplement, taux de grossesse, nombre de foetus par portée), MORI (91) a étudié le nombre de corps jaunes, le nombre d'implantations, le nombre de foetus morts et le nombre de résorptions précoces.

En effet, d'après le tableau XXVI p. 73, on remarque un faible taux d'implantations à la dose de 0,15 p. 100 et surtout une légère augmentation du nombre de résorptions précoces en relation avec les doses. Ces auteurs concluent néanmoins qu'aucune différence significative n'est observée et que le stéviolside n'a donc aucun effet sur la reproduction et sur la fertilité des rats. Ils signalent enfin qu'aucune anomalie externe, interne et squelettique n'a été observée chez les foetus.

Tous ces travaux seront à comparer à nos études toxicologiques effectuées dans des conditions semblables mais sur des souris.

Enfin, d'un point de vue fondamental, SCHVARTZMAN (92) montre que l'extrait aqueux de *Stevia Rebaudiana* n'a pas d'effet toxique spécifique sur le cycle cellulaire. Ces études ont été réalisées sur des cellules de méristème de *Allium cepa* à des doses de 1 et 10 p. 100. Après 2, 4, 6 et 24 heures de traitement, l'évolution des indices mitotiques est tout à fait normale.

#### *Conclusions concernant l'action du stéviolside sur les fonctions de reproduction*

À l'heure actuelle, l'éventualité de propriété contraceptive du stéviolside repose sur les travaux de PLANAS (90) qui a pourtant

TABLEAU XXI : Récapitulation des résultats de PLANAS (99)

	AGE MOYEN EN JOUR	NOMBRE DE FEMELLES GRAVIDES	NOMBRE TOTAL DE NOUVEAUX NES	NOMBRE MOYEN DE NOUVEAUX NES TEMOIN BASE 100	TAUX DE FERTILITE P. 100	BAISSE DE FERTILITE P. 100
EXP 1 Témoïn (A <sub>1</sub> ) traitées (A <sub>2</sub> ) (A <sub>3</sub> )	96	11	65	6	78	0
	98	3	17	6	21	73
	153	4	21	5	28	64
EXP 2 Témoïn (A <sub>4</sub> ) Traitées (A <sub>5</sub> ) (A <sub>6</sub> )	101	14	91	6,5	100	0
	146	4	22	5,5	28	72
	196	6	32	5,5	43	57
EXP 3 Témoïn (A <sub>7</sub> ) Traitées (A <sub>8</sub> )	108	14	86	6	100	0
	148	3	21	7	21	79



TABLEAU XXII : Travaux japonais sur les effets contraceptifs du stéviolside

	AKASHI, 1975	TAMA BIO, 1979,1981	MORI, 1981
Produits	A. Extrait brut à 0,14 % B. Extrait semi-purifié à 0,14 % C. Extrait purifié à 0,14 %	Extraits Bruts stéviolside	Stéviolside
Méthodes d'adminis- tration	Voie orale : produit mélangé à à la nourriture	Voie orale pour l'extrait brut mélangé à la nourriture pour le le stéviolside	Mélangé à la nourriture
Doses en produit	0,67 p. 100 de A 0,35 p. 100 de B 0,15 p. 100 de C	3 %	0,15 %    0,75 %    3 %
Dose en stéviolside en g/kg/j	0,14 % soit 100 mg/kg/j	Pour l'Extrait Brut : 525 mg/kg/j Pour le stéviolside : 2 g/kg/j	0,15 g    0,75 g    3 g
Animaux	Rats de 13 semaines 5 mâles et 10 femelles	20 rats mâles et 20 femelles	Rats
Méthodes	T <sub>-21</sub> Traitement des mâles et femelles .21 jours avant l'accouplement To Accouplement To + 21 : nourriture normale pendant 21 jours T <sub>21</sub> 50 % des femelles sacrifiées 50 % mettent bas	Les mâles : traitement 60 jours avant l'accouplement Les femelles : traitement 14 jours avant l'accouplement Accouplement mâles et femelles Traitement des femelles 7 jours après l'accouplement	
Analyses	Variation de poids mâles et femelles Quantité de produit pris Nombre de femelles mâtées Nombre de foetus Etat des foetus	Variation de poids Quantité de produit pris Taux d'accouplement Taux de grossesse Examen histologique des organes sexués Nombre de foetus Développement des foetus	Variation de poids Quantité de produits pris Taux de grossesse Taux de fertilité Etat des foetus Nombre de corps jaunes Nombre d'implants Taux de résorption Analyse du système squelettique du foetus
Résultats	Aucune différence significative (cf Tableaux XXIII et XXIV p. 72) Résultat à confirmer avec un plus grand nombre d'animaux.	Aucun effet contraceptif n'a été mis en évidence	cf. Tableaux XXV et XXVI p. 73



TABLEAU XXIII : Effet du stéviolside sur le taux de gravidité de rates  
(AKASHI (85))

Groupe	Nombre de femelles	Nombre de femelles gravides								Taux de gravidité	Témoin Base 100
		Jour de détection d'un B.V. positif							Total		
		1	2	3	4	5	6	7			
Témoin	10	1	0	2	3	2	0	0	8	80	100
Extrait A	10	0	2	2	2	0	0	0	6	60	75
Extrait B	10	1	1	3	2	1	0	0	8	80	100
Extrait C	10	0	2	3	2	0	0	0	7	70	88

B.V. : bouchon vaginal

TABLEAU XXIV : Effet du stéviolside sur la fertilité des rats (AKASHI (85))

Mâles n°	1		2		3		4		5	
Femelles n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Témoin	0	0	X	0	X	0	0	0	0	0
Extrait A	X	0	X	0	0	0	X	0	X	0
Extrait B	0	X	0	0	0	0	0	X	0	0
Extrait C	0	0	X	0	0	0	X	0	0	X

X : femelle non gravide

O : femelle gravide



TABLEAU XXV : Effet du stéviolside sur les fonctions de reproduction selon MORI (91)

	TEMOIN	STEVIOSIDE 0,15 %	STEVIOSIDE 0,75 %	STEVIOSIDE 3 %
Nombre de femelles	22	22	22	22
Nombre d'accouplements	21	21	21	21
Taux d'accouplement	95,5	95,5	95,5	95,5
Jours de gravidité 1	7	5	6	4
2	7	4	5	9
3	3	6	6	3
4	3	6	4	4
5	0	0	0	1
6-14	1	0	0	0
Nombre de rates gravides	19	19	20	19
Taux de fertilité	90,5	90,5	95,2	95,5

TABLEAU XXVI : Effet du stéviolside sur les foetus (MORI (91))

	TEMOIN	STEVIOSIDE 0,15 %	STEVIOSIDE 0,75 %	STEVIOSIDE 3 %
Nombre de femelles gravides	19	19	20	19
Nombre de corps jaunes	15,7 ± 2,1	15,3 ± 1,9	16,1 ± 1,8	15,3 ± 1,9
Nombre d'implants	14,5 ± 2,3	13,0 ± 4,2	14,5 ± 1,6	14,1 ± 1,2
Taux d'implantations	92,49 ± 7,70	85,24 ± 25,36	90,57 ± 9,98	92,71 ± 10,16
Nombre de foetus vivants	14,2 ± 2,3	12,8 ± 4,0	14,2 ± 1,6	13,6 ± 1,2
Taux	97,87 ± 4,03	98,69 ± 3,42	98,00 ± 3,82	97,13 ± 5,47
Nombre de résorptions précoces	6	4	6	9
Taux	1,43 ± 2,79	1,31 ± 3,43	2,02 ± 3,83	3,29 ± 4,91
Anomalies externes	0	0	0	0



uniquement étudié l'effet d'un extrait brut de *Stevia*. Par ailleurs, ces résultats sont démentis par tous les travaux japonais qui, réalisés dans des conditions différentes mais aussi bien sur un extrait brut que sur du stévioloside pur, démontrent l'innocuité du produit. Cependant, les résultats que nous avons ne permettent en aucun cas de conclure à un quelconque effet du stévioloside sur les fonctions de reproduction.

En effet, les Japonais n'ont testé le stévioloside que sur la première génération alors que les réglementations occidentales demandent des études multigénérationnelles.

#### 4) EFFETS MUTAGENES

Tous les travaux exposés dans un rapport de TAMA BIOCHEMICAL de 1981, mettent en évidence l'absence d'effet mutagène de l'extrait de *Stevia Rebaudiana* et du stévioloside. Aussi bien dans des tests de mutation bactérienne que dans des essais de recombinaison d'ADN bactérien et d'aberration chromosomique, aucune modification significative ne fut relevée (TABLEAU XXVII p. 74).

Enfin, des essais *in vivo* sur rats, vers à soie et souris n'ont révélé aucun effet mutagène (MITSUHASHI (84)). Par ailleurs, ISHIDATE (93, 94) montre que le stévioloside provoque des aberrations chromosomiques *in vivo*. La  $D_{20}$  qui correspond à la dose en mg/ml de produit qui provoque des aberrations chromosomiques dans 20 p. 100 des cellules à la métaphase est de 2,7 pour le stévioloside (à une dose de 70 mg/ml, la  $D_{20}$  du saccharose est négative). Cependant, il semble donner une réponse négative aux tests de AMES. En 1978, OKUMURA (95) n'observe aucune inhibition dans les essais de recombinaison entre *Bacillus subtilis* M17 ( $rec^+$ ) et M45 ( $rec^-$ ) en présence d'extrait de feuilles et de stévioloside. Les tests de réversion avec les souches *E. coli* WP<sub>2</sub> et *Salmonella typhimurium* TA ainsi que les tests de fréquence mutagénique s'avèrent tous négatifs.

Dans des travaux brésiliens, KERR (96) montre qu'en utilisant le test Muller 5, le stévioloside n'a aucun effet mutagène sur des souches de *Drosophila melanogaster*. Ces travaux confirment les résultats japonais et les résultats américains qui ont utilisé une souche de *Salmonella typhimurium* TM677.

TABLEAU XXVII : Travaux japonais. Etudes de mutagénicité (TAMA BIOCHEMICAL (84))

	DEMANDEES PAR	REALISEES PAR	PRODUITS TESTES		
			EXTRAIT BRUT	EXTRAIT SEMI-PURIFIE	STEVIOSIDE
Mutation bactérienne Test de Ames (107)	Stevia Industry Group and Tama Biochemical Co., Ltd	Food & Drug Safety Center	o	o	o
	Nikken Chemicals Co., Ltd	Nikken Chemicals Co., Ltd	o	o	o
	National Cancer Center	National Cancer Center		o	o
	National Cancer Center	Kyushu University		o	o
	National Cancer Center	Nat. Institute of Hygienic Sciences		o	o
	Nikken Chemicals	Nikken Chemicals Co., Ltd		o	o
	National Cancer Center	Nat. Institute of Heredity		o	o
	National Cancer Center	Doshisha University		o	o
Essais de recombinaison d'A.D.N.	National Cancer Center	Kobe University		o	o
	National Cancer Center	Hokkaido University		o	o
	National Cancer Center	Nat. Inst. of Hygienic Sciences		o	o
Aberration chromosomique					



o : essais effectués

D'après ces derniers travaux, il semble que le stéviolside ne soit pas mutagène. Cependant, comme le montre le paragraphe suivant, il n'en est apparemment pas de même avec le stéviol. Le problème de la mutagénicité du stéviolside "via" le stéviol reste donc entier.

## B - LE STEVIOL

Si l'on admet les résultats de WINGARD (77), qui démontre que le stéviolside est dégradé en stéviol, lui-même absorbé au niveau de la paroi intestinale, il est normal de s'intéresser à la toxicité éventuelle de cette molécule. Un certain nombre de travaux montrent que cette molécule proche des hormones stéroïdiennes possède des propriétés anti-androgéniques, des propriétés de blocage de la chaîne respiratoire et enfin un certain pouvoir mutagène.

### 1) ACTIVITE ANTI-ANDROGENIQUE

En 1960, DORFMAN (97) montre que le stéviol et le dihydroisostéviol possèdent une faible activité anti-androgénique se traduisant par une inhibition du développement des crêtes de poussin. Par ailleurs, le dihydroisostéviol a été également testé pour son activité anti-androgénique sur des rats castrés. Aux doses testées, 15 et 20 mg par rat, le dihydroisostéviol n'inhibe pas l'action de la testostérone qui favorise le développement des vésicules séminales, de la prostate et des muscles.

### 2) ACTION SUR LA CHAINE DE PHOSPHORYLATION OXYDATIVE

VIGNAIS et al. (98) montrent que le stéviol et le dihydrostéviol affectent différentes fonctions des mitochondries de foie de Rat. En effet, ces auteurs démontrent que le stéviol est un fort inhibiteur de la synthèse d'ATP. A une dose de 0,4 mM, le stéviol inhibe à 50 p. 100 la synthèse d'ATP. Le dihydrostéviol et le stéviolside sont respectivement 3 fois et 30 fois moins actifs que le stéviol. Ils démontrent également que le stéviol inhibe les échanges des nucléotides à adénine endogènes et exogènes à travers la membrane mitochondriale. Enfin, le stéviol et le dihydrostéviol auraient un léger effet inhibiteur sur l'oxydation du NADH. Ces différents résultats montrent que le stéviol inhibe la biosynthèse d'ATP dans la chaîne de phosphorylation oxydative par blocage des échanges de nucléotides à travers la membrane mitochondriale.

L'inhibition de la phosphorylation de l'ADP dans les mitochondries a d'importantes conséquences sur tout l'organisme. A cet effet, YAMAMOTO (99) étudie sur des cellules intactes (tubules rénaux de Rat) l'influence du stéviol et autres analogues structuraux sur la gluconéogenèse. Ces travaux montrent d'une part, qu'à une concentration de 1 mM le stéviol et l'isostéviol inhibent totalement la production de glucose et que, d'autre part, ils inhibent à 50 p. 100 la production d'oxygène à une concentration de 0,4 mM.

Il est à noter par contre que le stéviolside et le stéviolbioside n'ont aucun effet sur la gluconéogenèse et sur la respiration. Ce dernier résultat diffère de ceux de VIGNAIS montrant une inhibition à 50 p. 100 de la phosphorylation oxydative pour une concentration de 1 mM en stéviolside.

En 1984, BRACHT et al (82) complètent les travaux de VIGNAIS et YAMAMOTO sur l'action du stéviolside, du stéviolbioside, du stéviol et de l'isostéviol sur les mitochondries de foie de Rat. Suite à ces résultats, ils analysent les conséquences physiologiques que peut entraîner l'ingestion de stéviolside ou d'extrait de *Stevia Rebaudiana*. Ils montrent en particulier la relation possible entre les propriétés hypoglycémiantes de la *Stevia Rebaudiana* et l'inhibition de la gluconéogenèse dans les tubules rénaux de Rat. Ils soulignent, enfin, la possibilité d'hydrolyse par la flore intestinale du stéviolside en stéviol ou isostéviol, produits beaucoup plus inhibiteurs des fonctions mitochondriales que le stéviolside.

### 3) ACTION MUTAGENE

Très récemment PEZZUTO (100) a montré que le stéviol possède un fort pouvoir mutagène envers *S. typhimurium* strain TM 677. L'expression de cette activité mutagène dépend d'un prétraitement des rats avec de l'Aroclor 1254 et de l'addition de NADPH. L'existence d'un hydroxyle, en C<sub>13</sub> et de la double liaison carbone C<sub>16</sub> carbone C<sub>17</sub> (cf : structure du stéviol, Figure 3 p. 50) semble déterminante. En effet, l'isostéviol (transformation en milieu acide du stéviol par réarrangement de Meerwein) ne présente aucune activité mutagène. S'il a été démontré chez le Rat et non chez l'Homme que le stéviolside est dégradé en stéviol, l'activité mutagène du stéviol nécessite quand même une activation métabolique externe.

#### 4) PROPRIÉTÉ ANTITUMORALE

En 1983, OKAMOTO et al. (101) suggèrent que le stéviol inhibe l'induction d'EBV-EA (Epstein-Barr virus-early antigen) sur des cellules Raji et également l'activité de l'ODC (Ornithine Decarboxylase) de la peau de Souris.

En effet, dans un premier temps (101), ces auteurs montrent que l'induction des antigènes précoces (EBV-EA) responsables de tumeur dans les cellules Raji est inhibée à 80 p. 100 par le stéviol à une concentration de 50 µg/ml (aucun effet n'est observé à la dose de 2,5 µg/ml). Dans un second temps (102), après avoir démontré que l'activité de l'ODC était un marqueur précoce de tumeur de la peau de Souris, ils ont mis en évidence que le stéviol interférait dans l'induction de l'enzyme par le TPA (Promoteur de Tumeur). En effet, à une dose de 200 nM, le stéviol provoque une baisse de 63 p. 100 de l'activité de l'ODC. Il semblerait donc que le stéviol soit un inhibiteur de la tumeur induite par le TPA. Il faut souligner que le stéviolose ne possède pas cette propriété.

#### C - CONCLUSIONS TOXICOLOGIQUES

Tous ces résultats mettent en évidence deux tendances. D'une part, celle des japonais qui clament l'innocuité du stéviolose sans pour autant fournir des résultats scientifiques complets et, d'autre part, celle des équipes américaines, brésiliennes et françaises qui publient des résultats inquiétants surtout en ce qui concerne le stéviol.

En effet, la dégradation du stéviolose en stéviol et les propriétés toxicologiques de ce dernier remettent en cause l'innocuité du produit et plus particulièrement les travaux japonais.

#### IV - APPLICATIONS ET UTILISATION DE LA STÉVIA

##### A - LES AUTORISATIONS

A l'heure actuelle, il est certain que le stévioloside et l'extrait de *Stevia Rebaudiana* sont autorisés au Japon. Par ailleurs, il semble que des sachets et des pastilles de *Stévia* soit commercialisés au Brésil depuis 1980 (BRACHT (82)) ainsi qu'au Paraguay pour un traitement d'hyperglycémie. Enfin, en Belgique l'extrait de *Stevia* est autorisé et vendu en pharmacie comme édulcorant naturel.

##### B - LES UTILISATIONS

Au Japon, le stévioloside et l'extrait de *Stévia* sont commercialisés depuis 1975. Depuis 1979, la consommation a plus que doublé et est passée à 150 tonnes en 1981. Cette croissance rapide est due à plusieurs facteurs. Tout d'abord, l'impact de l'image de marque du produit : le stévioloside est un édulcorant naturel et non synthétique. Cette qualité touche énormément le consommateur japonais. Enfin, le produit est peu cher de part son pouvoir sucrant et sa diminution de coût de production (sélection de plante et rendement amélioré). En fait, le stévioloside pur est rarement employé en tant que tel, vu sa faible solubilité (0,12 % dans l'eau à température ambiante) et son arrière-goût peu agréable à forte concentration.

Il existe donc sur le marché un certain nombre de "stéviolosides" de plus ou moins bon goût. Le produit est commercialisé par différentes sociétés qui ont formé un fond de coopération : la *Stévia Association*. Par exemple, Toyo Sugar Refining commercialise sous le nom de *Stevia* un produit utilisé comme édulcorant de table, dans les sauces, les potages, les sirops...

La société MARUZEN commercialise le stévioloside sous de nombreuses formes et principalement pour une alimentation diététique.

Cependant, les défauts de goût en limitent la substitution à un maximum de 50 p. 100. Par exemple, PEPSI-COLA l'utilise avec 50 p. 100

de fructose dans des boissons pour diabétiques. COCA COLA utilise l'" $\alpha$ -G-sweet" qui est un stéviolside modifié par voie enzymatique ayant la réputation d'avoir meilleur goût avec cependant un pouvoir sucrant diminué de moitié. Très peu d'études toxicologiques ont été effectuées sur ce produit. Par ailleurs, depuis juin 1983, la Société JEFCO associée au centre japonais de recherche sur le sucre propose du stéviolside pur grâce à une technique de séparation très poussée. Ce produit qui, paraît-il, ne présente plus les inconvénients des premiers stéviolsides a un pouvoir sucrant de 300 pour un prix de 48 \$ le kilogramme (ROQUE (106)).

Enfin, un autre "stéviolside" contient 55 p. 100 de Rebaudioside (dont le goût et la solubilité sont nettement meilleurs) et 45 p. 100 de stéviolside. Ce produit se vend à 30 \$ le kilogramme (ROQUE (106)).

#### C - CONCLUSION

Réellement connu depuis 1955, le stéviolside ne connaît pas un développement en rapport avec ses multiples propriétés. Il est évident que ses problèmes toxicologiques sont en grande partie responsables de cet échec.

Cependant en 1975, au Japon, le stéviolside a bénéficié d'un climat favorable pour son lancement commercial. Avec pourtant peu de données toxicologiques, cet édulcorant naturel est arrivé au moment où les cyclamates furent interdits et la saccharine soupçonnée de pouvoir cancérigène. Depuis, aussi bien les pouvoirs publics que les industriels japonais ont réalisé de nombreux travaux toxicologiques démontrant l'innocuité totale du produit !

## TRAVAUX PERSONNELS



## MATERIEL ET METHODES

### I - LA PRÉPARATION

#### A - L'EXTRACTION

Après un tri grossier des lots de *Stévia* provenant du Paraguay (élimination des tiges, morceaux de bois, terre, etc...), l'extraction du stéviol et du rébaudioside est réalisée dans différents systèmes solvants : eau de distribution, eau déminéralisée (50.000  $\Omega$ ), eau stérile déminéralisée (18. 10<sup>6</sup>  $\Omega$ ), acétonitrile (FISON, HPLC grade), solution de phosphate monopotassique 30 mM.

Avec ou sans broyage, la solubilisation peut être effectuée à partir d'une macération des feuilles ou d'une percolation de système solvant. Dans tous les cas, le rendement d'extraction dépendra :

- du système solvant ;
- du rapport matière sèche sur volume d'extraction ;
- de la température d'extraction ;
- de la durée d'extraction.

Les études réalisées en laboratoire en vue de leur application industrielle nous ont amenés à étudier essentiellement le cas de l'eau. Le rendement d'extraction a été étudié pour 10 g de feuilles en fonction :

- du volume d'extraction : 100, 200, 400 et 600 ml ;
- de la température d'extraction : 20, 40, 60 et 80°C ;
- de la durée d'extraction : prises d'essais toutes les 30 minutes pendant deux heures.

Quand on désire doser le stéviol ou le rébaudioside sans purification préalable, l'extraction est réalisée sur 5 g de feuilles broyées au Polytron (1 000 tours par minute, pendant 5 minutes) dans 200 ml d'un mélange eau/acétonitrile (1/1 ; v/v). De même, le dosage du stéviol ou de l'isostéviol est réalisé dans 50 ml d'un mélange

acétonitrile/phosphate monopotassique 30 mM (60/40 ; v/v) pour 5 g de feuilles. Dans les deux cas, l'extraction est effectuée pendant 30 minutes à 45°C.

#### B - PREFILTRATION - CENTRIFUGATION

Les suspensions obtenues après extraction sont préfiltrées sur verre fritté G<sub>1</sub>. Le filtrat est ensuite centrifugé sur Beckman J21 B avec un rotor JA 14 pendant 45 minutes à 10 000 tours/minute.

#### C - ULTRAFILTRATION

Nous avons utilisé différents systèmes d'ultrafiltration dont les principales caractéristiques sont rassemblées dans le tableau XXVIII p. 83. Ces essais ont été effectués sur différents produits :

- extrait brut ;
- extrait brut après préfiltration ;
- extrait brut après centrifugation.

Les conditions d'ultrafiltration sont fonction du module utilisé. Dans tous les cas, le débit de perméat, la température et la pression moyenne sont contrôlés.

#### D - CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR RESINE ANIONIQUE AMBERLITE IRA 94 S

Les essais en laboratoire ont été effectués sur colonne en verre de diamètre intérieur 2 cm et de hauteur 14 cm. Cette étape de séparation a été étudiée en fonction de son rendement de purification. Pour cela, nous avons fait varier différents paramètres :

- la nature des échantillons injectés : extrait brut, extrait brut après ultrafiltration ;
- le volume d'injection : 10, 20, 40, 100 ml ;
- la concentration des échantillons : 2, 5, 10, 20, 50 g.l<sup>-1</sup>
- le système d'élution : eau, eau/méthanol à 10, 20 et 40 p. 100.

Le débit est de 50 ml.h<sup>-1</sup> et la collecte des fractions toutes les 10 minutes.

TABLEAU XXVIII : Caractéristiques de différents modules d'ultrafiltration

FABRICANTS	AMICON			MILLIPORE		SFEC (C.E.A.)	
Module	Cellule 8400	DC2	DC2	FTHP	FTHP	1 S1	1 S7
Membrane	PM 10	H1 P10-20	H1 P3-20	PTGC	PCAC	M 4	M 5
Seuil de coupure	10.000	10.000	3.000	10.000	1.000	20 - 40.000	10 - 20.000
Système d'ultrafiltration	Agitation	Fibres creuses	Fibres creuses	Tangentielle	Tangentielle	Tangentielle	Tangentielle
Nature des membranes	Polysulfone	Polysulfone	Polysulfone	Polysulfone	Cellulosique	Minérale	Minérale
Surface utilisée	42 cm <sup>2</sup>	550 cm <sup>2</sup>	550 cm <sup>2</sup>	4.600 cm <sup>2</sup>	4.600 cm <sup>2</sup>	220 cm <sup>2</sup>	1.540 cm <sup>2</sup>
Débit en eau	4ml.min <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	30ml.min <sup>-1</sup>	150ml.min <sup>-1</sup>	70l.h <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> à P:4,6 bars	161.l.h <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> à P:4,6 bars	250l.h <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> 4 bars 25°C	250l.h <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> 4 bars 25°C
Potentiel surface	42 cm <sup>2</sup>	500 cm <sup>2</sup>	550 cm <sup>2</sup>	4,6 m <sup>2</sup>	4,6 m <sup>2</sup>	0,022 m <sup>2</sup>	0,154 m <sup>2</sup>
Recirculation	-	0,6 l.min <sup>-1</sup>	0,6 l.min <sup>-1</sup>	700 l.h <sup>-1</sup>	700 l.h <sup>-1</sup>	500 l.h <sup>-1</sup>	500 l.h <sup>-1</sup>
Pression maximale	4,3 bars	0,7 bars	0,7 bars	10 bars	10 bars	20 bars	20 bars



### E - CONCENTRATION SUR RESINE AMBERLITE XAD<sub>2</sub>

Pour cette étape, nous avons utilisé une colonne en verre de 2 cm de diamètre intérieur et de hauteur 10 cm. Les conditions d'absorption et de décrochage des molécules de stévioside et rébaudioside ont été étudiées en fonction de la nature du solvant : eau, eau/méthanol à 10, 20, 40 et 100 p. 100, éthanol. Le débit est de  $50 \text{ ml.h}^{-1}$ , identique à celui de la colonne de purification.

### F - LA CRISTALLISATION

Cette étape de purification a été effectuée dans du méthanol et de l'éthanol bon goût à température ambiante et à  $4^{\circ}\text{C}$ . La solution est préalablement concentrée à l'évaporateur rotatif sous vide partiel et à une température de  $35^{\circ}\text{C}$  de façon à obtenir une solution sursaturée.

### G - CHROMATOGRAPHIE A CONTRE-COURANT

#### 1) MATERIEL

Le chromatographe à contre-courant est du type Büchi 670. Il comprend 6 racks de 49 colonnes de 2,7 mm de diamètre et 40 cm de hauteur.

#### 2) PREPARATION DES ECHANTILLONS

L'échantillon à injecter se prépare à partir de produit lyophilisé dilué dans 7,5 ml de phase stationnaire et 7,5 ml de phase mobile. La solution est filtrée sur verre fritté G3 puis injectée.

#### 3) METHODES

La chromatographie à contre-courant (système D.C.C.C.) est fondée sur la chromatographie de partage. La phase mobile et la phase stationnaire sont liquides et non miscibles. Le mélange de solvants utilisé est : chloroforme, méthanol, isopropanol, eau (11/9/4/8 ; v/v). Nous avons utilisé le chromatographe en mode ascendant en vertu de la différence de densité : un courant de gouttelettes constituant la phase mobile (phase légère du solvant) monte dans la phase stationnaire (phase lourde du solvant). Le débit de la phase mobile est de  $10 \text{ ml.h}^{-1}$ .

Cette méthode a été principalement utilisée pour préparer du rébaudioside pur à partir de surnageant de cristallisation.

## II - CARACTÉRISATIONS ET DOSAGES

### A - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE

#### 1) LE STEVIOSIDE ET LE REBAUDIOSIDE

Pour cette séparation, nous avons utilisé des plaques de silice Kieselgel 60 (MERCK, épaisseur de silice 0,2 mm ; dimension 20 x 20 cm). La méthode est la suivante :

On dépose 5  $\mu$ l de produit sur la couche mince. Après une migration de 2 heures dans un système solvant monophasique acétate d'éthyle, méthanol, eau dans les rapports 75/25/10 (v/v), la plaque est séchée. Après séchage, on procède à une pulvérisation à l'orcinol sulfurique fraîchement préparé à partir de 200 mg d'orcinol : le 3,5-dihydroxytoluène-monohydrate (MERCK) pour 100 ml d'acide sulfurique à 20 p. 100. La révélation se fait à 100-110°C pendant 10 minutes et met en évidence tous les oligosaccharides neutres.

Pour le dosage, les échantillons (5  $\mu$ l) sont déposés à côté de témoins stéviocide et rébaudioside de concentration connue. Les méthodes de migration, révélation et séchage sont identiques. La plaque est ensuite soumise à une détection dans le visible par réflectance (appareil de type Vernon). L'établissement de courbes étalons (Figure 7 p. 86) permet de quantifier le stéviocide et le rébaudioside dans l'échantillon déposé. La loi de BEER LAMBERT est vérifiée pour une zone de concentration en stéviocide et rébaudioside comprise entre 0,1  $\text{g.l}^{-1}$  et 1,6  $\text{g.l}^{-1}$ .

#### 2) LE STEVIOL ET L'ISOSTEVIOL

Pour cette séparation, nous utilisons les mêmes plaques que précédemment. Après dépôt des échantillons, la migration s'effectue dans un système solvant monophasique : hexane, acétate d'éthyle (50/50 ; v/v). Après 2 heures de migration, la plaque est séchée et on pulvérise un réactif spécifique des stéroïdes : le sulfate de cérium qui se prépare à partir d'une solution saturée de sulfate de cérium (IV) dans l'acide sulfurique à 65 p. 100.

La révélation se fait à 150°C pendant 10 minutes.

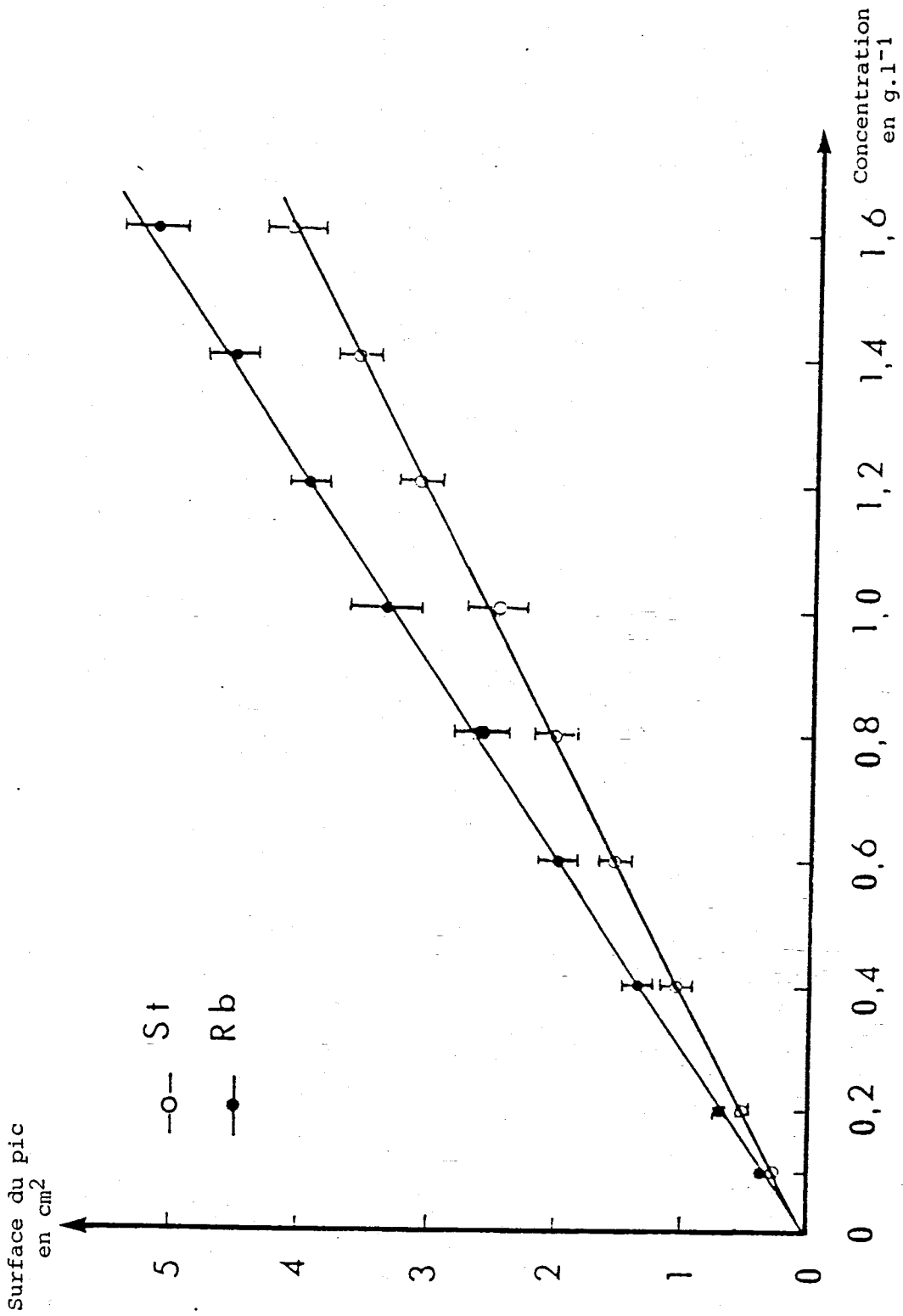


FIGURE 7 : Courbes étalon de stévioloside et rébaudioside pour dosage par C.C.M.



B - CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

1) LE STEVIOSIDE ET LE REBAUDIOSIDE

a - *Le matériel*

Nous avons utilisé un Spectra Physics SP 8700 équipé d'un détecteur SP 8440 et d'un intégrateur SP 4270.

b - *Préparation des échantillons*

Chaque échantillon est préparé dans le système solvant d'injection acétonitrile/eau (90/10 ; v/v) et filtré sur filtre Millipore FHLP de 0,5  $\mu\text{m}$ .

c - *Méthode*

La séparation du stéviolside et du rébaudioside s'effectue sur colonne Amino Spheri 5 (25 cm x 4,6 mm ; Touzart et Matignon). Le programme d'élution est le suivant :

- 1ère phase : système isocratique acétonitrile/eau 90/10 (v/v) pendant 10 minutes ;
- 2ème phase : gradient d'élution acétonitrile/eau de 90/10 à 70/30 (v/v) en 20 minutes ;
- 3ème phase : système isocratique acétonitrile/eau 70/30 (v/v) pendant 20 minutes.

Le débit est de 1 ml min<sup>-1</sup>. La lecture se fait à 200 nm. L'atténuation du détecteur est de 0,16 et celle de l'enregistreur 0,32. L'injection est de 100  $\mu\text{l}$  dans une boucle de 100  $\mu\text{l}$ .

Pour le dosage du stéviolside et du rébaudioside, nous avons réalisé deux gammes étalons (Figure 8 p. 88) à partir de solution mère à 0,2 g.l<sup>-1</sup> dans le système solvant de départ acétonitrile/eau 90/10 (v/v). Après dilution, les échantillons sont filtrés sur membrane filtrante de porosité 0,5  $\mu\text{m}$  puis injectés (100  $\mu\text{l}$ ). Les courbes étalons sont déterminées d'après les surfaces de pics détectés à 200 nm et calculées par l'intégrateur SP 4270 (Tableau XXIX p. 88).

TABLEAU XXIX : Caractéristiques des courbes étalons stéviolside-rébaudioside en HPLC

Concentration de la solution en g.l <sup>-1</sup>	STEVIOSIDE					REBAUDIOSIDE				
	0,01	0,05	0,1	0,15	0,2	0,01	0,05	0,1	0,15	0,2
Quantité injectée en µg	1	5	10	15	20	1	5	10	15	20
Surface du pic en 10 <sup>3</sup>	58,2	290,4	589,4	907,6	1196	40,5	232	471	703	923
Temps de rétention en minute	20,3	20,2	20,3	20,2	20,1	23	23	23,2	23,1	23,1
p. 100 de stéviolside	100	100	100	99,3	99,25	-	-	-	-	-
p. 100 de rébaudioside	-	-	-	0,7	0,75	100	100	100	100	100

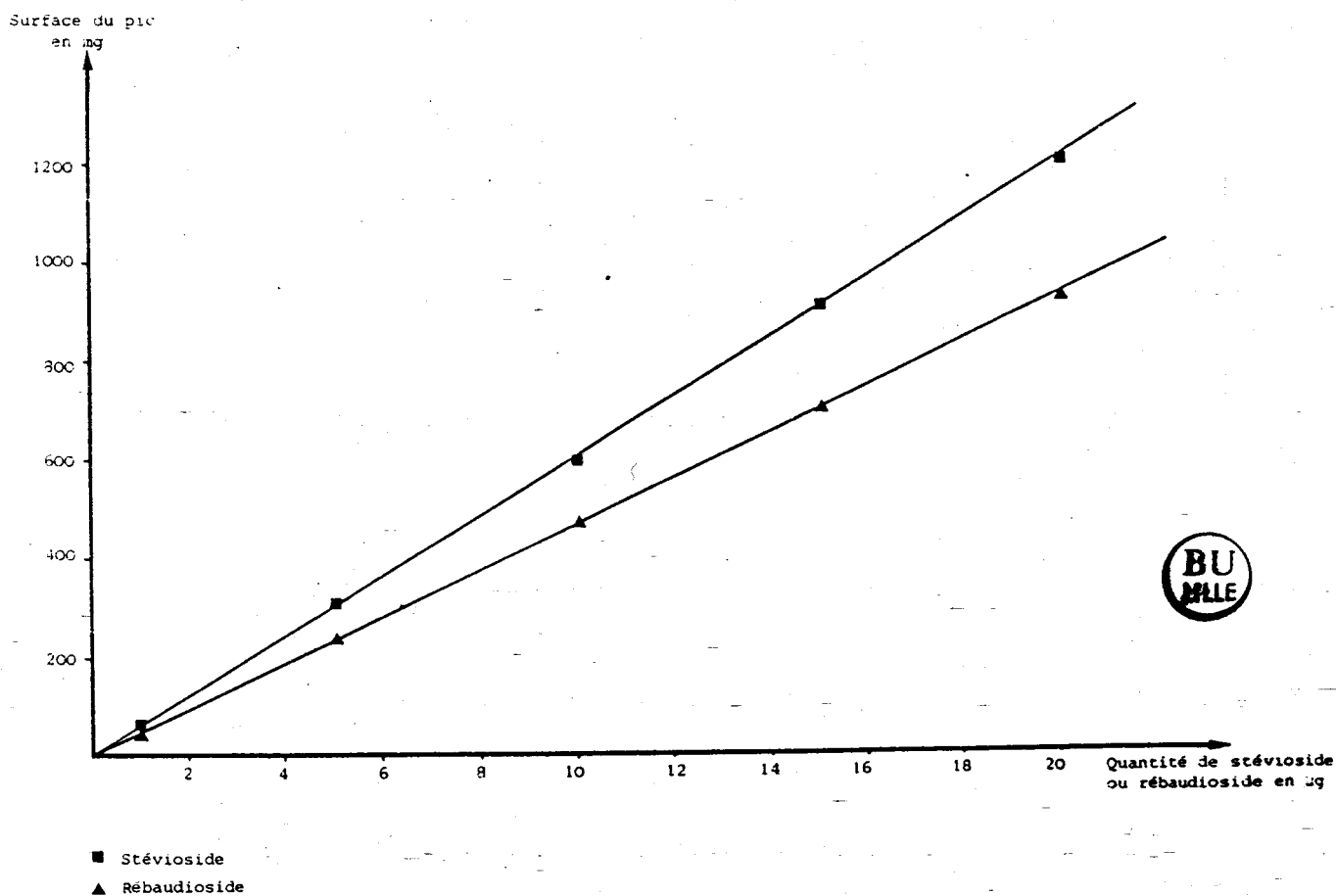


FIGURE 8 : Courbes étalons du stéviolside et du rébaudioside sur colonne type Amino Sphéri 5



## 2) LE STEVIOL ET L'ISOSTEVIOL

### a - Matériel

Nous avons utilisé le même appareillage que précédemment (p. 87).

### b - Préparation des échantillons

Les échantillons à analyser sont préparés dans le système solvant d'injection acétonitrile/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM (60/40 ; v/v) et filtrés sur filtre Millipore 0,5  $\mu\text{m}$ .

### c - Méthodes

La séparation du stéviol et de l'isostéviol se fait sur colonne C18 ALTEX ultrasphère-ODS 5  $\mu\text{m}$  (25 cm x 4,6 mm D.I.). L'élution se fait en système isocratique acétonitrile/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM (60/40 ; v/v). Le débit est de 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  et la lecture se fait à 200 nm. L'atténuation du détecteur est de 0,16 et celle de l'enregistreur 0,32.

Le dosage du stéviol s'effectue à partir d'une gamme étalon (figure 9 p. 90) réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (p. 87) mais à partir de stéviol obtenu suivant la méthode décrite à la page 92. On prépare une solution mère de stéviol à 0,2  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  à partir de 10 mg de produit pur dans 50 ml d'une solution d'acétonitrile/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM (60/40 ; v/v). Après dilution, nous obtenons des solutions de 0,1 ; 0,05 ; 0,025 ; 0,0125 ; 0,00625  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Après filtration sur filtre 0,5  $\mu\text{m}$ , l'échantillon (100  $\mu\text{l}$ ) est injecté sur colonne C18 ALTEX. Comme pour le stévioside et le rébaudioside, la courbe étalon est déterminée d'après les surfaces de pics détectés à 200 nm et calculées par l'intégrateur.

## C - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

### 1) LE STEVIOSIDE ET LE REBAUDIOSIDE : METHODE DE ZANETTA (103)

Cette méthode permet de visualiser et de quantifier le pourcentage de glucose existant dans le produit à analyser.

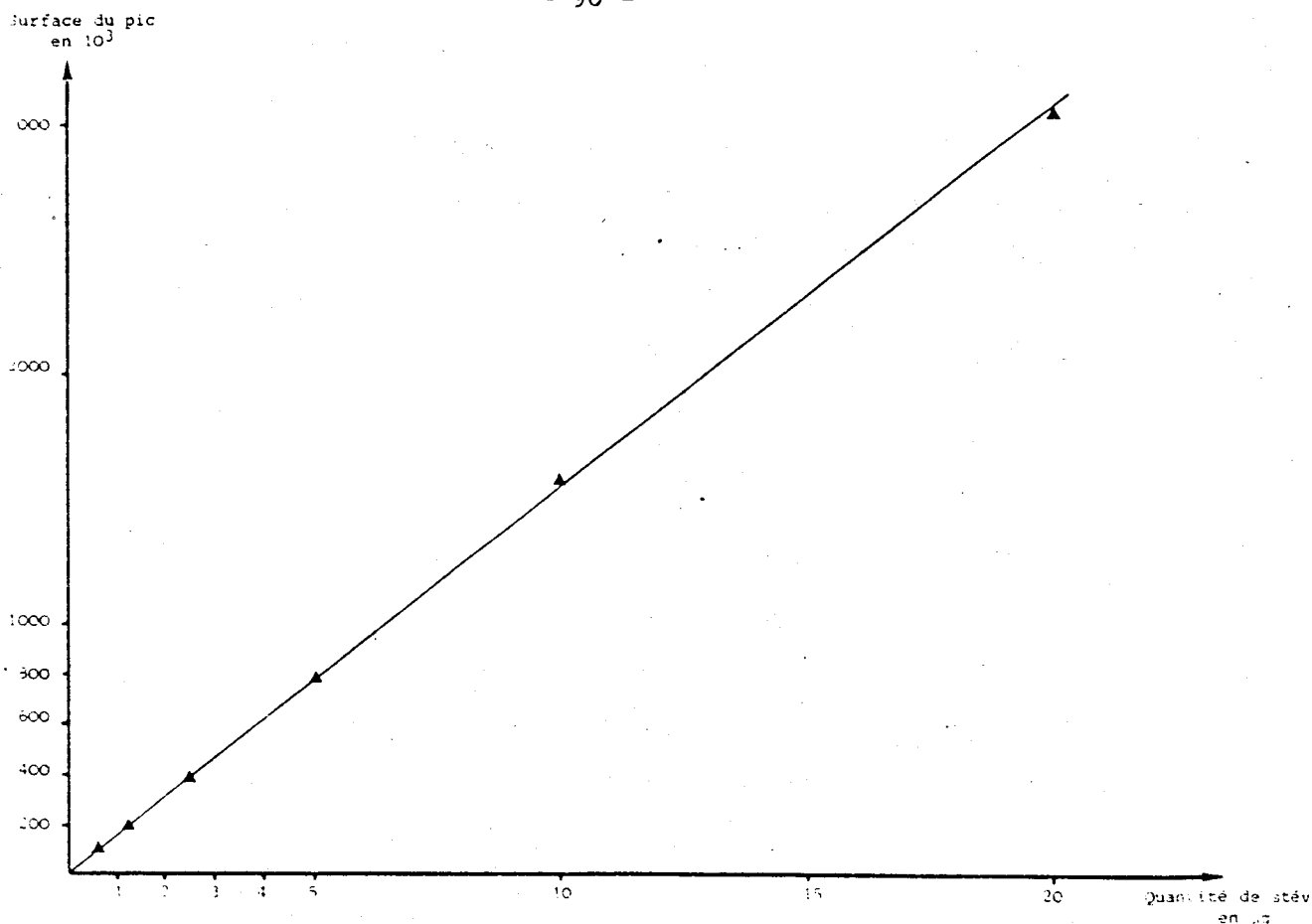


FIGURE 9 : Gamme étalon de stéviol pour dosage H.P.L.C.

TABLEAU XXX : Caractéristiques de la courbe étalon stéviol

Concentration en $\text{g.l}^{-1}$	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625
Quantités injectées en $\mu\text{g}$	20	10	5	2,5	1,25	0,625
Surface du pic en $10^3$	3050	1580	780	386	192	93
Temps de rétention en minute	9,13	9,12	9,15	9,23	9,26	9,31



*a - Matériel et Méthodes*

L'appareil de type Varian 1400 est à ionisation de flamme, le gaz vecteur est l'azote (débit :  $20 \text{ ml.min}^{-1}$ ). La température de détection et d'injection est de  $220^\circ\text{C}$ . Nous avons utilisé une colonne de pyrex (longueur 3 mètres et de diamètre 3 mm) du type OV 210 à 5 p. 100 sur chromosorb W (MP). L'analyse est effectuée par gradient de température entre  $100^\circ\text{C}$  et  $220^\circ\text{C}$  à la vitesse de  $2^\circ\text{C.min}^{-1}$ .

*b - Préparation des échantillons*

La méthanolyse des produits s'effectue à partir de  $80 \mu\text{g}$  de stévioside ou  $50 \mu\text{g}$  de rébaudioside et  $50 \mu\text{g}$  de mésoinositol.

Après extraction à l'heptane (élimination des acides gras) on sèche sous azote puis on ajoute  $100 \mu\text{l}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et  $100 \mu\text{l}$  d'A.T.F.A.

2) LE STEVIOL ET L'ISOSTEVIOL

*a - Matériel et Méthodes*

Nous avons utilisé une colonne capillaire OV 101 ( $30 \text{ m} \times 0,3 \mu$ ) montée sur un Girdel série 300. Le gaz vecteur est l'hélium à une pression de 0,6 bar. L'analyse est effectuée en gradient linéaire de température ( $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ ) de  $180^\circ\text{C}$  à  $240^\circ\text{C}$ . La température de  $240^\circ\text{C}$  est maintenue pendant 30 minutes.

*b - Préparation de l'échantillon*

Le produit à analyser est triméthyl silylé suivant la méthode de KAMERLING (104). Le volume d'échantillon traité est fonction de sa concentration afin d'obtenir environ  $200 \text{ ng}$  par pic. La solution est séchée sous azote et reprise avec  $100 \mu\text{l}$  de pyridine et  $100 \mu\text{l}$  de B.S.T.F.A. Après agitation et une attente de 15 minutes, la solution est prête à être injectée.

### III - HYDROLYSE DU STÉVIOSIDE

#### A - HYDROLYSE CHIMIQUE : L'ISOSTEVIOL

##### 1) REACTIFS

Le stéviocide : produit obtenu par cristallisation suivant notre schéma de purification (cf Résultats p. 132).

Solvants : HCl : Prolabo R.P. Normapur ;  
Chloroforme : Prolabo R.P. Normapur.

##### 2) METHODE

15 mg de stéviocide pur sont dissous dans 10 ml d'HCl 2 M, la solution est ensuite portée à ébullition pendant 20 minutes. Un précipité blanc apparaît. Le précipité est extrait par 10 ml de chloroforme. La phase chloroformique est ensuite lavée plusieurs fois à l'eau et récupérée pour être concentrée à l'évaporateur rotatif Büchi et donner une poudre blanche : l'isostéviol.

#### B - HYDROLYSE ENZYMATIQUE : LE STEVIOL

##### 1) REACTIFS

Le stéviocide : produit obtenu par cristallisation suivant notre schéma de purification.

Enzyme : Cytohélicase d'Hélix pomatia : IBF

Solvant : Chloroforme : Prolabo R.P. Normapur  
eau stérile.

##### 2) METHODE

15 mg de stéviocide sont dissous dans 10 ml d'eau stérile, on ajoute 500 µl de cytohélicase. Après 24 h à 37°C, on observe un précipité blanc. Ce précipité est récupéré puis lavé par un système solvant biphasique eau/chloroforme (1/1 ; v/v). Après plusieurs lavages, la phase chloroformique est concentrée à l'évaporateur rotatif pour obtenir une poudre blanche : le stéviol.

## IV - MÉTABOLISME DU STÉVIOSIDE ET DU RÉBAUDIOSIDE

### A - ACTION DE LA FLORE CAECALE "IN VITRO"

#### 1) MATERIEL

##### a) *Produit*

Stévioside pur préparé selon notre méthode de purification.

##### b) *Matériel biologique*

Caecum de rats nourris normalement.

##### c) *Milieu de culture*

- En milieu aérobie : tampon thyrode avec ou sans glucose

Composition du tampon thyrode :	NaCl	: 8	g
	KCl	: 0,2	g
	CaCl <sub>2</sub>	: 0,2	g
	NaHCO <sub>3</sub>	: 1	g
	MgCl <sub>2</sub>	: 0,1	g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: 0,05	g
	Glucose	: 1	g
	H <sub>2</sub> O	: qsp	l l

- En milieu anaérobie :

Extrait de viande	: 5	g
Extrait de levure	: 5	g
Cystéine	: 1	g
Acidé thioglycolique	: 0,03	g
Tampon phosphate 100 mM pH 7,4	: qsp	l l

#### 2) PROTOCOLE

10 ml de milieu de culture contenant 10 mg de stévioside sont ensemencés avec 4 ml de suspension caecale à 37°C. Pour analyse, des prélèvements de 0,5 ml ont été réalisés aux temps  $t_0$  (avant ensemencement), 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h.

### 3) ANALYSES

L'hydrolyse du stéviolside a été suivie dans le temps par C.C.M. L'extraction, la caractérisation du stéviol par H.P.L.C. ont été réalisées selon les protocoles décrits précédemment (p. 89-92).

#### B - ACTION DE LA FLORE CAECALE "IN VIVO"

##### 1) LE TRAITEMENT

###### a - *Les produits*

Le stéviolside et le rébaudioside testés ont été préparés suivant notre méthode (p. 132). La pureté des produits est vérifiée par H.P.L.C. et tout particulièrement l'absence de stéviol.

Les aliments : UAR référence 113 (rats/souris) stérilisé.  
La boisson : eau pH 3,5 stérilisée.

###### b - *Les animaux*

Les animaux traités sont des souris femelles OF1 IFFA CREDO de 20 g environ au début de l'essai. Statuts bactériens :

- en milieu normal : 40 souris gnotobiotiques
- en milieu stérile : 20 souris axéniques.

###### c - *Méthode*

Les animaux sont maintenus en cage à métabolisme par groupe de 5 pendant toute la durée de l'essai et traités selon le schéma suivant :

Lot n°	SOURIS GNOTOBIOTIQUES		SOURIS AXENIQUES
	Stéviolside	Rébaudioside	Stéviolside
Témoin	0	0	0
1	10 mg/kg/j	10 mg/kg/j	10 mg/kg/j
2	50 mg/kg/j	50 mg/kg/j	50 mg/kg/j
3	250 mg/kg/j	250 mg/kg/j	250 mg/kg/j

Les souris axéniques sont conservées axéniques pendant toute la durée du traitement. Le traitement est effectué chaque jour pendant 4 jours par voie orale à l'aide d'une sonde oesophagienne. La solution destinée au traitement des animaux axéniques est stérilisée préalablement par filtration stérilisante sur filtre Millipore 0,22 µm. Chaque jour, les fécès et les urines de chaque lot sont récupérés séparément, congelés et identifiés.

## 2) ANALYSES

### a - Dosage du stéviol

Extraction à partir des fécès : 1 g de fécès est broyé dans 20 ml d'une solution  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM (60/40 ; v/v). L'extraction s'effectue pendant 10 minutes avec agitation manuelle. Après filtration sur verre fritté G1, le gâteau est conservé pour une nouvelle extraction.

Extraction à partir des urines : A 2 ml d'urine, on ajoute 2 ml de chloroforme. Après agitation, on récupère la phase inférieure qui est plusieurs fois lavée à l'eau. La phase chloroformique est ensuite concentrée à sec pour être reprise par 500 µl d'une solution  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (60/40 ; v/v).

Dosage : après filtration sur filtre 0,5 µm, le filtrat est injecté (100 µl) sur colonne de type RP C18 et dosé suivant la méthode de dosage décrite au § II-B-2 p. 89.

### b - Dosage du stéviolside et du rébaudioside

Extraction à partir des fécès : la totalité des fécès restants sont broyés dans 30 ml d'acétonitrile. Après une extraction de 15 minutes, le broyat est filtré sur verre fritté G1. Le gâteau est ensuite repris dans 10 ml d'une solution  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM (60/40 ; v/v). Après une nouvelle extraction de 10 minutes sous agitation manuelle, l'extrait est filtré sur verre fritté G1 puis centrifugé à 3.000 tours/minute (JOUAN C500) pendant 15 minutes. Le surnageant est dilué au 1/4 dans de l'acétonitrile pour obtenir une solution (90/10 ; v/v).

Dosage : après filtration sur filtre 0,5 µm, on injecte 100 µl de l'échantillon sur colonne Amino Sphéri 5. Le dosage du stéviolside et du rébaudioside s'effectue selon la méthode décrite au § II-B-1 p. 87.

## V - ÉTUDES TOXICOLOGIQUES

Ces travaux ont été réalisés à l'Institut PASTEUR de LILLE par le Professeur MARZIN.

A chaque essai nous avons utilisé des souris de 8 à 10 semaines de souche NMRI origine IFFA CREDO. Les conditions étaient les suivantes : température : 22 °C

hygrométrie : 60 10 p. 100

renouvellement d'air : 10 l/heure

éclairage : 12 heures de lumière

cages : polypropylène, couvercle acier inoxydable 30 x 15 x 12  
cm

litière : sciure de bois dépoussiérée stérilisée

aliment : UAR référence 113 (rat/souris) stérilisé au  
Laboratoire

boisson : eau acidifiée pH 3,5.

### A - TRAITEMENT PAR GAVAGE

Une première étude a été réalisée sur un mélange stéviolside rébaudioside pour étudier les fonctions de reproduction chez la souris. Le protocole a été le suivant : traitement par voie orale des mâles pendant la période de spermatogénèse (60 jours avant l'accouplement : J - 60), des femelles 14 jours avant l'accouplement (J - 14) puis 13 jours après jusqu'au sacrifice (J + 14). Deux lots de 10 souris femelles et deux lots de 5 souris mâles ont été ainsi répartis.

Lot 1 : témoin recevant l'excipient ;

Lot 2 : mélange stéviolside et rébaudioside (70/30) à 50  
mg/kg.

Le traitement quotidien (7 jours sur 7), a été effectué par voie orale par gavage à l'aide d'une sonde oesophagienne sous un volume de 25 ml/kg/jour. Chaque femelle a été accouplée 14 jours après le début du traitement (2 femelles/1 mâle), les mâles ont été remis dans la cage chaque soir pendant 5 jours et séparés chaque matin.



Chaque matin pendant 5 Jours, le bouchon vaginal a été recherché chez toutes les femelles. Quand le bouchon vaginal était positif, la femelle restait isolée. Le jour où le bouchon vaginal a été identifié, a été considéré comme le jour  $J_1$ .

Examens : Les femelles ont été pesées à J-14, J-7, J-0, J+7 et J+14 (ou 17 jours après le premier jour de l'accouplement si aucun bouchon vaginal n'a été identifié). Les femelles ont été sacrifiées, les ovaires et les utérus prélevés et les examens suivants ont été effectués :

- numération des corps jaunes ovariens ;
- nombre de foetus vivants ;
- pesée individuelle des foetus vivants ;
- nombre de foetus morts tardivement ;
- nombre de foetus morts précocement ;
- nombre de résorptions (coloration de Salewesky). Une

comparaison statistique des résultats a été effectuée (test de Student et test U de Mann Whitney).

Suite à ces premiers résultats, une seconde étude a été conduite. Cet essai a porté uniquement sur le stéviolside et seules les femelles ont été traitées à partir du moment de l'accouplement et jusqu'au jour du sacrifice. L'examen des femelles gravides est identique à celui de l'étude précédente. Les différents lots (7 lots) étaient constitués d'un plus grand nombre de femelles (20 femelles par lot) et étaient répartis de la façon suivante :

- Lot 1 : témoin recevant l'excipient ;
- Lot 2 : stéviolside à 6,25 mg/kg/jour ;
- Lot 3 : stéviolside à 12,5 mg/kg/jour ;
- Lot 4 : stéviolside à 25 mg/kg/jour ;
- Lot 5 : stéviolside à 50 mg/kg/jour ;
- Lot 6 : stéviolside à 100 mg/kg/jour ;
- Lot 7 : stéviolside à 200 mg/kg/jour.

Cette étude a été réalisée pour essayer de mettre en évidence une relation dose-effet.

B - PRODUIT AJOUTE A L'EAU DE BOISSON

Pour cette étude, nous avons réutilisé le protocole de la première étude qui consistait à traiter aussi bien les mâles que les femelles. Le mode d'administration du produit a été le suivant : le stéviolside a été ajouté dans l'eau de boisson à la dose de 0,07 ; 0,30 et 1,5 mg/ml en tablant sur une consommation journalière de 5 ml/animal de 30 g soit environ 170 ml/kg. Les concentrations exactes ont été ajustées, d'une part au début de l'essai après une étude préliminaire d'appétence et d'autre part, chaque semaine après détermination de la consommation hebdomadaire du lot. La répartition des 4 lots de 20 souris femelles et 10 souris mâles est la suivante :

Lot 1 : témoin recevant de l'eau de boisson normale ;

Lot 2 : stéviolside à 10 mg/kg/jour, soit une solution à 0,006 p. 100 ;

Lot 3 : stéviolside à 50 mg/kg/jour, soit une solution à 0,03 p. 100 ;

Lot 4 : stéviolside à 250 mg/kg/jour, soit une solution à 0,15 p. 100.

Par ailleurs, des examens histopathologiques ont été effectués sur 4 mâles par lot. Ces travaux ont été réalisés au CERTI Laboratoire d'Histopathologie par le Docteur G. SIOU, Expert pharmacologue-toxicologue. Les testicules ont été prélevés, fixés dans le liquide de Bouin, lavés, conservés dans l'alcool à 70°C.

L'examen histologique des prélèvements a été effectué sur coupes colorées par la méthode trichromique de MASSON au bleu d'aniline. De plus, une réaction au P.A.S. a été pratiquée afin de mettre en évidence les membranes basales.

## RESULTATS

### I - CARACTÉRISTIQUES DE LA MATIÈRE PREMIÈRE

La définition de la matière première est effectuée en fonction de trois paramètres :

- aspect extérieur du lot (proportion de feuilles vertes, feuilles brunes, tiges et autres) ;
- teneur en stéviolside et rébaudioside ;
- existence ou non de stéviol.

#### A - ASPECT EXTERIEUR DU LOT



Les lots de feuilles que nous recevons du Paraguay sont de qualité très disparate. En effet, d'un lot à l'autre la composition peut varier de façon importante. Le tableau XXXI p. 100 représente la composition moyenne des échantillons calculée à partir de cinq lots différents. La coloration brune de certaines feuilles est due soit à l'action des polyphénol oxydases après une mauvaise coupe, soit à la sénescence naturelle.

#### B - TENEUR EN STEVIOSIDE ET REBAUDIOSIDE

Le dosage du stéviolside et du rébaudioside dans les feuilles a pu être réalisé par H.P.L.C. suivant la méthode décrite au § II-B-1 p. 87.

Le tableau XXXII p. 100 compare les résultats obtenus pour un lot moyen et pour des feuilles vertes et brunes après triage. On remarque que les feuilles vertes contiennent plus de stéviolside et de rébaudioside que les feuilles brunes. Cette première constatation nous amène à formuler deux hypothèses :

- le rendement d'extraction en stéviolside et rébaudioside des feuilles brunes est moins bon ;
- le stéviolside et le rébaudioside seraient dégradés soit dans les feuilles brunes au cours du séchage, soit que ces feuilles

TABLEAU XXXI : Composition moyenne des lots de *Stevia Rebaudiana*

	Pourcentage en poids	Variation en p. 100
Feuilles vertes	65	5
Feuilles brunes	25	3
Tiges	7	1
Divers	3	1

TABLEAU XXXII : Teneur en stévioloside et rébaudioside dans les feuilles

	POURCENTAGE *	
	Stévioloside	Rébaudioside
Feuilles vertes triées	11	6,2
Feuilles brunes triées	5,6	3,4
Feuilles non triées	8,6	4,9



\* Pourcentage en masse de produit par rapport à la masse de feuilles sèches  
(en g pour 100 g)

représentent les feuilles basales de la plante avec un métabolisme différent. Cette deuxième hypothèse nous a incité à rechercher l'existence de stéviol dans les feuilles.

#### C - DOSAGE DU STEVIOL

Le dosage du stéviol dans les feuilles est effectué par H.P.L.C. selon la méthode décrite à la page 89. Le chromatogramme de la figure 10 p. 102, nous montre le profil d'un extrait de feuille brune sur colonne RP C18. Le pic correspondant au stéviol a été collecté et injecté de nouveau en présence de témoin stéviol pour donner un pic unique. Enfin une vérification supplémentaire a été effectuée en phase gazeuse sur colonne capillaire après triméthyl silylation (cf § II-C-2 p. 91).

Le tableau XXXIII p. 102 met en évidence l'existence de stéviol dans les feuilles. La comparaison de ces résultats montre une teneur en stéviol très faible dans les feuilles vertes qui devient non négligeable dans les feuilles brunes. Cette différence n'est cependant pas suffisante pour expliquer le déficit en stéviolside et rébaudioside qui existe entre les feuilles vertes et les feuilles brunes (TABLEAU XXXII p. 100). A ce sujet, l'hypothèse d'un métabolisme différent en fonction de la situation des feuilles sur la plante peut être envisagée.

#### D - GRADIENT APICO-BASAL

Un dosage par réflectance (cf § II-A-1 p. 85) nous a permis de mettre en évidence un gradient apico-basal décroissant de stéviolside et rébaudioside dans des plantes cultivées en serre. Les figures 11 et 12 p. 103 nous montrent que les feuilles basales sont pauvres en stéviolside et rébaudioside dans un rapport de 1 à 10 (maximum : 85 mg ; minimum : 9 mg de stéviolside/g de feuilles sèches).

#### E - CONCLUSION

D'après ces différents résultats, nous constatons que la qualité de notre matière première peut être très variable. Elle dépend de trois étapes que nous ne contrôlons pas : la culture, la récolte, la



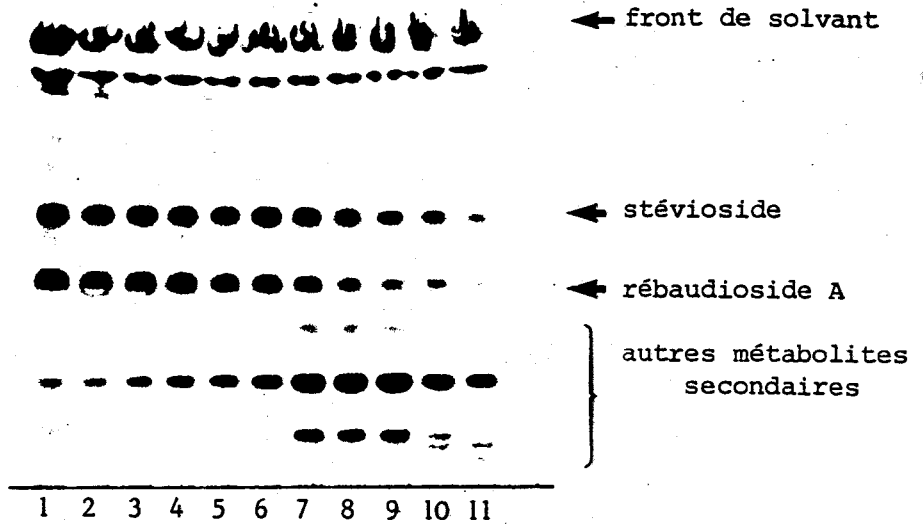


FIGURE 11 : Gradient de stévioloside et rébaudioside dans une même plante

Quantité de stévioloside ou rébaudioside en mg/g de feuilles sèches

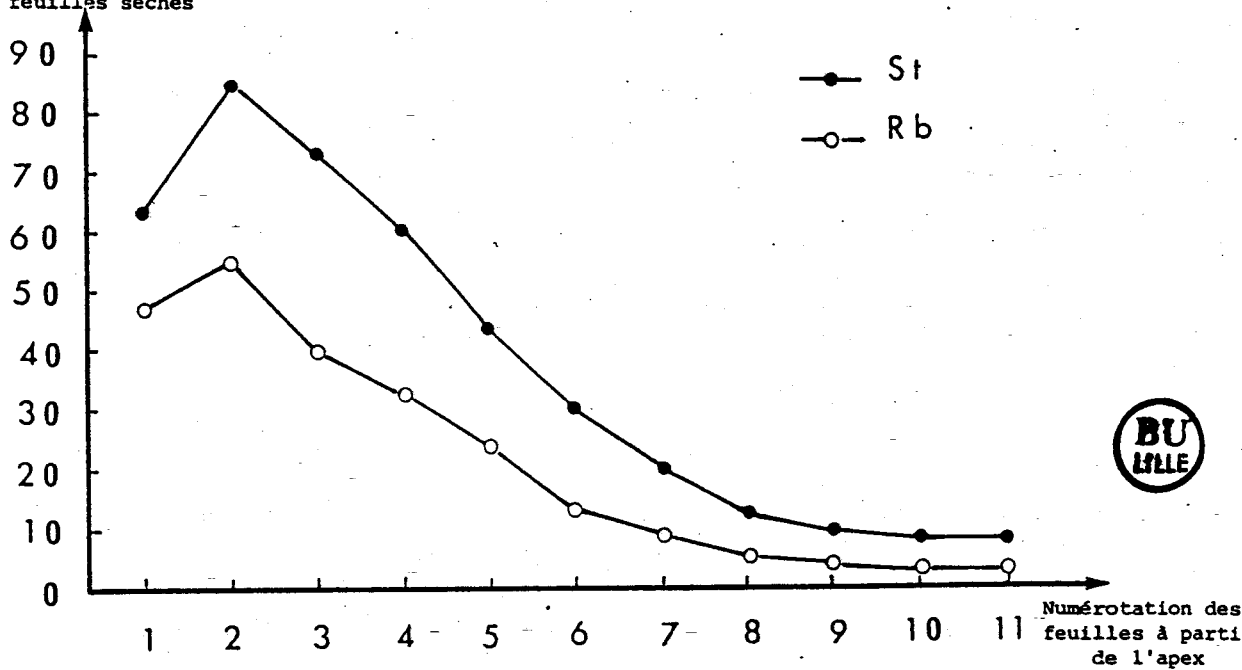


FIGURE 12 : Gradient apicobasal décroissant du stévioloside et du rébaudioside

séchage. Ces étapes, en amont du procédé de purification sont pourtant déterminantes dans l'amélioration des rendements, de la qualité et du prix de revient du produit final. Il est donc nécessaire de définir une qualité de matière première optimale.

Cette qualité standard pourra être améliorée de différentes façons :

- Sélection de clones riches en stévioloside et rébaudioside ;
- vérifier l'existence du gradient apico-basal sur des plantes paraguayennes et suivre dans le temps l'évolution de la teneur en stévioloside et rébaudioside dans les feuilles à différents niveaux de la plante ;
- adapter ces résultats aux conditions de récolte ;
- contrôler le séchage en fonction de la coupe et de la nature des feuilles.

## II - PURIFICATION DU PRODUIT

La qualité des lots de feuilles de *Stevia* en provenance du Paraguay était variable. Il nous a paru indispensable de standardiser le matériel avant d'entreprendre toute expérimentation.

### A - L'EXTRACTION

L'optimisation de cette étape est très délicate car elle dépend de plusieurs paramètres :

- le volume d'extraction ;
- la température ;
- la durée d'extraction.

Les critères de sélection sont de deux ordres :

- la quantité de matière sèche extraite ;
- la quantité de stévioloside et rébaudioside extraite.



Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXXIV et la figure 13 p. 106. Le taux d'extraction augmente en fonction de la température, du volume d'eau utilisé ainsi que du temps. On remarque cependant que l'extraction est optimale lorsqu'on utilise 400 ml d'eau pour 10 g de feuille pendant 1 heure. En effet, la quantité d'extrait sec augmente en fonction de la température et de la durée d'extraction. Cependant, il faut à ce niveau considérer le problème énergétique qui est un élément important dans un coût de production.

Ainsi, une extraction d'une heure est suffisante et permet d'atteindre un plateau représenté à la figure 13 p. 106. Par ailleurs, on remarque que pour une augmentation de température de 20°C (entre 60 et 80°C) le rendement n'est amélioré que de 4 p. 100 tandis qu'il l'est de 35 p. 100 pour un écart de température de 60°C.

Le tableau XXXV p. 107 montre que les teneurs en stéviósíde et rébaudiosíde sont proportionnelles à la quantité de matière sèche obtenue. Chaque extrait donne un chromatogramme identique représenté à la figure 14 p. 108. Enfin, des travaux précédents (LAYOUS, 105) ont démontré qu'un broyage des feuilles n'augmentait pas le rendement d'extraction.

#### CONCLUSIONS ET TRANSPOSITION AU NIVEAU INDUSTRIEL

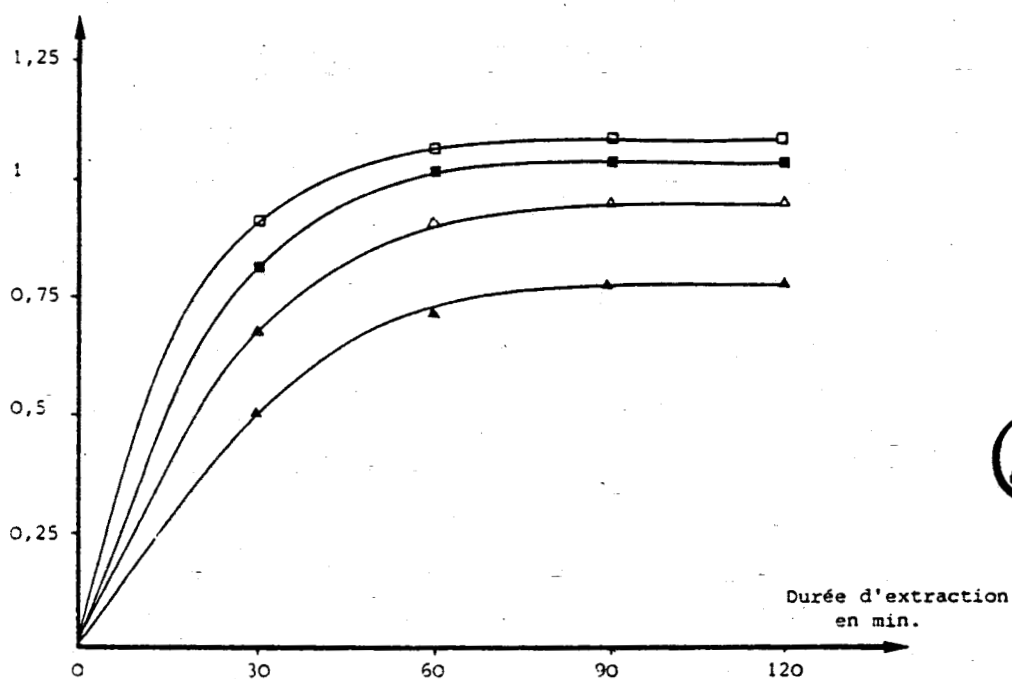
D'après ces résultats et en tenant compte des problèmes énergétiques et des volumes à traiter, nous avons retenu les conditions suivantes : 10 g de feuilles dans 400 ml d'eau à 60°C pendant 1 heure.

Au niveau pilote, nous avons travaillé dans des conditions proches de celles décrites précédemment : soit 1 kg de feuilles pour 40 litres d'eau à une température de 70°C. Le procédé d'extraction utilisé est représenté dans la figure 15 p. 108. Le suivi de l'extraction est assuré par prise d'échantillon toutes les 20 minutes. Le tableau XXXVI p. 109 montre que les résultats obtenus sont identiques à ceux décrits au Laboratoire. La faible différence de rendement entre deux heures et une heure d'extraction ne justifie pas le surcoût énergétique. Enfin, il faut souligner que dans le choix des conditions d'extraction et dans le calcul

TABLEAU XXXVI : Variation du rendement d'extraction en fonction de deux paramètres : température et volume

TEMPERATURE D'EXTRACTION	p. 100 D'EXTRACTION			
	VOLUMES D'EXTRACTION			
	100 ml	200 ml	400 ml	600 ml
20°C	21,2	29,2	32,3	33
40°C	25,2	31	38,8	37,9
60°C	26,8	33,1	42,1	41,9
80°C	28,3	34,3	43,7	43,2

Pourcentage de  
matière sèche



- — □ extraction à 80°C
- — ■ extraction à 60°C
- △ — △ extraction à 40°C
- ▲ — ▲ extraction à 20°C



FIGURE 13 : Evolution dans le temps de la teneur en matière sèche de différents extraits pour 10 g de feuilles dans 400 ml.

TABLEAU XXXV : Dosage du stévioloside et du rébaudioside dans les différents extraits

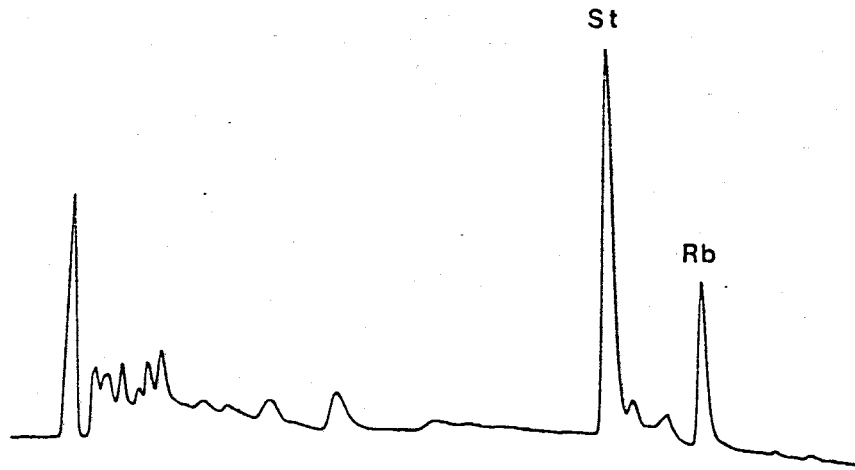
VOLUME D'EXTRACTION	STEVIOSIDE				REBAUDIOSIDE					
	Q	Qt			Q	Qt				
		20°C	40°C	60°C		80°C	20°C	40°C	60°C	80°C
100 ml	9,65 ± 0,55	0,41	0,49	0,52	0,55	4 ± 0,1	0,17	0,2	0,21	0,23
200 ml	9,72 ± 0,13	0,57	0,6	0,64	0,67	4 ± 0,1	0,23	0,25	0,26	0,27
400 ml	9,72 ± 0,65	0,62	0,75	0,81	0,84	4,1 ± 0,15	0,26	0,31	0,34	0,36
600 ml	9,7 ± 0,32	0,64	0,74	0,81	0,84	4 ± 0,1	0,26	0,30	0,34	0,35

Q : quantité moyenne de stévioloside ou rébaudioside dosée (en µg) pour 50 µg d'extrait

Qt : quantité totale (en g) de stévioloside ou rébaudioside extraite à partir de 10 g de feuilles sèches

Conditions : injections de 100 µl-1  
 échantillons : 5 g.l<sup>-1</sup> de matière sèche  
 colonne : amino sphéri 5  
 solvant : gradient CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (90/10 - 70/30 ; v/v)





St : stéviolside  
Rb : rébaudioside A

Conditions : Colonne : Amino Sphéri 5  
Solvant : Gradient CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (90/10 - 70/30 ; v/v)  
débit : 1 ml.min<sup>-1</sup>  
détection : 200 nm

FIGURE 14 : Chromatogramme d'un extrait de *stévia* à 5 g.l<sup>-1</sup> de matière sèche

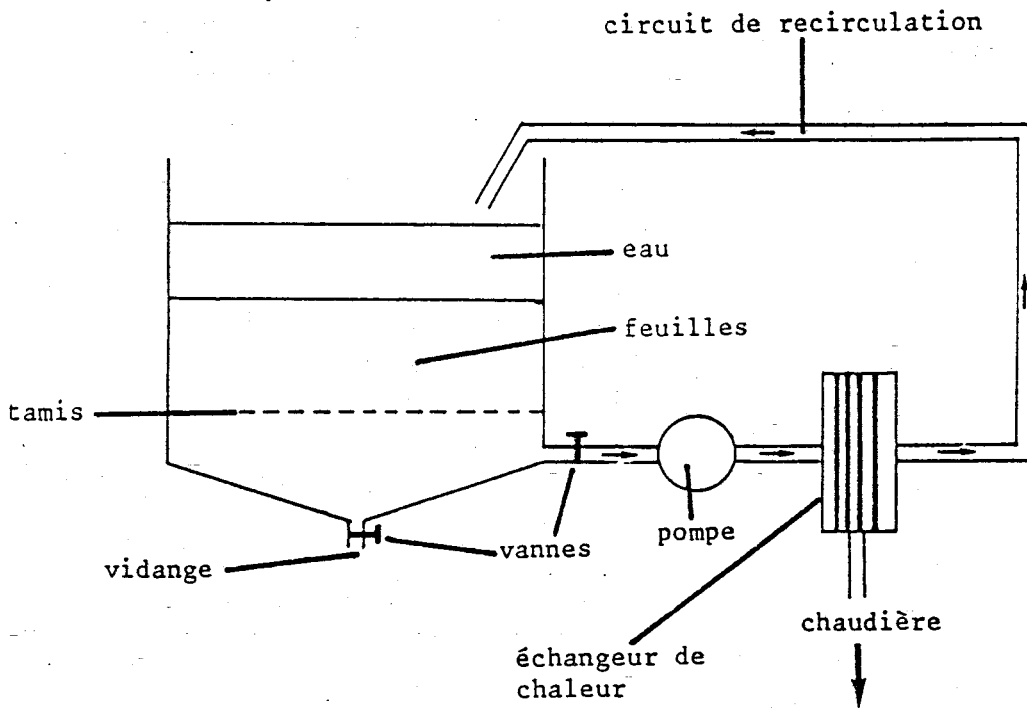


FIGURE 15 : Schéma d'extraction au niveau pilote

TABLEAU XXXVI : Pourcentage de matière sèche en fonction du temps à 70°C :  
1 kg pour 40 litres d'eau

Durée d'extraction en minute	20	40	60	80	100	120
Pourcentage de matière sèche	0,45	0,78	1,17	1,2	1,23	1,25
Volume théorique en litre	37	36,5	36	35,5	35	34,5
Quantité totale de matière sèche en g	166	285	421	426	430	431

TABLEAU XXXVII : Extractions dans les rapports 1 kg de feuilles pour 40 litres d'eau à 70°C pendant 1 heure

	1 kg	2 kg	4 kg
Pourcentage de matière sèche	1,2	1,25	1,2
Volume initial en litre	40	80	160
Volume final en litre	36	69	140
Quantité totale de matière sèche en g	432	860	1260
Rendement p. 100	43,2	43	42



des rendements, nous avons tenu compte de deux facteurs.

- Après extraction et filtration, les feuilles renferment un volume important d'extrait (2,5 litres par kilogramme de feuilles).

- Les pertes d'eau dues à l'évaporation (10 p.100 du volume initial) durant l'extraction sont non négligeables et influencent les teneurs en matière sèche.

Dans ces conditions, nous avons effectué différentes extractions (1 kg, 2 kg et 4 kg) dont les résultats sont rassemblés dans le tableau XXXVII p. 109. Nous pouvons remarquer que l'extraction est une étape que nous pouvons extrapoler très facilement.

En conclusion, l'extraction s'effectuera de la manière suivante. 40 litres d'eau à 70°C par kilogramme de feuille pendant 1 heure avec agitation (eau et feuilles) et recirculation du jus d'extraction.

#### B - PREFILTRATION ET CENTRIFUGATION

L'étape d'ultrafiltration nécessite l'élimination de toutes les matières en suspension de l'extrait brut. Cette action peut se réaliser soit par utilisation de filtre-presse, soit par centrifugation.

La filtration est effectuée sur plaque filtrante (seuil de coupure 5  $\mu$ m). Le colmatage est atteint rapidement, il est nécessaire de travailler sous pression. Cette étape élimine entre 4 et 6 p. 100 de matière sèche.

La centrifugation dans une centrifugeuse de type laboratoire permet d'éliminer de 8 à 10 p. 100 de matière sèche. Le culot de centrifugation ne renferme pas d'édulcorant.

Au niveau pilote, nous avons uniquement utilisé la filtration sur plaque filtrante. Un rendement de purification moindre, associé à un colmatage des filtres, suggère au niveau pilote l'utilisation de la centrifugation en continu. Le choix du matériel et l'optimisation de cette étape reste à faire.

## C - L'ULTRAFILTRATION

Cette étape s'est révélée déterminante dans la poursuite du procédé de purification car elle permet d'obtenir par la suite une meilleure séparation et une meilleure décoloration. Nous avons effectué dans un premier temps une approche au niveau laboratoire suivi d'essais au niveau pilote, avec des modules plus performants et mieux adaptés à nos problèmes.

Il est à souligner que dans ces différents essais, nous avons recherché la faisabilité industrielle au niveau du matériel et non pas l'optimisation de cette étape qui devrait faire l'objet d'une étude particulière. En effet, une telle optimisation dépend de nombreux paramètres. Tout d'abord, le choix du matériel détermine le type d'ultra-filtration mais également la nature des membranes (cf Matériel et Méthodes, § I-C, p. 83). Le matériel choisi doit permettre un débit d'ultra-filtrat maximum pour un seuil de coupure donné. Enfin, le facteur limitant de cette optimisation est principalement la couche de polarisation qui dépend de la concentration des macromolécules dans l'extrait, de la diffusion, de la viscosité, de la température et du système utilisé.

### 1) AU NIVEAU LABORATOIRE

Dans ces essais, nous n'avons uniquement utilisé que la cellule AMICON UF 8400 avec des membranes PM 10. En effet, les différents essais effectués sur module DC<sub>2</sub> à fibres creuses (seuil de coupure : 10 000 et 3 000 D) n'ont donné aucun résultat satisfaisant. Nous avons, en effet, observé un très faible débit de perméat ainsi qu'une moins bonne sélectivité. La nature même des fibres creuses doit être en partie responsable de ces problèmes.

Dans cette étude, l'efficacité du système sera définie en fonction du débit de perméat et de sa couleur.

Les essais effectués à partir d'un extrait standard ont mis en évidence l'importance de l'étape de filtration ou de centrifugation. En effet, dans le cas d'un extrait centrifugé on constate une chute de débit moins rapide que dans le cas d'un extrait brut. On passe respectivement de 120 ml.h<sup>-1</sup> à 25 ml.h<sup>-1</sup> en 7 heures et de 120 ml.h<sup>-1</sup> à 10 ml.h<sup>-1</sup> en 3

heures. Dans tous les cas, l'ultrafiltrat est de couleur brun orangé tandis que le rétentat est de couleur noire. Par chromatographie sur couche mince, on remarque dans le rétentat une forte concentration en stéviolside et rébaudioside. Un lavage en continu du rétentat par ultrafiltration à volume constant ne permet pas d'épuiser la totalité du stéviolside et du rébaudioside restant. Suite à ces résultats, on peut tout d'abord émettre l'hypothèse que certaines molécules de stéviolside et rébaudioside restent adsorbées sur une macromolécule de poids moléculaire supérieur à 10 000 D.

Enfin, le tableau XXXVIII p. 113 montre l'influence de cette étape sur le rendement en matière sèche qui est supérieur dans le cas d'une ultrafiltration après centrifugation.

## 2) AU NIVEAU INDUSTRIEL

Comme nous l'avons déjà dit le facteur limitant de cette étape est le débit de perméat. Pour pallier ce problème, nous avons utilisé des modules d'ultrafiltration qui utilisent un balayage tangentielle à grande vitesse et permet ainsi de diminuer le phénomène de polarisation observé au niveau laboratoire. Aussi bien dans le cas des modules SFEC que MILLIPORE, l'optimisation de cette étape n'a pu être effectuée. Elle nécessite un grand nombre d'essais avec des volumes importants. Les principaux paramètres sont :

- la température
- la pression moyenne transmembranaire
- la vitesse de circulation
- la concentration du produit

De plus, ces paramètres varient en fonction du temps. Les résultats obtenus sont les suivants.

### a - Sur module SFEC

Deux types de membranes ont été utilisées

- PM 4, seuil de coupure : 20 - 40 000 D
- PM 5, seuil de coupure : 10 - 20 000 D



TABLEAU XXXVIII : Différents essais d'ultrafiltration sur  
membrane Amicon PM 10

	EXTRAITS BRUTS	EXTRAITS PREFILTRES	EXTRAITS CENTRIFUGES
Pourcentage de matière sèche initiale	1,17	1,10	1,08
Pourcentage de matière sèche de l'ultrafiltrat	0,84	0,85	0,88
Pourcentage de matière sèche du rétentat	7,4	5,8	5,3
Rendement en matière sèche en p. 100	68	73	77



Deux types de modules

- 1 S 1 : 1 membrane : volume mort 1,7 l
- 1 S 7 : 7 membranes : volume mort 4 l.

Avant tout essai, il est indispensable de déterminer le débit en eau (D.E.) de chaque membrane et de chaque module (Tableau XXXIX p. 115). Ces données permettent de vérifier l'efficacité des cycles de nettoyage et la propreté des membranes. Le débit en eau est exprimé en  $l.h^{-1}m^{-2}$  sous une pression de 4 bars à 25°C. Les mesures peuvent être effectuées en fonction de différents paramètres : pression, température... Les débits sont alors corrigés aux unités de référence suivant le mode de calcul ci-après :

$$D.E. = \frac{D \times 4 \times Kt}{P \times S}$$

D : débit mesuré en  $l.h^{-1}$

Kt : coefficient de température

P : pression moyenne mesurée en bars

S : surface membranaire utilisée en  $m^2$ .

Dans nos différents essais, nous avons contrôlé le débit du perméat ainsi que les performances des membranes sur le plan sélectivité. D'après la figure 16 p. 116, nous remarquons que les débits de perméat varient en fonction du type de membrane, de la température et de la durée d'ultrafiltration (la pression transmembranaire, paramètre important, est restée stable). On remarque tout d'abord, une augmentation de la température du rétentat en fonction du temps. Cette élévation de température est essentiellement due à la recirculation du rétentat dans le module qui provoque un échauffement mécanique.

Ainsi, dans le cas de la membrane PM 4, le débit de perméat augmente avec la température tandis qu'il chute rapidement dans les essais de membrane PM 5. Par ailleurs, sur membrane PM 4, la coloration de l'ultrafiltrat évolue et devient plus foncée dans le temps. Sur membrane P l'ultrafiltrat a une coloration qui ne varie pas. Enfin, la figure 16 p. 116 nous montre également que le pourcentage de matière sèche durant

TABLEAU XXXIX : Débit en eau des membranes PM 4 et PM 5 sur module 1 S 1 et 1 S 7

Membrane PM 4 sur module 1 S 1

	$\theta^{\circ}\text{C}$	Kt	D $\text{l.h}^{-1}$	P bars	S $\text{m}^2$	D.E. $\text{l.h}^{-1}\text{m}^{-2}$
1er essai	18	1,184	2,8	3,1	0,022	194
2ème essai	19	1,153	3,6	3,5	0,022	215
3ème essai	22	1,073	4,1	3,8	0,022	210

Membrane PM 5 sur module 1 S 1

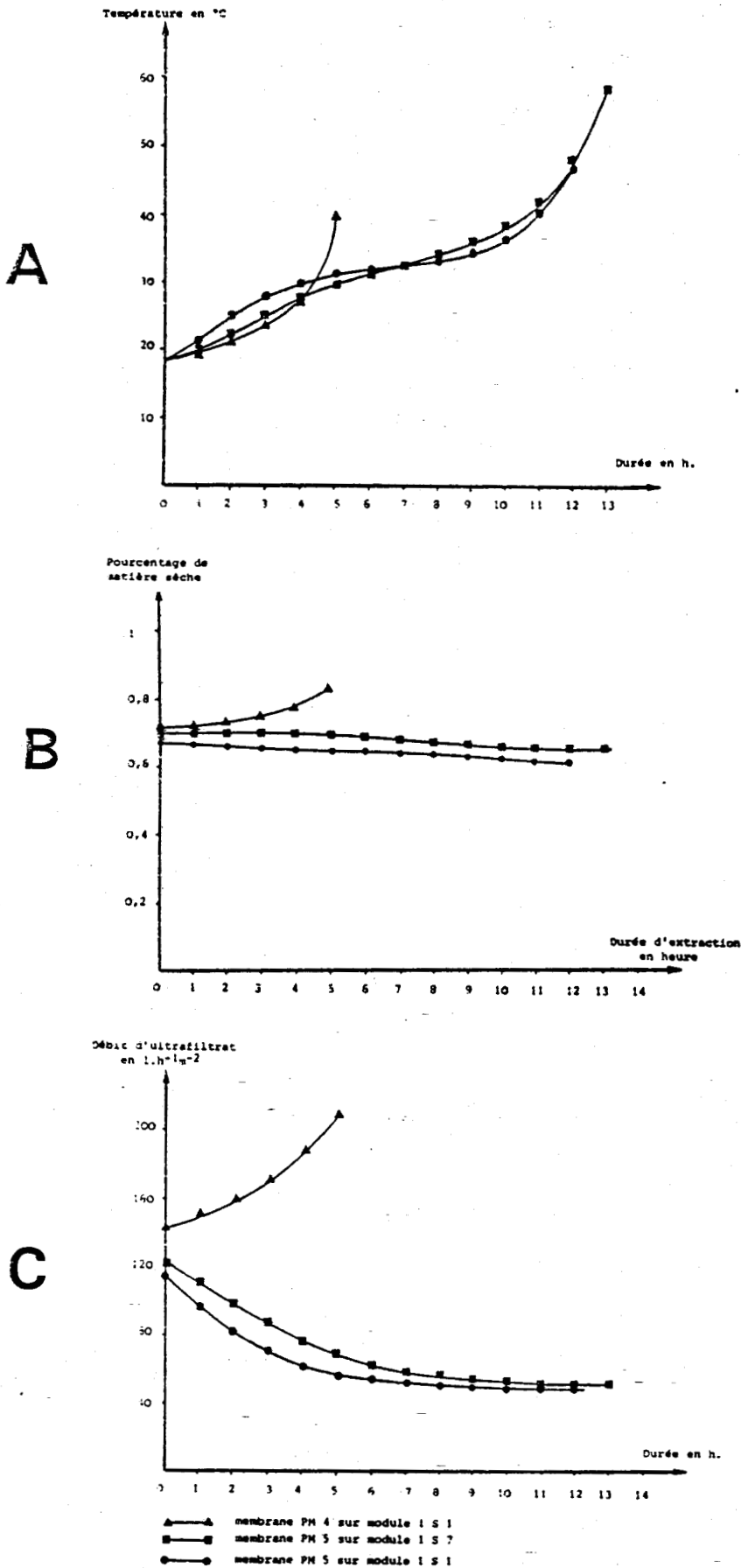
	$\theta^{\circ}\text{C}$	Kt	D $\text{l.h}^{-1}$	P bars	S $\text{m}^2$	D.E. $\text{l.h}^{-1}\text{m}^{-2}$
1er essai	20	1,127	1,7	2,4	0,022	145
2ème essai	18	1,184	1,3	2	0,022	140
3ème essai	20	1,127	2,2	3	0,022	150

Membrane PM 5 sur module 1 S 7

	$\theta^{\circ}\text{C}$	Kt	D $\text{l.h}^{-1}$	P bars	S $\text{m}^2$	D.E. $\text{l.h}^{-1}\text{m}^{-2}$
1er essai	18	1,184	30	5,35	0,154	170
2ème essai	18	1,184	24	4,35	0,154	170

$\theta$  : température de l'essai en  $^{\circ}\text{C}$   
 Kt : coefficient de température  
 D : débit mesuré en  $\text{l.h}^{-1}$   
 P : pression moyenne mesurée  
 S : surface membranaire utilisée en  $\text{m}^2$   
 D.E. : débit en eau en  $\text{l.h}^{-1}\text{m}^{-2}$





A : Evolution de la température du rétentat  
 B : Pourcentage de matière sèche de l'ultrafiltrat  
 C : Variation du débit d'ultrafiltrat

FIGURE 16 : Influence du type de membrane et du temps sur l'étape d'ultrafiltration

l'ultrafiltration augmente sensiblement dans les essais sur membranes PM 4 mais par contre diminue légèrement sur PM 5.

Ces différents résultats, fonction du seuil de coupure des membranes, mettent en évidence le rôle important joué par certaines macromolécules. Ces molécules sont certainement responsables d'une part, de la couche de polarisation en ce qui concerne les membranes PM 5 et, d'autre part, de l'encrassage des membranes PM 4. Aussi, une augmentation de température change leur conformation ce qui a pour conséquence :

- l'encrassage en profondeur des membranes PM 5 qui entraîne une chute de débit du perméat ;
- le passage de ces macromolécules à travers la membrane PM 4 entraînant une augmentation de matière sèche dans l'ultrafiltrat.

Suite à ces premiers résultats et afin d'augmenter le débit d'ultrafiltrat, nous avons utilisé le module 1 S 7 avec 7 membranes PM 5. Nous obtenons des résultats similaires aux premiers essais (figures 16 p. 116). Le tableau XL p. 118 nous permet de comparer les rendements d'ultrafiltration en fonction des types de membranes et du module utilisé. On observe ainsi que la durée de l'étape (fonction du débit) n'est pas directement proportionnelle à la surface de membrane utilisée (PM 5).

D'après ces résultats, notre facteur limitant est comme prévu le débit d'ultrafiltrat. Différentes possibilités s'offrent à nous :

- D'abord, déterminer les différents paramètres permettant un meilleur rendement et en particulier l'influence de la température sur le débit de perméat. Une régulation de la température pourrait avoir un effet favorable sur l'encrassage des membranes.
- Enfin, déterminer la surface membranaire nécessaire pour obtenir un débit convenable en fonction des volumes à traiter.

TABLEAU XL : Rendement d'ultrafiltration en fonction de différentes membranes et différents modules

	1 S 1 PM 4	1 S 1 PM 5	1 S 7 PM 5
Volume traité en litres	20	20	100
Volume d'ultrafiltrat	18,5	18,5	93
Volume de rétentat	1,5	1,5	7
Quantité de MS de départ	210 g	210 g	1 100 g
Quantité de MS de l'ultrafiltrat	140 g	120 g	650 g
Quantité de MS du rétentat	70 g	90 g	450 g
Rendement UF	66 p. 100	57 p. 100	59 p. 100
Durée (en h)	5	12	13



### 5 - Ultrafiltration sur module MILLIPORE

Dans ces essais, nous avons utilisé deux types de membranes (cf § I-C p. 83) : - les membranes PTGC : seuil de coupure 10 000 D  
- les membranes PCAC : seuil de coupure 1 000 D.

Dans des conditions identiques (pression et température), les débits en eau mesurés (Tableau XLI p. 120) sont plus faibles avec les membranes MILLIPORE qu'avec les membranes SFEC. Par contre, pour une surface supérieure ( $0,46 \text{ m}^2$  contre  $0,154 \text{ m}^2$ ), le volume mort du système à cassette MILLIPORE est plus faible (0,4 l contre 4 l).

Enfin, dans des essais de courte durée (Tableaux XLII p. 120 et XLIII p. 121) nous n'avons pas observé de forte augmentation de température, ni de véritable chute de débit. Le tableau XLIV p. 121 montre que les membranes PTGC sont plus sélectives que les membranes PM 5. Elles permettent une meilleure décoloration de l'ultrafiltrat pour une teneur en matière sèche de 0,58 p. 100.

L'importance des volumes à traiter après ultrafiltration nous a incité à étudier l'intérêt d'une étape de concentration. Si nous avons immédiatement éliminé les divers procédés d'évaporation d'un coût trop élevé, nous nous sommes intéressés à l'osmose inverse.

Ainsi, l'utilisation de cassette PCAC (seuil de coupure : 1000 D) sur module MILLIPORE nous a permis de faire des essais de concentration de l'ultrafiltrat (Tableau XLIV p. 121). A pression constante (4,8 bars) le débit chute lentement (de  $6 \text{ l.h}^{-1}$  à  $5 \text{ l.h}^{-1}$  en deux heures). Même après un facteur de concentration de 10, l'ultrafiltrat reste incolore et ne contient ni stéviolside, ni rébaudioside. Le rétentat est de coloration rouge orangé. Le faible débit ( $6 \text{ l.h}^{-1} \text{ m}^2$ ) dû essentiellement à la faible pression (4,8 bars), en limite les possibilités industrielles. En effet, le faible seuil de coupure montre que nous sommes à la limite de l'osmose inverse qui nécessite normalement de travailler sous hautes pressions (20 - 100 bars).

TABLEAU XLI : Débit en eau sur module MILLIPORE

Membrane de type	P en bars	$\theta$ °C	Qp $l.h^{-1}$	Qp $l.h^{-1} m^{-2}$
PTGC	3,2	16	23	49,5
	4,1	17	29	62
PCAC	2,3	15	6	6,5
	4,6	16,5	15	16,2

TABLEAU XLII : Extrait brut centrifugé ultrafiltré sur PTGC

Temps min.	$\theta$ °C	P en bars	Qp $l.h$	Volume d'UF cumulé en l.	Qp $l.h m$
0	15	4,5	12	0	25,8
15	16	4,5	11,5	3	24,7
30	18	4,5	11	5,9	23,7
45	21	4,5	11	8,9	23,7
50	22	4,5	11	9,6	23,7

$\theta$  : température en °C

P : pression moyenne en bars

Qp : débit mesuré en  $l.h^{-1}$  ou en  $l.h^{-1} m^{-2}$





TABLEAU XLIII : 20 litres d'ultrafiltrat SFEC PM 5 sur cassette PTGC MILLIPORE

Temps min.	$\theta^{\circ}\text{C}$	P en bars	$Q_p$ $1.\text{h}^{-1}$	$Q_p$ $1.\text{h}^{-1} \text{m}^{-2}$	Volume d'UF cumulé en l.
0	20	4,5	21	45,2	0
15	20	4,5	21	45,2	5,2
30	20	4,5	21	45,2	10,5
45	20	4,5	21	45,2	15,5
55	20	4,5	21	45,2	19

TABLEAU XLIV : Teneur en matière sèche des différents ultrafiltrats et rétentats

	Extrait brut centrifugé sur PTGC	UF SFEC PM 5 sur PTGC	UF SFEC PM 5 sur PCAC
Volume traité en litre	10	20	10
Volume d'ultrafiltrat	9,5	19	9
Volume de rétentat	0,5	1	1
Quantité de MS de départ	100 g	120 g	60 g
Quantité de MS de l'UF	55 g	108 g	0
Quantité de MS de rétentat	45 g	12 g	60 g
Rendement	55 p. 100	90 p. 100	100 p. 100
Durée (en h)	1	1	2

Cette technique utilisée en biotechnologie (purification et dessalage de l'eau), en industries agro-alimentaires (laiteries) et en industries pharmaceutiques fait l'objet de nombreuses recherches (Rhône-Poulenc, DDS, Sartorius, Millipore, etc...). D'autres essais permettront de choisir le matériel approprié et ainsi de déterminer le coût de cette étape de concentration.

### 3) CONCLUSIONS

Les différents essais effectués montrent que la durée de cette étape sera un facteur limitant dans le procédé de purification. Il est donc important de sélectionner le matériel offrant des possibilités d'extension industrielle avec un bon rendement d'ultrafiltration. Le matériel MILLIPORE donne d'excellents résultats au niveau pilote, mais ne peut répondre aux exigences industrielles. Le potentiel de surface est trop faible par rapport aux volumes à traiter.

D'après nos essais, le matériel SFEC serait plus approprié. Bien que diminuant fortement le débit de perméat, le choix des membranes PM (seuil de coupure 10 - 20 000 D) est nécessaire pour obtenir de bons résultats dans l'étape suivante ( cf § II-D-1 p. 129). En effet, cette membrane élimine certaines macromolécules responsables en partie de la coloration brune de l'extrait brut. Par ailleurs, étant donné son faible rendement cette étape doit être étudiée pour une utilisation en continu. L'influence de la durée d'ultrafiltration sur les possibilités de colmatage des membranes est donc un élément important en relation directe avec le débit de perméat et les cycles de lavage.

De même, l'étape de concentration par osmose inverse ne pourra être retenue que si son coût est inférieur aux gains engendrés par la réduction de volume d'ultrafiltrat influençant la durée de l'étape sur résine (cf. § II-D-1 p. 131).

Enfin, après un choix définitif du matériel d'ultrafiltration ou d'osmose inverse, il restera à optimiser ces étapes en étudiant les paramètres suivants :

- le rapport volume à traiter/surface de membrane

- la température d'ultrafiltration
- la pression moyenne transmembranaire
- la concentration du produit
- l'influence de la durée d'ultrafiltration.

#### D - DECOLORATION ET PURIFICATION SUR RESINE

Il faut tout d'abord rappeler que ce sont les résultats de cette étape qui ont conditionné notre choix dans la détermination du seuil de coupure des membranes d'ultrafiltration. En effet, comme le montre la figure 17 p. 124, nous obtenons une bonne séparation uniquement lorsque l'échantillon a été ultrafiltré sur membrane PM 5. De plus, la phase de décoloration de l'échantillon, normalement amorcée par l'étape d'ultrafiltration, ne s'effectue pas entièrement sur résine si l'on injecte un extrait brut ou un ultrafiltrat de PM 4. Ces résultats renforcent l'hypothèse de l'existence de macromolécules colorées qui adsorbent et entraîneraient le stéviolside et le rébaudioside.

Suite à ces premiers résultats, notre étude s'est effectuée sur un ultrafiltrat après passage sur membrane PM 5. Nous avons ensuite déterminé les conditions optimales de purification sur résine (injection et décrochage) afin d'obtenir le meilleur rendement en une seule étape.

Dans un premier temps, pour un débit de  $50 \text{ ml.h}^{-1}$  sur colonne de  $14 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ , nous avons déterminé le volume ainsi que la concentration en matière sèche optimale de l'extrait injecté. Dans cette première étude, nos critères de sélection sont la qualité de la séparation et le rendement en matière sèche. La séparation sur résine IRA 94 S se schématise dans le temps de la façon suivante :

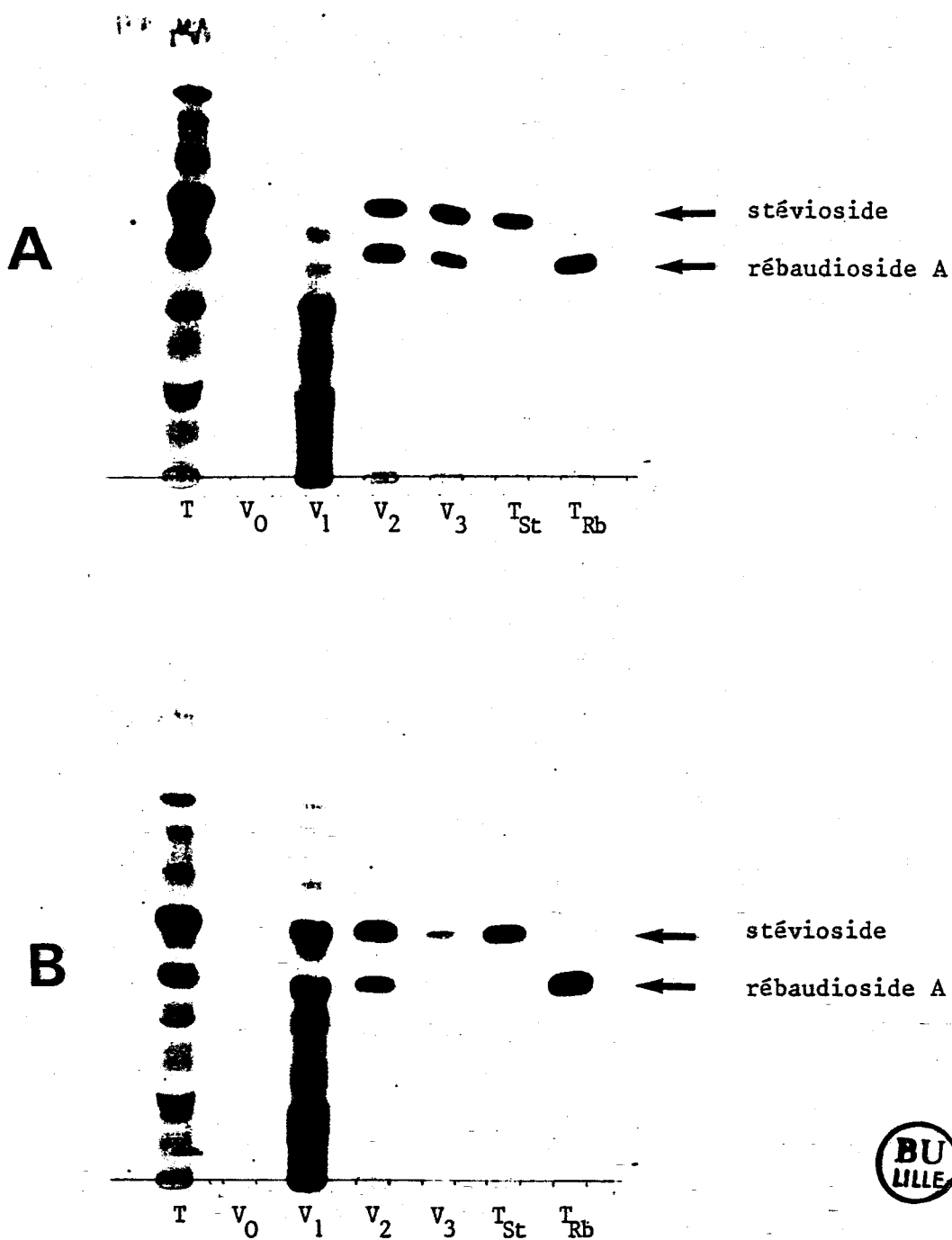


$V_0$  : volume d'exclusion : 30 ml

$V_1$  : zone à métabolites secondaires

$V_2$  : zone à forte concentration en stéviolside et rébaudioside

$V_3$  : zone à faible concentration en stéviolside et rébaudioside



**A** : Injection d'un extrait ultrafiltré sur membrane PM 5

**B** : Injection d'un extrait brut ou ultrafiltré sur membrane PM 4

FIGURE 17 : C.C.M. des différentes fractions en sortie de résine

Amberlite IRA 94 S

T : témoin d'injection

T<sub>St</sub> : témoin stéviolside

T<sub>Rb</sub> : témoin rébaudioside

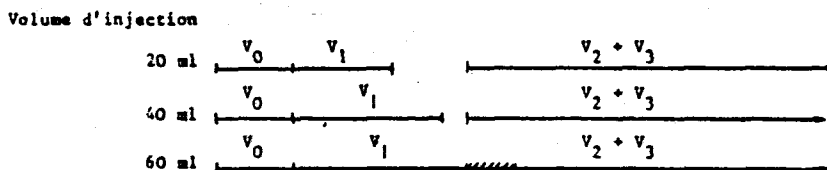
Les volumes  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$  sont fonction de l'échantillon injecté. Les résultats des différents essais rassemblés dans les schémas 1, 2, 3 de la figure 18 p. 126 nous ont incités à sélectionner une injection de 20 ml soit 50 p. 100 du volume de la colonne à une concentration de 5 p. 100 en matière sèche. Pour cela, nous avons travaillé par approches successives en déterminant le volume d'injection optimal à une concentration donnée (schéma 1 ; figure 18 p. 126) puis pour un volume de 40 ml (résultat des premiers essais) la concentration optimale de l'échantillon (schéma 2 ; figure 18 p. 126). Suite à ces premiers résultats, nous avons retenu une concentration de 5 p. 100 et avons fait de nouveau varier le volume d'injection (schéma 3 ; figure 18 p. 126). Il est en effet préférable d'injecter un échantillon à forte concentration dans un faible volume qui permet une meilleure séparation et un meilleur rendement.

Cependant, ces conditions nécessitent une concentration (x 7) de l'ultrafiltrat de départ (0,7 p. 100 de matière sèche) pour atteindre une teneur de 5 p. 100. Comme nous l'avons vu précédemment, ce résultat peut être obtenu par ultrafiltration sur cassette PCAC MILLIPORE. Dans un second temps et à partir de ces résultats, nous avons déterminé les meilleures conditions permettant d'accélérer le décrochage du stévioside et du rébaudioside après la phase de séparation  $V_0 + V_1$ . En effet, le facteur limitant de cette étape est une fois de plus la durée de séparation. Nous avons donc tenté d'accélérer la phase de décrochage et plus particulièrement la phase  $V_3$  en augmentant l'hydrophobicité du solvant d'élution.

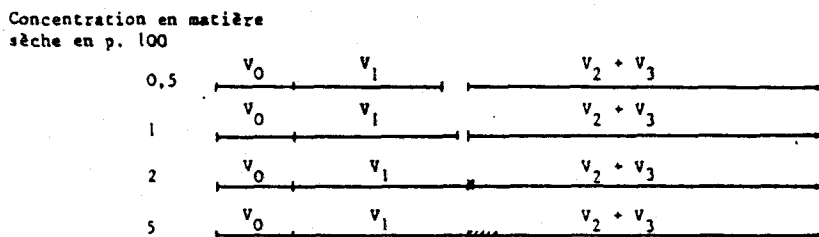
Nous avons utilisé des solutions aqueuses de méthanol à 10, 20 et 40 p. 100 (schéma 4 ; figure 18 p. 126) qui permettent de réduire de 10 à 50 p. 100 le temps de décrochage. On note cependant qu'avec un solvant à 40 p. 100 en méthanol, les éluats sont colorés. Nous avons donc retenu le système eau/méthanol à 20 p. 100. De plus une augmentation de débit (passage de 50 à 150 ml.h<sup>-1</sup>) à partir de la zone  $V_2$  permet de diminuer de 20 p. 100 la durée de cette étape soit un gain total de 40 p. 100.

Au niveau laboratoire, les conditions retenues sont donc les suivantes :

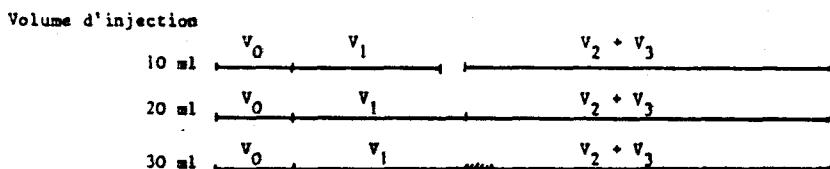
SCHEMA 1 : Volume d'injection optimal à une concentration de 0,5 p. 100



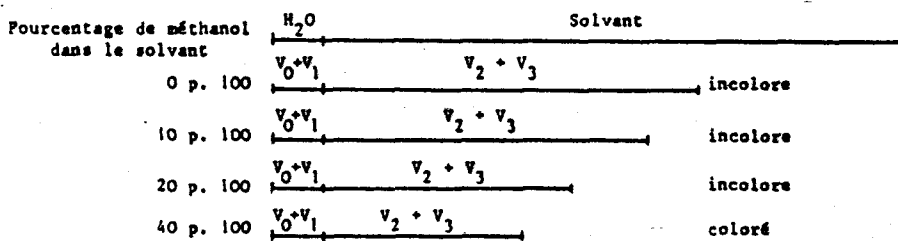
SCHEMA 2 : Concentration optimale de l'échantillon pour une injection de 40 ml



SCHEMA 3 : Volume d'injection optimal pour une concentration de 5 p. 100



SCHEMA 4 : Influence du méthanol sur le décrochage des fractions  $v_2 + v_3$



— 20 ml : échelle (schémas 1, 2, 3)

— 100 ml : échelle (schéma 4)

$v_0$  : volume d'exclusion

$v_1$  : fraction contenant d'autres métabolites secondaires

$v_2 + v_3$  : fraction contenant le stéviolside et le rébaudioside

▨ : zone de recouvrement due à une mauvaise séparation



FIGURE 18 : Optimisation de l'étape de séparation et de décoloration sur résine Amberlite IRA 94 S

Injection : 20 ml d'un jus ultrafiltré sur membrane PM 5 à une concentration en matière sèche de 5 p. 100

Elution : - De l'eau pendant la phase de séparation  $V_0 + V_1$  à un débit de  $50 \text{ ml.h}^{-1}$   
- Un mélange eau/méthanol (80/20 : v/v) à partir de la zone  $V_2$  à un débit de  $150 \text{ ml.h}^{-1}$ .

Dans ces conditions, nous obtenons les résultats rassemblés dans le tableau XLV p. 128. Nous collectons donc 35 p. 100 de la quantité totale de matière sèche injectée. Le déficit massique ( $100-45-15-20 = 20$  p. 100) représente la quantité de matière sèche fixée sur la résine. Cette fixation en haut de colonne entraîne une coloration verte de la résine. D'autre part, des essais répétitifs ont montré que l'on pouvait utiliser la résine plusieurs fois sans régénération mais après un simple rinçage à l'eau déminéralisée. Cette observation est importante pour une utilisation industrielle qui demande un rendement maximal de chaque étape.

Enfin, à titre préparatif, nous avons transposé en partie ces différents résultats au niveau pilote en utilisant une colonne de 4 litres (diamètre interne : 7 cm et hauteur : 1 m). Les conditions étaient les suivantes : - volume d'injection : 4 l, 8 l et 10 l de solution ultrafiltrée sur membrane SFEC PM 5 ;  
- débit :  $800 \text{ ml.h}^{-1}$  ;  
- concentration du jus injecté : 0,9 ; 1,2 p. 100 exprimée en matière sèche.

Dans tous les cas, les résultats sont semblables à ceux obtenus en laboratoire. Ils permettent donc d'envisager des essais sur colonnes de 100 à 200 litres nécessaires au niveau industriel. Une automatisation de cette étape est envisageable. En effet, un suivi du pH au cours de la phase de purification ( $V_0, V_1, V_2$ ) montre que la fixation de certaines molécules libèrent des ions  $\text{OH}^-$  et augmentent ainsi le pH. A partir du volume  $V_2$ , le pH redevient normal (pH 7).

TABLEAU XLV : Caractéristiques de l'étape de purification sur résine IRA  
94 S

	Vclume cumulé en ml	durée cumulée en min.	quantité de matière sèche en g	fractions
Injection	20	25	1	-
$V_0$	30	35	0	non collectées
$V_1$	90	115	0,45	
$V_2$	140	175	0,15	collectées
$V_3$	800	400	0,20	

Les conditions de cette étape sont celles définies à la page 127.

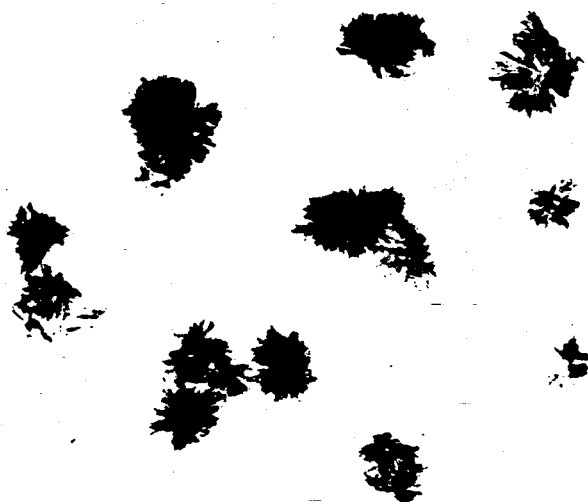


FIGURE 19 : Cristaux de stévioloside



## CONCLUSIONS

Ces résultats montrent que malgré les changements de solvant et de débit, la durée de cette étape (7 heures) nécessite la phase de concentration décrite au § II-C-2-1 p. 125. En effet, pour un rendement identique avec un ultrafiltrat standard (0,7 p. 100 de matière sèche), il serait nécessaire de faire 4 passages sur la résine (le volume d'injection étant supérieur pour une faible concentration) soit une durée totale de 28 heures. Ce problème temps est essentiellement dû au fait que nous utilisons cette résine pour ses propriétés d'adsorption et non pas d'échange d'anions. De ce fait, les volumes d'injection ainsi que le débit sont les paramètres importants de cette étape de purification. Enfin, l'utilisation d'éthanol bon goût à la place du méthanol ne pose pas de problème et permet ainsi son utilisation en agro-alimentaire. De plus, l'éthanol étant plus hydrophobe que le méthanol, les volumes d'élution sont moins importants et réduisent d'autant la durée de l'étape.

### E - CONCENTRATION SUR XAD<sub>2</sub>

Les fractions  $V_2$  et  $V_3$  obtenues en sortie de colonne IRA 94 sont passées en continu sur colonne de résine XAD<sub>2</sub> qui fixe à 100 p. 100 le stéviolside et le rébaudioside. Par ailleurs, on remarque qu'à 20 p. 100 de méthanol, la fixation est totale tandis qu'à partir de 40 p. 100, on observe un début de décrochage du stéviolside et du rébaudioside. En effet, un gradient de méthanol (de 40 à 100 p. 100) permet un décrochage progressif du stéviolside et du rébaudioside. Cependant, la présence d'eau dans l'éluat empêche la cristallisation du stéviolside qui nécessite un milieu alcoolique à 100 p. 100. Suite à ces résultats, nous avons procédé, après fixation du stéviolside et du rébaudioside sur la résine, à un séchage de la résine à l'évaporateur rotatif sous vide afin d'éliminer toute trace d'eau. L'élution de la résine au méthanol à 100 p. 100 permet un décrochage total et une cristallisation rapide, ultime étape de notre purification.

Enfin, étant donné qu'au niveau alimentaire, l'utilisation de méthanol est dangereuse et réglementée, nous avons effectué les mêmes essais avec de l'éthanol bon goût. Les résultats sont équivalents.

#### F - CRISTALLISATION

A 4°C dans du méthanol absolu, la cristallisation du stéviolside est rapide et donne des cristaux représentés à la figure 19 p. 128. A température ambiante, les cristaux sont plus petits. Dans de l'éthanol bon goût, la cristallisation est plus difficile de part la plus grande solubilité du stéviolside. Des cristallisations successives permettent d'obtenir du stéviolside pur mais diminuent le rendement. Les surnageants de cristallisation renferment essentiellement du rébaudioside. Seule une séparation par chromatographie à contre-courant permet d'obtenir du rébaudioside pur dont on connaît les propriétés avantageuses par rapport au stéviolside (cf § I-D-3 p. 53).

#### G - PURIFICATION SUR DCCC

Cette étape ne peut être envisagée qu'au niveau laboratoire. Elle ne permet de purifier que de faibles quantités de produit dans des temps relativement longs (500 mg pour 30 heures). Au niveau fondamental, cette méthode permet de préparer du rébaudioside. En effet, 500 mg de surnageant de cristallisation préalablement lyophilisé permet de préparer 300 mg de rébaudioside et 100 mg de stéviolside.

#### H - CONCLUSIONS

Suite à tous ces résultats, nous pouvons proposer un procédé de purification transposable au niveau industriel. L'analyse des différentes étapes nous permet de dresser le tableau XLVI p. 131 précisant les rendements de chaque étape unitaire. Si au niveau laboratoire nous obtenons un excellent rendement de 9,2 p. 100 (6,8 p. 100 de stéviolside et 2,4 p. 100 de rébaudioside), celui-ci est ramené à 5,4 p. 100 au niveau pilote. Cette différence est essentiellement due à l'impossibilité de récupérer pour l'instant le rébaudioside dans les eaux mères de cristallisation. Nous pouvons envisager la préparation du stéviolside, au stade industriel, selon le protocole décrit dans la figure 20 p. 132.

TABLEAU XLVI : Rendement des différentes étapes de purification

	AU NIVEAU LABORATOIRE			AU NIVEAU PILOTE		
	Rdt	Q	t	Rdt	Q	t
Extraction	42	4,2	1	42	420	1
Préfiltration centrifugation	91	3,82	1/2	94	394,8	1/2
Ultrafiltration	75	2,87	8	60	236,9	6
Concentration	-	-	-	100	236,9	8
Résine IRA 94 S	35	1,0	6x2	35	82,9	7x2
Résine XAD <sub>2</sub>	100	1,0	1	100	82,9	1
Cristallisation	60	0,60	12	65	53,9	12
DCCC	Rb	60	0,24	-	-	-
	St	20	0,08	-	-	-
Bilan	Rb	2,4	0,24	-	-	-
	St	6,8	0,68	5,4	54	42,5

Rdt : Rendement de l'étape

Q : Quantité de matière sèche en g

t : Durée de l'étape en heure



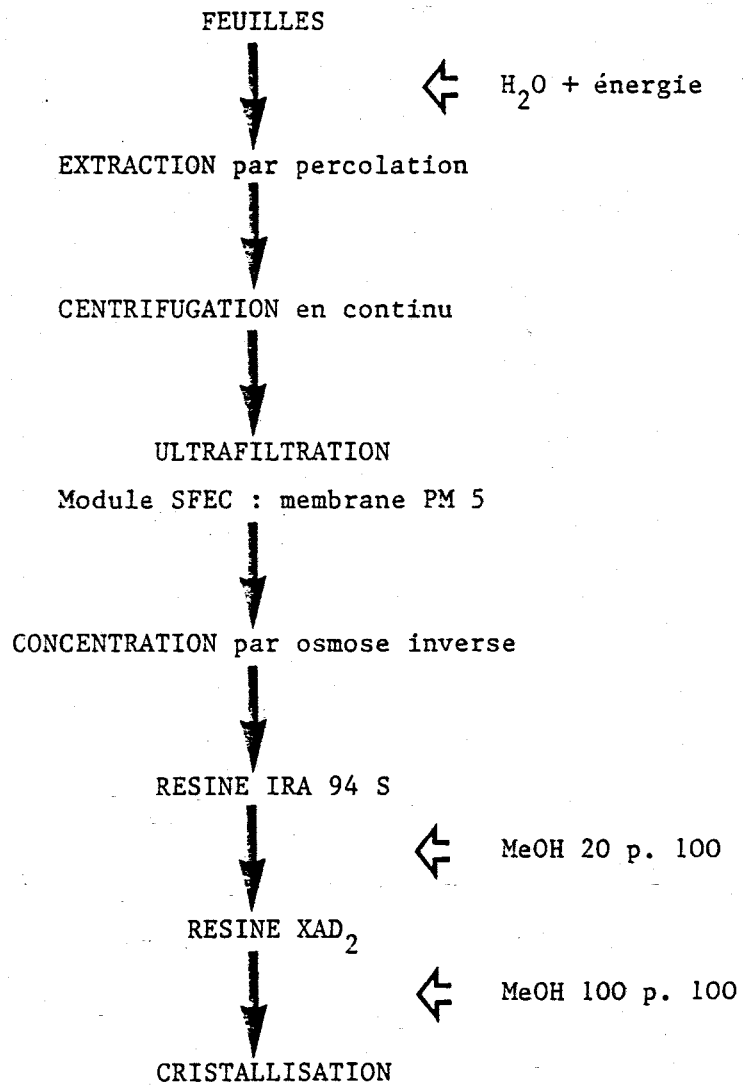


FIGURE 20 : Schéma de purification

### III - CONTRÔLE QUALITÉ

Comme nous l'avons vu dans la première partie (§ V-A-I p. 31) le dossier analytique constitue un chapitre important de la demande d'autorisation d'emploi d'un édulcorant. Que ce soit dans le domaine alimentaire ou pharmaceutique, il est en effet indispensable de disposer de méthodes de contrôle de nature à garantir la qualité du produit au stade de la fabrication en série. Pour cela, nous avons utilisé différentes méthodes aux différents stades de notre purification.

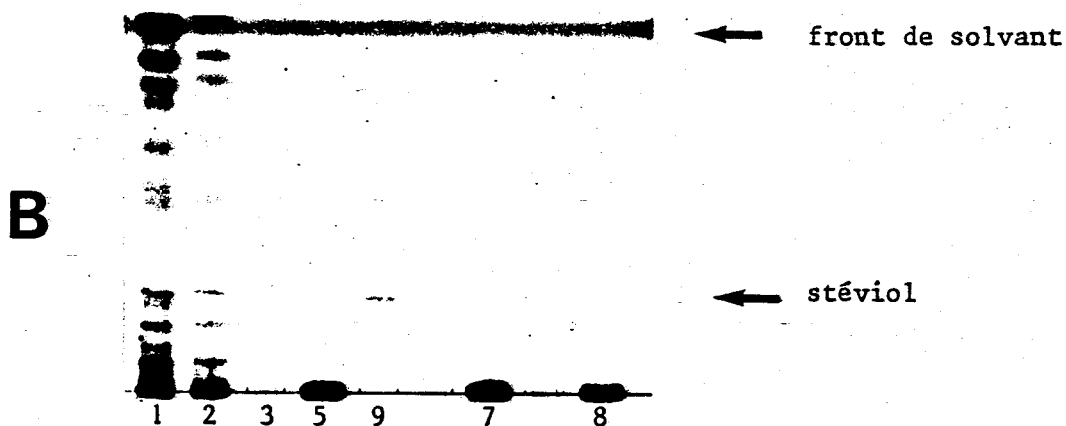
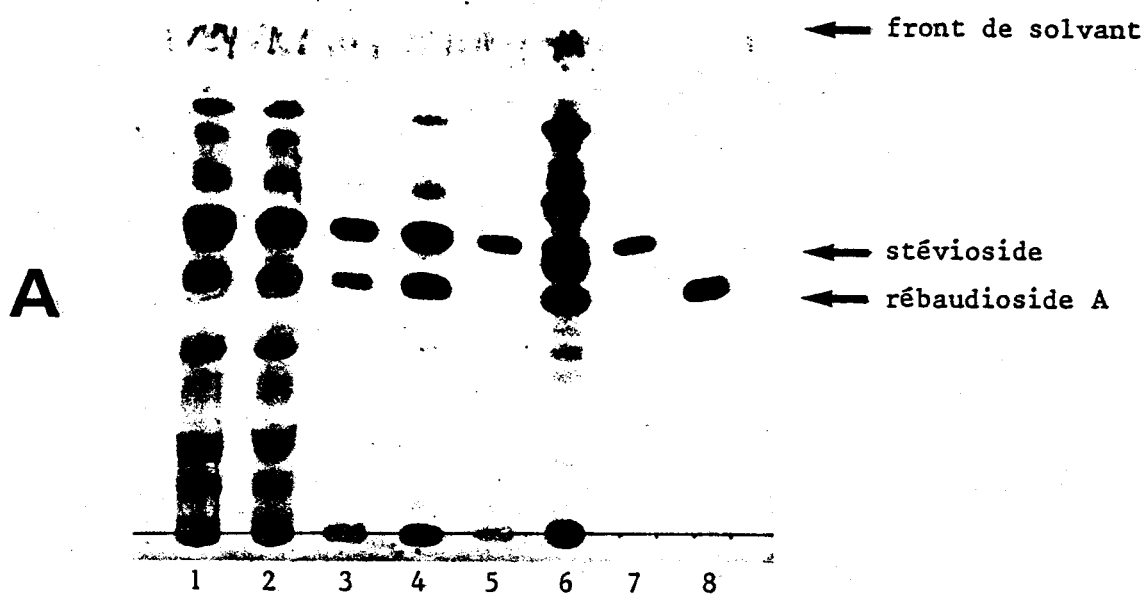
#### A - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

La chromatographie sur couche mince permet de suivre les différentes étapes de purification du produit en caractérisant suivant la méthode décrite au § II-A p. 86, d'une part le stéviol et le rébaudioside et d'autre part le stéviol ou l'isostéviol. La figure 21 p. 134 visualise l'état de pureté du stéviol et du rébaudioside après les différentes étapes de purification. On remarque ainsi l'importance des étapes sur résine qui permettent, une très bonne séparation et une forte concentration, ainsi que l'élimination du stéviol existant dans les extraits de départ.

Cependant en tant que critère de pureté, cette méthode n'est pas suffisante. En effet, nos systèmes de révélation sont trop spécifiques (oses neutres, stéroïdes) et ne permettent pas de s'assurer de la pureté totale du produit. D'autres méthodes complémentaires sont donc indispensables.

#### B - CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION

Comme précédemment cette technique permet de caractériser soit le stéviol et le rébaudioside (cf § II-B-1 p. 88), soit le stéviol (cf § II-B-2 p. 90). Le dosage aux différentes étapes de purification est plus simple et plus rapide que précédemment. De plus, nous pouvons envisager une automatisation de cette technique. Les différents profils mettant en évidence le stéviol et le rébaudioside sont rassemblés dans la figure 22 p. 135. Le tableau XLVII p. 136 nous montre l'influence des



**A** : Système solvant et révélation pour les oses neutres

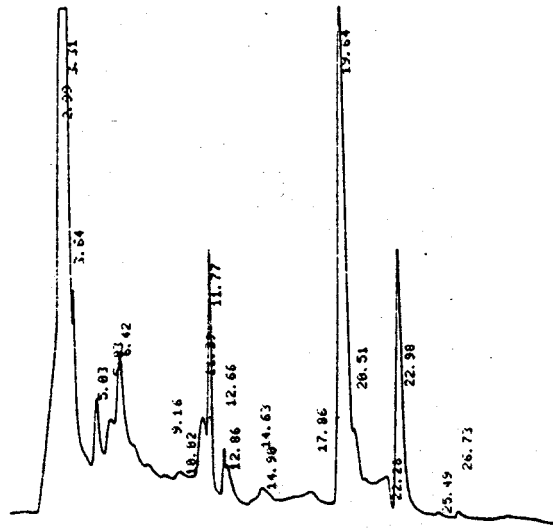
**B** : Système solvant et révélation pour les stéroïdes



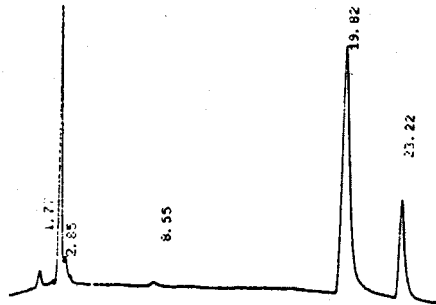
FIGURE 21 : C.C.M. des différentes étapes de purification

- 1 : extrait brut
- 2 : extrait ultrafiltré
- 3 : sortie de résine IRA 94 S
- 4 : sortie de résine XAD<sub>2</sub>
- 5 : cristallisation
- 6 : surnageant de cristallisation
- 7 : témoin stéviol
- 8 : témoin rébaudioside
- 9 : témoin stéviol

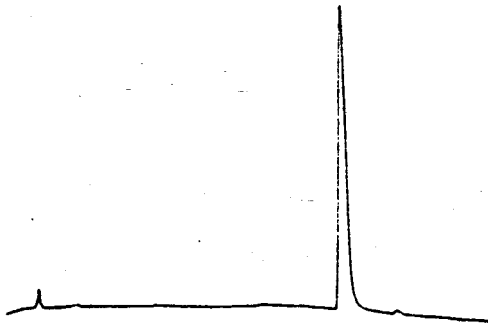
A



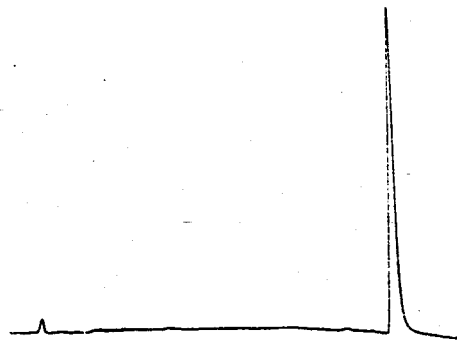
B



C



D



- A : Extrait brut
- B : Sortie de résine Amberlite IRA 94 S
- C : Stéviolide de cristallisation
- D : Rébaudioside de D.C.C.C.

FIGURE 22 : Chromatogrammes d'H.P.L.C. (colonne Amino Sphéri 5) des différentes étapes de purification

TABLEAU XLVII : Répartition du stévioloside et du rébaudioside dans les différentes étapes de purification

	P* STEVIOSIDE	P* REBAUDIOSIDE
Extrait brut	25	10
Ultrafiltrat	30	15
Sortie de résine IRA 94 S	50	25
Sortie de XAD <sub>2</sub>	50	25
Cristallisation	100	0
Surnageant de cristallisation	20	50
Rébaudioside sortie de D.C.C.C.	-	100

P\* : Pourcentage de stévioloside ou de rébaudioside par rapport à la matière sèche de l'échantillon analysé.

Conditions : Colonne : amino sphéri 5  
Solvant : gradient CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (90/10 - 70/30 ; v/v)  
Injection : 100 µl  
Débit : 1 ml.min<sup>-1</sup>





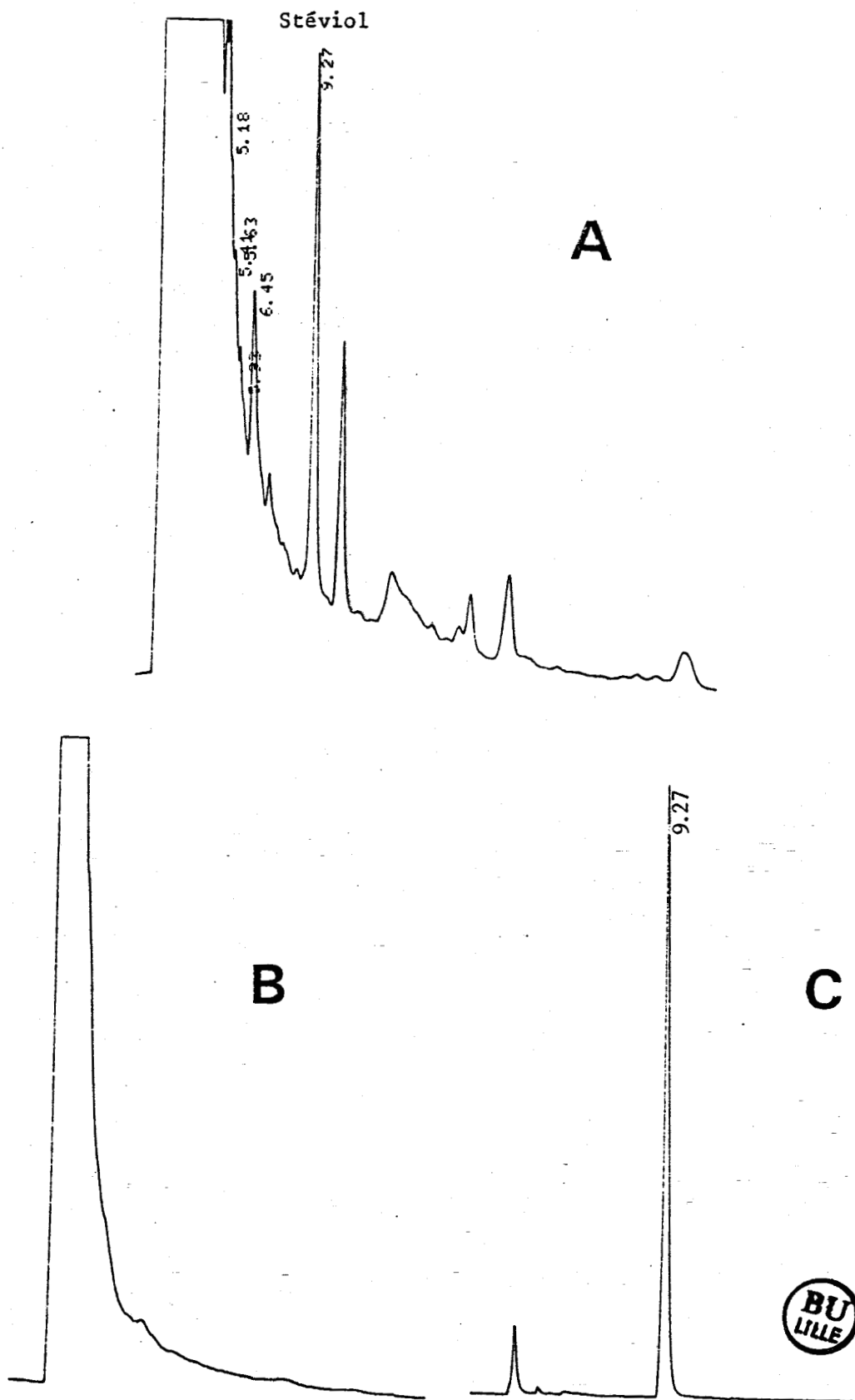
différentes étapes sur la purification des produits. On remarque que l'étape de cristallisation est déterminante pour obtenir un produit pur à 100 p. 100.

Même si la teneur en stéviósíde et rébaudiosíde est un élément important, il est indispensable de s'assurer de l'absence de stéviol dans le produit final. A ce niveau, la chromatographie liquide haute pression est préférable à la C.C.M. En effet, si pour la détection du stéviósíde et du rébaudiosíde la C.C.M. est plus sensible (0,1 µg contre 1 µg), il n'en est pas de même pour le stéviol. En H.P.L.C., la détection se fait dans l'U.V. à 200 nm et c'est le noyau diterpénique qui absorbe et représente l'intégralité du signal. Par contre, en ce qui concerne le stéviósíde et le rébaudiosíde le noyau diterpénique ne représente que 33 p. 100 et 25 p. 100 de la molécule, ce qui explique la baisse de sensibilité à masse égale. De plus, les dilutions nécessaires à l'injection et les problèmes de solubilité sont des facteurs limitant pour l'amélioration de la technique de dosage. Le stéviósíde et le rébaudiosíde ne sont que partiellement solubles dans les mélanges eau/acétonitrile.

Pour le stéviol, la grande sensibilité de la méthode par HPLC permet d'en détecter les moindres traces (0,2 µg dans 100 µl). Nous avons donc pu vérifier que notre procédé de purification éliminait toute trace de stéviol qui pourrait être responsable de la toxicité du stéviósíde (cf § III-B p. 76). Comme nous l'avons déjà présumé, la figure 23 p. 138 confirme le rôle important de l'étape sur résine IRA 94 S. Elle fixe le stéviol se trouvant sous forme acide. En effet, une extraction chloroformique de la partie supérieure de la résine met en évidence du stéviol caractérisé par HPLC et phase gazeuse.

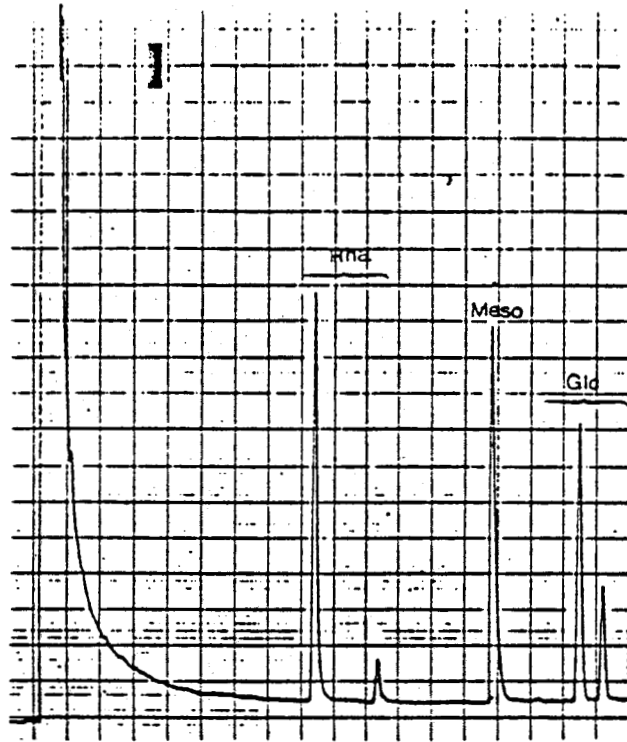
#### C - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

En ce qui concerne le stéviósíde et le rébaudiosíde, cette méthode ne peut être utilisée que comme critère de pureté étant donné qu'elle visualise (figure 24 p. 139) et quantifie le pourcentage de glucose existant dans une molécule. L'analyse du stéviósíde cristallisé et du rébaudiosíde obtenu par chromatographie à contre-courant (système DCCC) ont donné les résultats regroupés dans le tableau XLVIII p. 140.

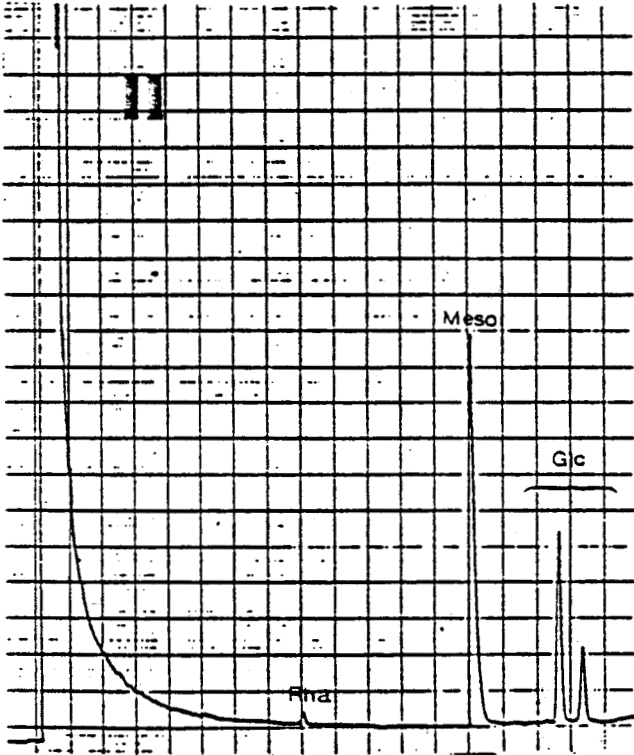


- A : Chromatogramme d'un extrait brut
- B : Chromatogramme de stéviol ou rébaudioside purifié
- C : Témoin stéviol

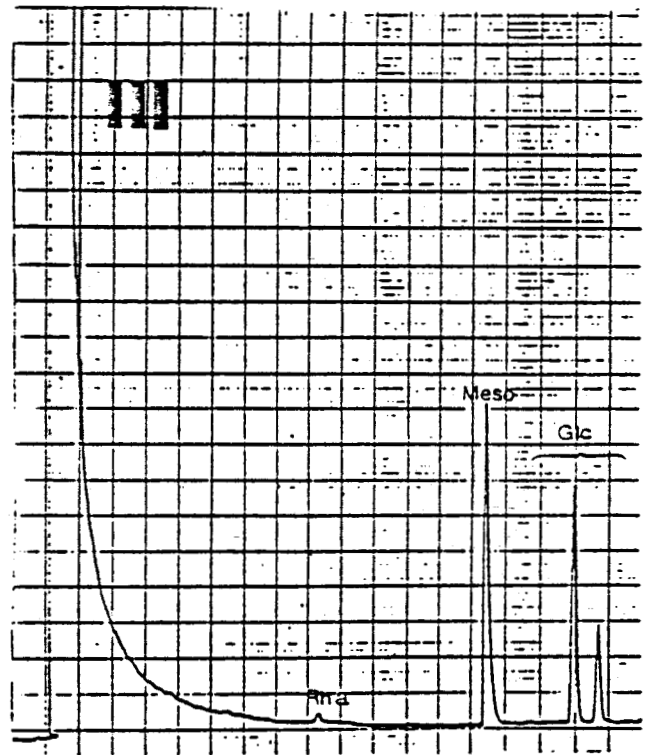
FIGURE 23 : Chromatogrammes d'HPLC sur colonne RP C 18 des différentes étapes de purification



Références Rhamnose-Glucose



Rébaudioside



Stévioside



FIGURE 24: Méthanolyse du stévioside et du rébaudioside.  
Chromatogramme en phase gazeuse

TABLEAU XLVIII : Analyse en phase gazeuse du stéviolside et du rébaudioside

	Rha	Glc	STEVIOSIDE	REBAUDIOSIDE
Poids moléculaire	164	180	804	966
Nombre de molécule de glucose th.	-	1	3	4
Pourcentage de glucose th.	-	100 %	67 %	75 %
Hauteur du Meso. en cm	11,75	11,75	10,25	12,35
Hauteur du rhamnose en cm	14,10	-	0,19	0,5
Hauteur du glucose en cm	-	12,25	10,65	8,35
Masse de rhamnose $10^{-6}$ g	50	-	0,71	1,75
Masse de glucose $10^{-6}$ g	-	50	50	39,4
Pourcentage de glucose	-	100	62,5	65,7
Nombre de moles de glucose calculées	-	1	2,8	3,5
Pourcentage de rhamnose	100	-	0,9	3

Meso. : Mesoinositol

Th. : Théorique



Ces analyses montrent la grande pureté de nos produits en dehors d'un pic de faible intensité correspondant à du rhamnose. L'existence de rhamnose peut s'interpréter de deux manières :

- d'une part, le stéviolose serait contaminé par du dulcoside A (Tableau XI p. 49) rapport 20/1 ;
- d'autre part, il y aurait du rébaudioside C (Tableau XI p. 49) dans le rébaudioside A, rapport 1/6.

De plus certains auteurs (106) démontrent que la présence de rhamnose en  $\beta$ 1-2 influence les qualités organoleptiques du produit. A cet effet, il sera intéressant de faire agir une  $\alpha$ -L-rhamnosidase afin d'éliminer toute amertume du produit. Enfin, nous pouvons également utiliser la phase gazeuse pour détecter la présence du stéviol suivant la méthode décrite au § II-C-2 p. 92 (Figure 25 p. 142).

#### D - POINT DE FUSION

Nos résultats coïncident avec ceux décrits dans la littérature (Tableau XLIX p. 142).

#### E - CONCLUSIONS

L'utilisation et la combinaison de ces différentes techniques mettent en évidence que notre produit est pur à 100 p. 100 même s'il peut être parfois contaminé par du dulcoside A. De plus, la simplicité de notre procédé de purification élimine toute possibilité de contamination qui est souvent responsable de problèmes toxicologiques (cf § II-B p. 16-21). Seule l'étape finale de cristallisation dans du méthanol ou de l'éthanol nécessite une attention particulière car il sera nécessaire de vérifier l'absence de toute trace de solvant dans le produit final.

### IV - MÉTABOLISME DU STÉVIOSIDE ET DU RÉBAUDIOSIDE

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre V p. 30, une étude toxicocinétique du produit est nécessaire pour constituer un

TABLEAU XLIX : Point de fusion du stéviol, rébaudioside et stéviol.

	THEORIQUE en °C	MESURE en °C
Stéviolside	238	236 ± 2
Rébaudioside	248	249 ± 2
Stéviol	216	215 ± 2

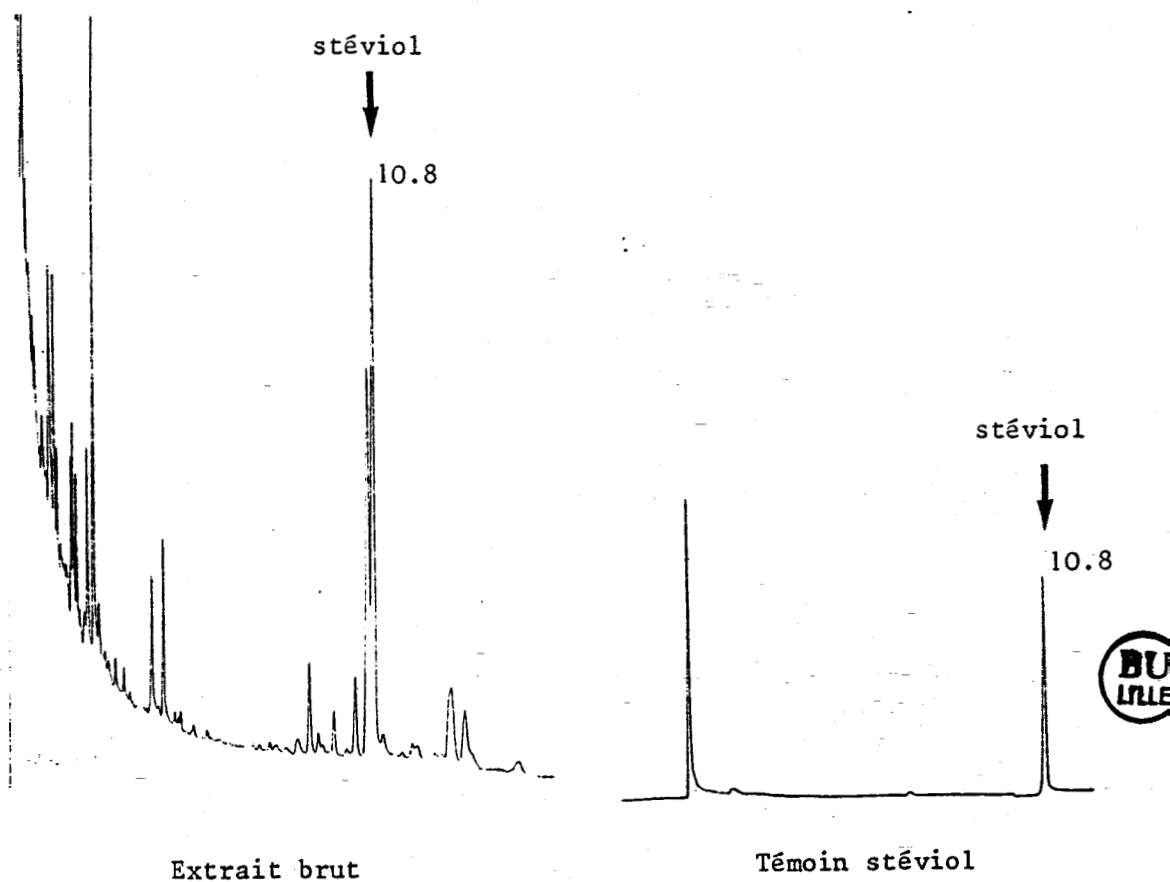


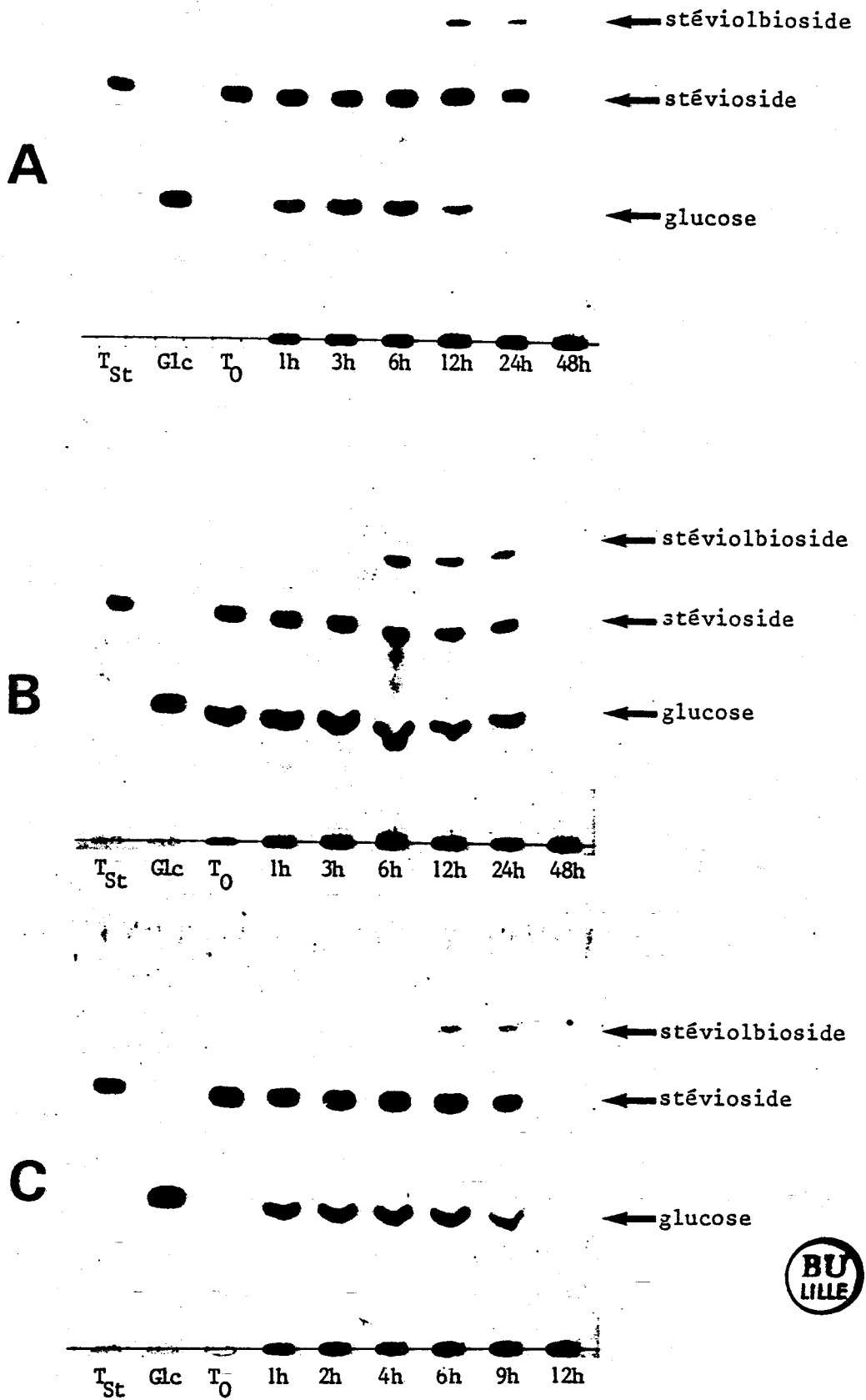
FIGURE 25 : Chromatogrammes du stéviol en phase gazeuse sur colonne capillaire OV 101

dossier de demande d'autorisation d'emploi d'un édulcorant. On entend par toxicocinétique le sort que la ou les produits à tester subissent dans l'organisme : cette étude est celle de l'absorption, de la répartition, de la biotransformation (ou métabolisme) et de l'élimination de la molécule.

Dans tous ces travaux, nous nous sommes limités à l'étude de la biotransformation et de l'élimination du produit. Nous avons tout d'abord effectué des essais in vitro pour ensuite étudier le métabolisme du stéviolside et du rébaudioside in vivo.

#### A - ESSAIS PRELIMINAIRES IN VITRO : HYDROLYSE PAR LA FLORE CAECALE

Dans des conditions différentes, ces essais ont permis d'abord de confirmer les résultats de WINGARD (77). En effet, quel que soit le milieu d'incubation, nous mettons en évidence que le stéviolside est hydrolysé en stéviol par la microflore caecale de rat. Cette hydrolyse est facilitée en milieu aérobie par rapport au milieu anaérobie. Le temps d'hydrolyse nécessaire à 37°C passe respectivement de 12 à 48 heures. De plus, comme le montre la figure 26 p. 144, la vitesse d'hydrolyse du stéviolside dépend de la présence de glucose ou non. En effet, une source de glucose retarde la dégradation du stéviolside qui nécessite 12 h d'incubation supplémentaires. Pour chaque hydrolyse, nous avons effectué une extraction chloroformique suivie d'une injection en HPLC qui a permis de mettre en évidence la présence de stéviol, produit d'hydrolyse enzymatique du stéviolside. La présence de stéviol prouve donc l'hydrolyse totale de la molécule de stéviolside et la libération de 3 molécules de glucose elles-mêmes métabolisées. Par ailleurs, comme le montre la figure 26 p. 144, l'hydrolyse du stéviolside en stéviol passe par un intermédiaire : le stéviolbioside. Cette hydrolyse partielle du stéviolside est due à la fragilité de la liaison ester (glucose — noyau). Le stéviolbioside ainsi formé est plus difficilement hydrolysable et nécessite un temps d'incubation plus long. Suite à ces premiers résultats, une étude in vivo devait nous permettre de conclure sur le métabolisme du stéviolside.



A : en milieu anaérobie  
B : en milieu aérobie + glucose  
C : en milieu aérobie sans glucose

FIGURE 26 : Dégradation du stéviolside *in vitro*



B - METABOLISME DU STEVIOSIDE ET DU REBAUDIOSIDE IN VIVO

Le but de cette étude était de savoir dans un premier temps si, in vivo le stéviolside et le rébaudioside étaient hydrolysés en stéviol. Dans un second temps, nous avons travaillé sur des souris axéniques afin de déterminer si cette transformation était uniquement tributaire de la flore microbienne ou s'il était possible d'observer une hydrolyse par les enzymes de la muqueuse intestinale.

1) SOURIS GNOTOBIOTIQUES

Nous avons tout d'abord cherché à localiser et à doser le stéviol dans les fécès ou les urines puis à quantifier le stéviolside et le rébaudioside restant afin d'effectuer un bilan massique.

Après extraction et analyses, nous n'avons trouvé aucune trace de stéviol dans les urines ce qui est d'ailleurs logique étant donné son poids moléculaire de 318 D (le seuil d'excrétion est aux alentours de 200 D ; il varie suivant la conformation de la molécule). Il est par contre détecté en totalité dans les fécès (figure 27 p. 146) même si une analyse du contenu caecale prélevé après sacrifice montre une très faible quantité de stéviol. Les résultats d'analyses des fécès (tableau L p. 147) montrent quelles que soient les doses, le stéviolside et le rébaudioside sont hydrolysés en stéviol. Cependant, comme le montre la figure 28 p. 148, la quantité de stéviol formé n'est pas directement proportionnelle à la quantité d'édulcorant de départ et ceci plus particulièrement dans le cas du rébaudioside. En effet, à faibles doses (10 et 50 mg/kg/jour) nous sommes en présence d'un excès d'enzymes par rapport au substrat. Les systèmes enzymatiques hydrolysent toutes les liaisons ( $\beta$ 1-2 mais aussi  $\beta$ 1-3) susceptibles de libérer du glucose et former ainsi du stéviol. Par contre, aux doses de 250 mg/kg/jour, on peut considérer être dans le cas d'un excès de substrat et le système enzymatique possédant une plus grande affinité pour les liaisons de type  $\beta$ 1-2, hydrolyse plus fortement le stéviolside que le rébaudioside possédant une liaison glucose  $\beta$ 1-3. Ceci entraîne probablement une accumulation de  $\beta$ 1-3 stéviolbioside et explique également le faible rendement d'hydrolyse du rébaudioside en stéviol (23,7 p. 100).

FIGURE 27 : Chromatogrammes d'HPLC pour dosage du stéviol dans les fèces de souris gnotobiotiques (colonne RP C18)

A : Tamoin fèces  
 B : Fèces de souris gnotobiotiques gavées au stéviol  
 C : Fèces de souris gnotobiotiques gavées au rébaudioside

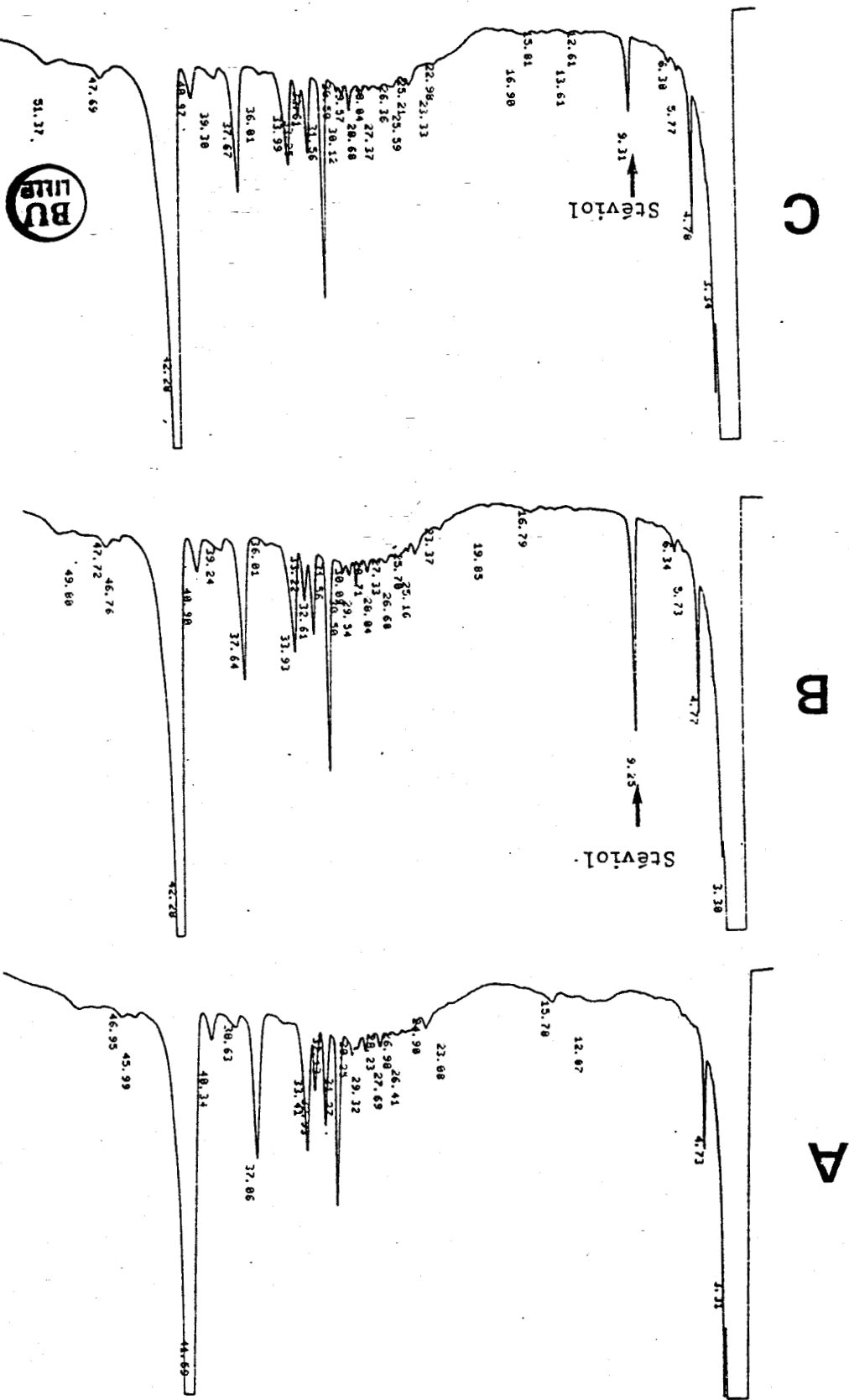


TABLEAU L : Souris gnotobiotiques. Hydrolyse du stévioloside et du rébaudioside en stéviol

	Doses en mg/kg/jour	So	Po	P	P/Po x 100	S <sub>1</sub>	S	Déficit en mg
Stévioloside	10	0,91	0,3	0,241	80,3	0,18	-	0,18
	50	5,05	1,67	0,883	52,9	2,37	-	2,37
	250	25,25	8,33	3,07	36,9	15,95	4,4	11,55
Rébaudioside	10	1,01	0,253	0,174	68,8	0,314	-	0,314
	50	5,05	1,26	0,6	47,6	2,65	-	2,65
	250	24,75	6,19	1,467	23,7	18,88	6,17	12,7

So : Quantité de stévioloside ou rébaudioside donnée en mg/lot de souris/jour

Po : Quantité de stéviol théorique en mg

P : Quantité de stéviol dosé en mg

S<sub>1</sub> : Quantité de stévioloside ou rébaudioside théorique restant en mg

S : Quantité de stévioloside ou rébaudioside dosée en mg



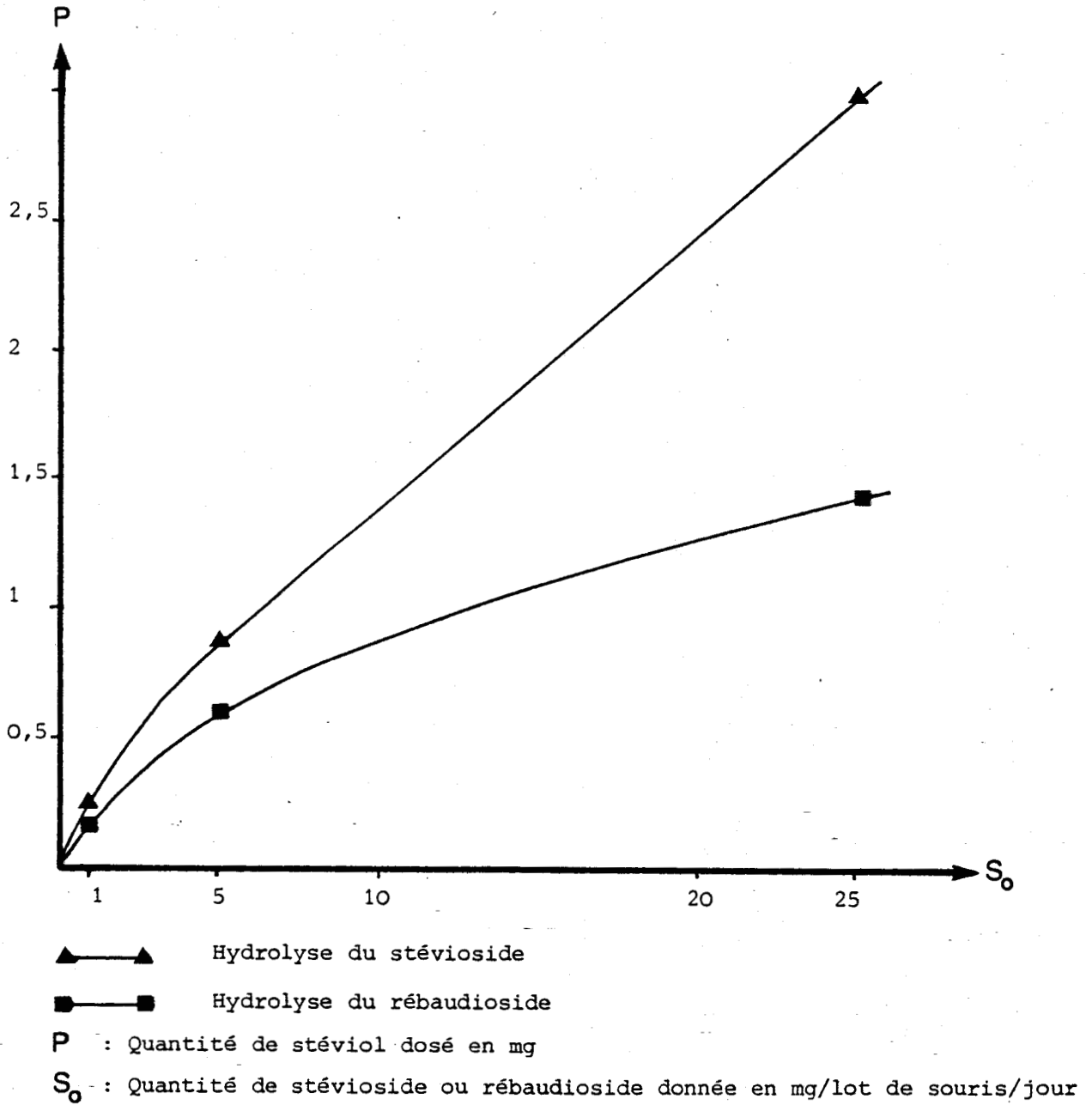


FIGURE 28 : Hydrolyse in vivo du stéviolside et du rébaudioside en stéviol

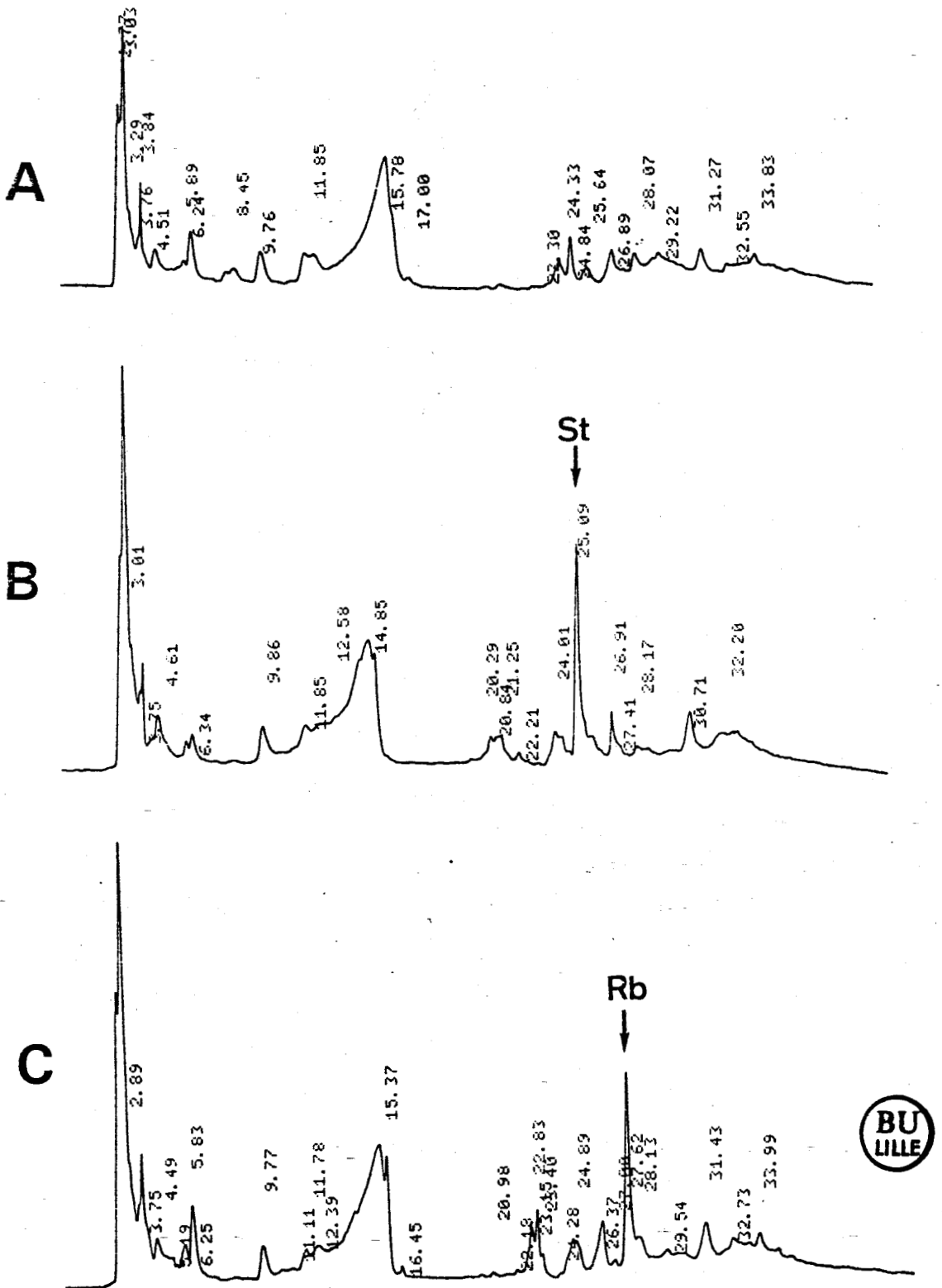
Par ailleurs, on remarque d'après le tableau L p. 147, que le rapport stéviol libéré sur stéviol théorique (P/Po) est inversement proportionnel à la concentration d'édulcorant de départ. Ces résultats confirment l'hypothèse qu'aux fortes doses nous sommes en présence d'un excès de substrat. Ces premiers résultats ont été complétés par un dosage du stévioside et du rébaudioside dans les fécès (figure 29 p. 150). On remarque alors que par rapport à la quantité d'édulcorants de départ, le stéviol et le stévioside ou le rébaudioside dosés ne permettent pas d'établir un bilan équilibré. Nous mettons ainsi en évidence un déficit de 60 à 70 p. 100 qui peut être dû à nos méthodes de dosage. On remarque en effet que même dans le cas de souris axéniques où aucune transformation du stévioside n'est mis en évidence (Tableau LI p. 151), nous observons également un déficit de 30 p. 100 qui peut s'expliquer par un mauvais rendement d'extraction, mais également par une faible sensibilité de notre méthode de dosage du stévioside (seuil de sensibilité : 1 µg dans 100 µl). Cette remarque nous amène à analyser la cause des 30 à 40 p. 100 de déficit restant. Comme précédemment, la méthode d'extraction et de dosage du stéviol peut être mise en cause. Cependant, nos dosages ont déjà pris en compte la quantité de stéviol obtenue après une deuxième et troisième extraction qui ne représente que 10 p. 100 de la quantité dosée. De plus cette méthode de dosage est beaucoup plus sensible que précédemment (0,2 µg dans 100 µl).

Il semble donc plus probable d'expliquer ce déficit par une hydrolyse partielle du stévioside ou du rébaudioside en stéviolbioside qui n'a pas été pris en compte dans le bilan bien que visualisé par C.C.M. (Figure 30 p. 152).

Enfin, il ne faut pas négliger une éventuelle transformation du stéviol en une molécule qu'il resterait à définir.

## 2) LES SOURIS AXENIQUES

Cette étude a été effectuée uniquement avec du stévioside aux mêmes doses que précédemment. Dans un premier temps, suivant nos méthodes d'extraction et de détection (CCM et HPLC) nous avons recherché une éventuelle dégradation du stévioside (Figure 30 p. 152).



A : Témoin fécès  
B : Fécès de souris gnotobiotiques gavées au stévioloside (St)  
C : Fécès de souris gnotobiotiques gavées au rébaudioside (Rb)

FIGURE 29 : Chromatogrammes d'HPLC pour dosage du stévioloside et du rébaudioside dans les fécès de souris gnotobiotiques.

TABLEAU LI : Souris axéniques. Hydrolyse du stéviol en stéviol

	Jours	Quantité de stéviol donnée en mg/lot de souris/jour	Stéviol dosé en mg	Stéviol dosé en mg	déficit en mg
10 mg/kg	J1	1,08	0	-	1,08
	J2	1,08	0	-	1,08
	J3	1,08	0	-	1,08
50 mg/kg	J1	5,35	0	4,05	1,3
	J2	5,35	0	3,9	1,45
	J3	5,35	0	3,95	1,4
	J4	5,35	0	3,9	1,45
250 mg/kg	J1	23,75	0	16,25	7,5
	J2	19,25	0	13,30	5,95
	J3	13,75	0	10,15	3,6
	J4	13,75	0	11,05	2,7



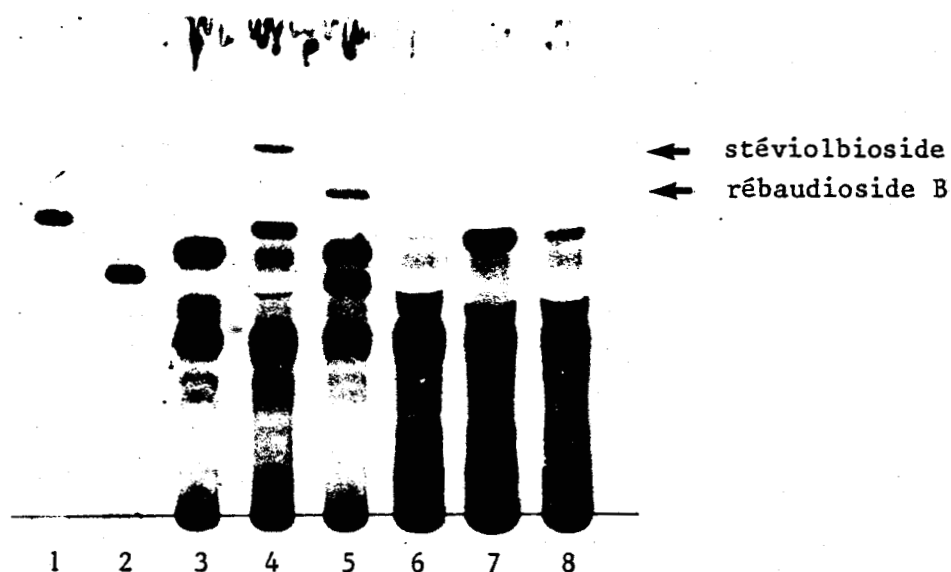


FIGURE 30 : C.C.M. du stéviolbioside et du rébaudioside après extraction des fécès de souris gnotobiotiques et axéniques

- 1 : témoin stéviolbioside
- 2 : témoin rébaudioside A
- 3 : extrait témoin de fécès de souris gnotobiotiques
- 4 : extrait de fécès de souris gnotobiotiques gavées au stéviolbioside à 250 mg/kg/j
- 5 : extrait de fécès de souris gnotobiotiques gavées au rébaudioside à 250 mg/kg/j
- 6 : extrait témoin de fécès de souris axéniques
- 7 : extrait de fécès de souris axéniques gavées au stéviolbioside à 250 mg/kg/j
- 8 : extrait de fécès de souris axéniques gavées au stéviolbioside à 10 mg/kg/j





L'analyse des fécès, des urines et du contenu coecal n'ont mis en évidence aucune trace de stéviol (tableau LI p. 151 et figure 31 p. 154). Suite à ce premier résultat, nous avons dans un second temps dosé le stéviol dans les fécès (Figure 31 p. 154). Comme précédemment, le tableau LI p. 151 montre qu'après avoir fait le bilan massique il existe un important déficit (30 p. 100) certainement dû à notre méthode d'extraction et de dosage.

### 3) CONCLUSIONS

D'après ces résultats, nous avons mis en évidence que le stéviol et le rébaudioside sont hydrolysés en stéviol in vivo et que cette hydrolyse est uniquement dépendante des bactéries intestinales.

Par ailleurs, le rébaudioside est plus difficilement hydrolysé en stéviol que le stéviol, cette propriété étant certainement due à l'existence de la liaison  $\beta$ 1-3.

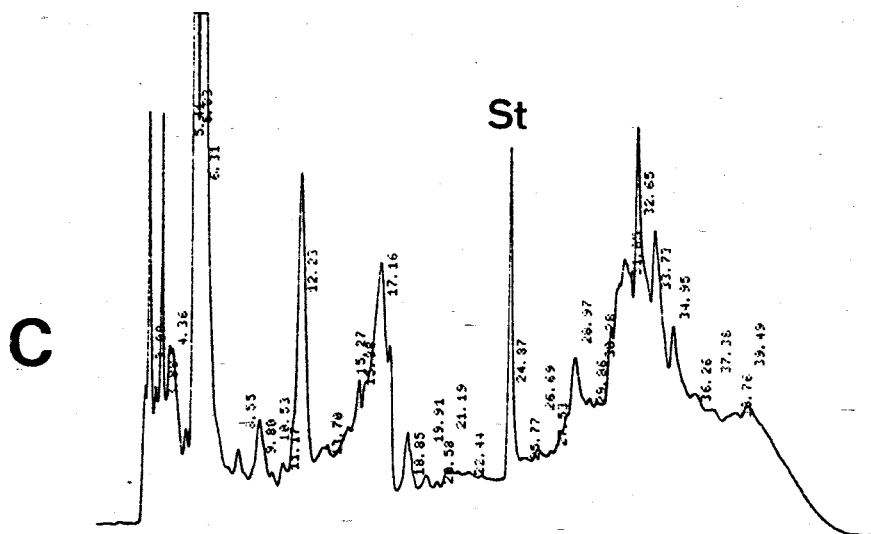
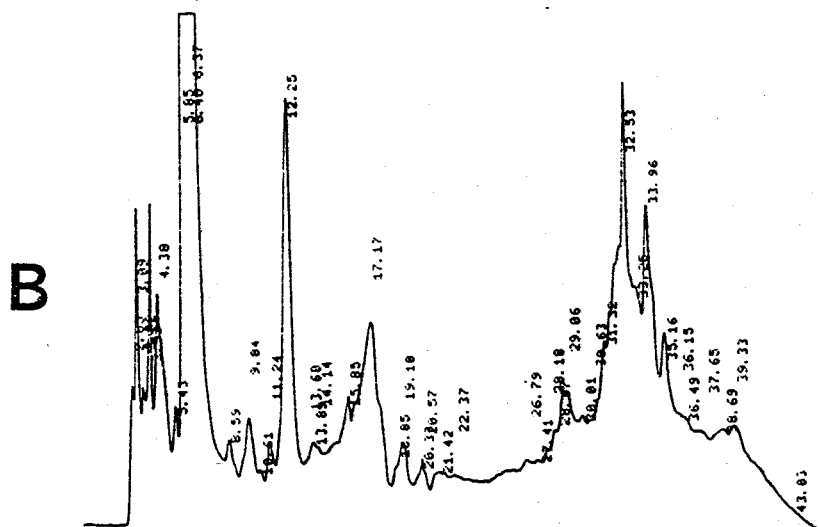
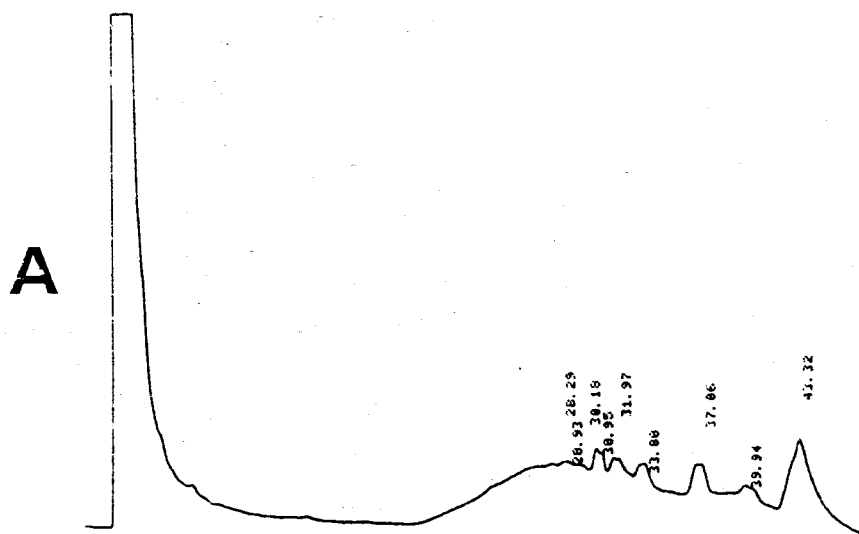
Enfin, les bilans massiques de chaque expérience mettent en évidence un déficit qui, en dehors des problèmes techniques (extraction, dilution et dosage), permet d'établir certaines remarques :

- le stéviol et le rébaudioside sont hydrolysés partiellement avec libération d'une, deux ou trois molécules de glucose ;
- le stéviol est dégradé en une autre molécule inconnue ?
- le stéviol est absorbé au niveau des tissus ?

Seule une synthèse chimique de stéviol ou de rébaudioside marqués permettrait de suivre leur dégradation et ainsi de faire un bilan complet.

## V - ÉTUDES TOXICOLOGIQUES

Toutes ces études toxicologiques ont été effectuées à l'Institut PASTEUR dans le Service de Toxicologie du Professeur MARZIN.



- A : Dosage stéviol dans les fécès de souris axéniques gavées au stéviol (sur colonne RP C 18)
- B : Témoin fécès de souris axéniques (colonne amino sphéri 5)
- C : Fécès de souris axéniques gavées au stéviol (dosage sur colonne amino sphéri 5)

FIGURE 31 : Chromatogrammes d'HPLC pour dosage du stéviol et du stéviol (St)

Elles ont été réalisées dans le but de vérifier les résultats de PLANAS (90) qui a mis en évidence un effet contraceptif de l'extrait de *Stévia*. Ces études ont nécessité la préparation de quantités importantes de produit d'après nos procédés de purification.

#### A - ETUDES PRELIMINAIRES

Deux essais ont été effectués à partir d'un mélange de stévioside et de rébaudioside préparé suivant un ancien protocole qui ne comprend pas d'étape d'ultrafiltration, ni d'étape de décoloration et de purification sur résine.

##### 1) PREMIER ESSAI

Les résultats de la première étude (tableau LIII p. 156) amènent les observations suivantes :

###### *a - Observation des animaux*

Les animaux traités ont présenté un comportement normal pendant toute la durée du traitement. On a cependant noté une légère augmentation de l'agressivité et de la motilité chez les mâles pendant les 3 premières semaines du traitement, et chez les femelles pendant toute la durée du traitement.

###### *b - Evolution pondérale des femelles*

Seule une légère diminution du poids des femelles traitées a pu être mise en évidence à J+7. Cette différence observée est toutefois minime et n'apparaît pas comme étant significative d'un effet toxique vis-à-vis des mères traitées.

###### *c - Nombre de femelles gravides*

Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence (8 femelles témoins sur 10 et 9 femelles traitées sur 10 ont été gravides :  $\chi^2 = 0,392$ ). Le mélange stévioside + rébaudioside ne présente donc pas d'effet sur la fertilité des animaux mâles.

TABLEAU LII : Etude de l'interférence d'un mélange de stéviolside et de rébaudioside A sur les fonctions de reproduction chez la souris

Moyenne des résultats

		POIDS en mg					FOETUS VIVANTS	POIDS INDIVIDUELS FOETUS VIVANTS Moyenne en mg	RESORPTIONS TARDIVES	RESORPTIONS PRECOCES	IMPLANTATIONS	CORPS JAUNES	DECIDUOME	TAUX DE NON IMPLANTATIONS	IMPLANT MORTS
		J-14	J-7	JO	J7	J14									
TEMOIN	m	27,9	30,7	28,6	31	36,1	12,37	532,57	0,25	1	13,62	13,12	0	0	1,11
	Sm	0,48	0,33	0,43	0,39	1,49	0,75	57,70	0,16	0,37	0,53	0,54	0	0	0,31
TRAITE	m	27,8	31,4	28,6	29,7	38,4	9,33	567,56	0,11	4,56	12,78	13,77	0	0,22	4,78
	Sm	0,44	0,34	0,43	0,30	1,14	1,23	61,49	0,11	1,15	0,4	0,57	0	0,146	1,12
STEVIOSIDE + REBAUDIOSIDE	t	0,15	1,47	0	2,62	1,23	2,03	0,41	0,71	2,77	0,23	0,84	0	1,42	3,13
	P	N.S.	N.S.	N.S.	<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<0,01
50 mg/kg	U	49	32,5	50	20	39,5	16,5	28	31	11	34,5	27,5	36	28	11
	P	N.S.	N.S.	N.S.	<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<0,05

m : moyenne

Sm : écart-type de la moyenne

t : test de Student

U : U de Mann Whitney

N.S. : Non statistiquement significatif au seuil de p 0,05



*d - Nombre de corps jaunes*

Aucune différence significative du nombre de corps jaunes n'a été mise en évidence entre animaux témoins et traités. Le mélange stévioside + rébaudioside ne présente donc pas d'effet sur l'ovulation.

*e - Nombre de foetus vivants*

On observe une baisse du nombre de foetus vivants (- 24,6 %). Cependant, étant donnée la dispersion des résultats et le faible nombre d'animaux utilisés dans cette étude, la différence observée n'est pas statistiquement significative.

*f - Pesée des foetus vivants*

Aucune différence statistiquement significative du poids moyen des foetus vivants n'a été mise en évidence.

*g - Nombre de foetus morts tardivement*

Aucune différence statistiquement significative du nombre de foetus morts tardivement n'a été mise en évidence.

*h - Nombre de foetus morts précocement*

Le traitement par le mélange stévioside + rébaudioside a provoqué une augmentation statistiquement significative du nombre de foetus morts précocement. Cette différence peut être mise en évidence en utilisant soit un test statistique paramétrique classique (le test t de Student), soit un test non paramétrique moins puissant, mais mieux adapté à une distribution non gaussienne des résultats et à une forte différence de variance entre animaux témoins et traités (test U de Mann Whitney). L'effet foetotoxique est indéniable puisque le nombre de mortalités précoces est multiplié par 4,5.

*i - Nombre de résorptions (déciduomes)*

Aucun déciduome, tant chez les animaux témoins que traités n'a été mis en évidence.

*j - Total des implants morts*

Le total des implants morts est augmenté de façon statistiquement significative chez les animaux traités.

### *k - Conclusions*

Dans cette étude, pour une dose de 50 mg/kg d'un mélange stéviolside-rébaudioside (70 - 30 p/p), nous mettons en évidence une augmentation de la mortalité précoce chez les animaux de la génération F1 provenant de l'accouplement des parents traités. Cette toxicité peut être attribuée soit à un effet foetotoxique du fait du traitement des mères pendant la gestation, soit à un effet de mutation létale dominante chez les mâles. A la vue de nos résultats (Tableau LII p. 156), cette deuxième hypothèse semble moins probable car celle-ci s'accompagne en général d'une augmentation du nombre de déciduomes chez les femelles fécondées par ces mâles.

De plus, à la suite de notre dernière étude (cf § V-C p.168) nous avons effectué un examen anatomopathologique des testicules qui n'a révélé aucune lésion tissulaire, ni aucune anomalie de la spermatogénèse. Les examens histopathologiques n'ont mis en évidence aucune lésion attribuable au traitement. Les prélèvements effectués chez les animaux traités révèlent dans leur ensemble, des aspects similaires à ceux des animaux témoins. La spermatocytogénèse semble s'être normalement accomplie (les spermatogonies, spermatocytes et spermatides sont présents) ainsi que la spermiogénèse comme l'indique la présence de nombreux spermatozoïdes chez tous les animaux. Pas de réaction des cellules interstitielles de Leydig. Un examen histochimique par la technique du PAS n'a mis en évidence aucune altération métabolique détectable. Les membranes basales sont normalement colorées.

Enfin, si l'effet foetotoxique est indéniable, il est difficile de statuer sur l'origine de cet effet. Seul un essai utilisant un seul des deux parents traités permettrait de conclure.

### 2) DEUXIEME ESSAI

Suite aux résultats de la première étude, deux essais ont été effectués sur 5 femelles gravides (accouplement avec des mâles normaux) nourries uniquement pendant la période de gestation (14 jours) à une dose de 200 mg/kg/jour avec du stéviolside pur et un mélange stéviolside + rébaudioside.

a - Résultats

Dans les deux cas, nous avons observé 100 p. 100 de résorptions précoces, soit aucun foetus vivant.

b - Conclusion

Cette deuxième étude confirme l'hypothèse de l'effet foetotoxique.

3) CONCLUSION DES ESSAIS PRELIMINAIRES

Nos résultats sont différents de ceux de PLANAS (90) qui avait observé une baisse de fertilité des animaux traités et non un effet foetotoxique. Il est à noter cependant que PLANAS a travaillé sur des rats et non des souris traités avec un extrait brut de feuilles.

Suite à ces résultats, nous avons effectué une autre étude afin de mettre en évidence une relation dose-effets avec un nombre d'animaux plus important.

B - ETUDE DE TOXICITE FOETALE CHEZ LA SOURIS

Cette étude a été réalisée à partir de stéviolside pur pour des doses de 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 mg/kg/jour. Le produit a été préparé suivant le procédé de purification retenu actuellement. Les résultats de cette étude sont rassemblés dans le tableau LIII p. 160 qui amènent les remarques suivantes :

1) OBSERVATION DES ANIMAUX, EVOLUTION PONDERALE

Les animaux traités ont présenté un comportement normal pendant toute la durée de la période de traitement. L'évolution pondérale des animaux traités a été identique à celle des témoins. Il est à noter que le poids des animaux non gravides n'a pas été pris en compte dans le calcul.

TABLEAU LIII : Test de toxicité foetale chez la souris  
Tableau récapitulatif des résultats

PRODUIT ETUDIE	DOSES	POIDS en g			1 FOETUS VIVANTS	POIDS INDIVIDUELS FOETUS VIVANTS en mg	2 RESORPTIONS TARDIVES	3 RESORPTIONS PRECOCES	4 IMPLAN- TATIONS	5 CORPS JAUNES	6 DECIDUOMES 4-(1+2+3)	7 NON IMPLAN- TATIONS 5 - 4	8 IMPLANTS MORTS 2 + 3 + 6
		JO	J6	J13									
Eau distillée (témoin)	0	31	34	43,93	11,25	253,33	0,69	2,44	14,38	14,56	0	0,5	3,12
Stéviolside	6,25 mg/kg	30,74	34,05	45,05	12,47	244,63	0,47	2,11	14,95	14,84	0,11	0,58	2,68
	12,5 mg/kg	31,16	34,11	44,63	11,65	238,32	0,25*	1,8	13,45	14,35	0	1,4	2,05
	25 mg/kg	30,68	33,89	43,58	11,28	246,65	0,17*	2,28	13,56	14,56	0,06	1,17	2,5
	50 mg/kg	30,22	33,61	44,78	11,11	241,72	0,61	1,72	12,05	14,45	0,11	2,75*	2,44
	100 mg/kg	31,12	34,65	44,88	10,21	248,06	0,67	2,17	12,79	14,53	0,06	2,16*	2,89
	200 mg/kg	30,44	34,06	44,75	10,72	277,75	0,71	1,71	12,89	14,22	0,18	1,72	2,59

\* : Différence statistiquement significative au seuil de  $p < 0,05$





2) CRITERES DE FERTILITE

a - *Nombre de femelles gravides*

Aucune diminution significative du nombre de femelles gravides n'a été mise en évidence.

b - *Nombre de corps jaunes*

Aucune variation significative du nombre de corps jaunes n'a été mise en évidence.

c - *Nombre de foetus vivants*

Aucune différence significative du nombre de foetus vivants n'a été mise en évidence.

d - *Pesée des foetus vivants*

Aucune différence significative du poids des foetus vivants n'a été mise en évidence.

e - *Nombre de foetus morts tardivement*

Aucune différence significative du nombre de foetus morts tardivement n'a été mise en évidence.

f - *Nombre de foetus morts précocement*

Aucune différence significative du nombre de foetus morts précocement n'a été mise en évidence.

g - *Nombre de déciduomes*

Aucune différence significative du nombre de déciduomes n'a été mise en évidence.

h - *Taux de non implantations*

Une augmentation statistiquement significative du taux de non implantations a été mise en évidence aux doses de 50 et 100 mg/kg. Toutefois, aux doses inférieures, ce nombre est également augmenté mais de façon non significative.

*i - Total des implants morts*

Aucune différence significative du nombre d'implants morts n'a été mise en évidence.

3) CONCLUSIONS

Dans cette étude, nous pouvons observer un effet de type contraceptif se traduisant par une augmentation statistiquement significative du taux de non implantation. De plus, cette baisse de l'implantation est proportionnelle à la dose et semble optimale aux doses de 50 et 100 mg/kg/jour. Il est à remarquer qu'en utilisant le test de U Mann Whitney (test qui tient compte de la dispersion des résultats), seule la dose de 100 mg/kg/jour donne un taux de non implantations statistiquement significatif. Par contre, le test de Student met en évidence des effets aux doses de 50 et 100 mg/kg/jour.

Ces nouveaux résultats différents de ceux de la première étude peuvent être attribués à plusieurs raisons :

Tout d'abord, les animaux mâles ont été traités avant accouplement dans la première étude et non dans la seconde. Ensuite, les femelles ont été traitées pendant 14 jours avant l'accouplement dans la première étude et non dans la seconde. Enfin, le faible nombre d'animaux traités dans la première étude (10 femelles) peut expliquer l'absence de différence significative en ce qui concerne le taux de non implantations mais en aucun cas l'augmentation de résorptions précoces.

Ces différences de protocole au niveau du traitement pourraient expliquer les mortalités précoces de la première étude qui résulteraient d'un effet léthal dominant lié aux gamètes mâles ou d'un effet toxique au niveau du gamète femelle. Cependant, il faut rappeler que nous avons obtenu 100 p. 100 de résorptions précoces dans les 2ème et 3ème essais préliminaires de protocole identique à la deuxième étude. Cette dernière remarque nous amène à penser que ces différences de résultats seraient dus plus au produit lui-même qu'au protocole. En effet, dans ces deux études, le produit a été préparé suivant deux procédés très différents (Figure 32 p. 163).

PROCEDE DE LA 1ère ETUDE

PROCEDE DE LA 2ème ETUDE

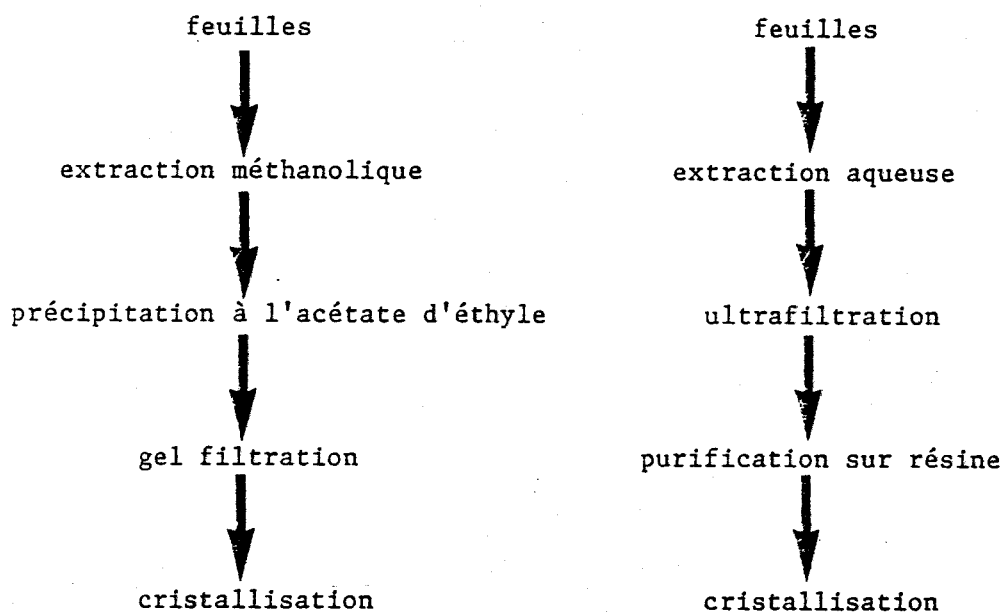


FIGURE 32 : Différents procédés de préparation du stévioloside



Le premier procédé ne permet pas d'éliminer le stéviol que nous avons mis en évidence dans les feuilles. Cette hypothèse devra cependant être vérifiée, soit en refaisant une étude avec du stéviol provenant de l'ancien protocole, soit en faisant une nouvelle étude avec du stéviol et montrer que celui-ci est responsable des résorptions précoces. Cependant, la mise en évidence du fait que le stéviol est responsable des résorptions précoces et non de la non implantation des foetus tendrait à prouver que ce serait le stéviolbioside ou le stéviolbioside ou une autre molécule de dégradation qui serait responsable de ce phénomène.

### C - PRODUIT AJOUTE A L'EAU DE BOISSON

Dans les études précédentes, le produit était administré par gavage en une seule fois. Cette méthode a l'inconvénient de ne pas être proche des conditions normales d'emploi et de provoquer un pic intensif pendant un instant très court. Afin de compléter ces études, il était donc nécessaire d'étudier l'action du stéviolbioside mélangé à l'eau de boisson. Pour cette étude, nous avons repris le protocole de la première étude avec des doses de 10, 50 et 250 mg/kg/jour.

#### 1) CONSOMMATION DE STEVIOSIDE

Les consommations de stéviolbioside chez les animaux mâles et femelles sont rapportées dans le tableau LIV p. 165. A partir de la date d'accouplement, les animaux mâles et femelles ont reçu la même solution que celle administrée pendant la période qui a précédé la période d'accouplement. A l'exception de la première semaine où des problèmes d'adaptation de goût se sont apparemment posés, les animaux traités par les 2 doses les plus faibles ont reçu des doses voisines des doses théoriques. Par contre, à la plus forte dose, des problèmes de goût se sont semblé-t-i. posés plus longtemps, ce qui a conduit à des ajustements plus importants et à des variations plus grandes des consommations par rapport aux consommations théoriques.

#### 2) OBSERVATION DES ANIMAUX, EVOLUTION PONDERALE

Les animaux traités ont présenté un comportement normal pendant toute la durée du traitement (Tableau LV p. 166).

TABLEAU LIV : Consommation réelle de stéviolside

CONCENTRATION THEORIQUE DE STEVIOSIDE		10 mg/kg/jour		50 mg/kg/jour		250 mg/kg/jour	
		Volume ml/kg/j	Dose mg/kg/j	Volume ml/kg/j	Dose mg/kg/j	Volume ml/kg/j	Dose mg/kg/j
SEXE	DATE						
Mâle	5/3 au 12/3	7,2	9,9	7,2	49,2	6,2	213,3
Mâle	12/3 au 19/3	8,4	11,7	9,4	66,3	9,7	397,7
Mâle	19/3 au 26/3	8,1	9,5	8,6	49,3	8,7	250,6
Mâle	26/3 au 2/4	7	8,1	7,1	40,6	6,7	191,6
Mâle	2/4 au 9/4	8,1	11,1	7,9	55,2	7,9	293,2
Mâle	9/4 au 16/4	8,3	9,3	8,2	51,1	7,4	234,2
Mâle	16/4 au 24/4	7,1	7,9	8,9	55,1	7,9	274,2
Mâle	24/4 au 30/4	7,7	10,3	8,2	44,7	8,4	258,6
Femelle	18/4 au 26/4	4,4	5,5	5,3	36,3	4,9	171,3
Femelle	26/4 au 3/5	4,6	10,7	4,7	42,9	4,6	233,3



TABLEAU LV : Etude de l'interférence du stéviolose sur les fonctions de reproduction chez la souris

Tableau récapitulatif des résultats

PRODUIT ETUDIE	POIDS CORPOREL DES MERES					POIDS INDIVIDUELS FOETUS VIVANTS en mg	1 FOETUS VIVANTS	2 RESORPTIONS TARDIVES	3 RESORPTIONS PRECOCES	4 IMPLAN- TATIONS	5 CORPS JAUNES	6 DECIDUOME 4-(1+2+3)	7 NON IMPLANTATIONS 5 - 4	8 IMPLANTS MORTS 2 + 3 + 6
	18/4	26/4	3/5	J0	J13									
Eau distillée (témoin - 0)	30,25	31,05	31,75	30,76	42,43	224,51	8,93	0,20	2,07	11,20	11,50	0,13	0,93	2,33
Stéviolose 10 mg/kg	30,55	31	31,45	30,29	40,23	220,81	5,6	0,27	1,13	6,73	10,73	0	4*	1,4
Stéviolose 50 mg/kg	29,61	31,45	31,2	29,64	39,9	207,04	7,33	0,33	1,83	9,08	12,08	0	3,08*	2,17
Stéviolose 250 mg/kg	30,25	31,55	31,8	30,44	44,38	247,79	9,81	0,19	0,75	10,94	13,5	0,25	2,625*	1,19

\* Différence statistiquement significative au seuil de  $p < 0,05$



L'évolution pondérale des animaux traités a été identique à celle des témoins. Il est à noter que le poids des animaux non gravides n'a pas été pris en compte dans le calcul.

3) CRITERES DE FERTILITE (Tableau LV p. 166)

a - *Nombre de femelles gravides* (Tableau LVI p. 168)

Aucune modification significative du nombre de femelles gravides n'a été mise en évidence. Toutefois, on note une augmentation statistiquement significative du nombre de femelles présentant un bouchon vaginal positif et n'étant pas gravides, à la dose de 10 mg/kg/J. La plupart de ces animaux possédaient des corps jaunes sans présenter d'implantation. Il semble que cette observation puisse être attribuée à un effet type anticonceptionnel.

b - *Nombre de corps jaunes*

Aucune variation statistiquement significative du nombre de corps jaunes n'a été mise en évidence.

c - *Nombre de foetus vivants*

Aucune différence statistiquement significative du nombre de foetus vivants n'a été mise en évidence.

d - *Pesée des foetus vivants*

Aucune différence statistiquement significative du poids des foetus vivants n'a été mise en évidence.

e - *Nombre de foetus morts tardivement*

Aucune différence statistiquement significative du nombre de foetus morts tardivement n'a été mise en évidence.

f - *Nombre de foetus morts précocement*

Aucune différence statistiquement significative du nombre de foetus morts précocement n'a été mise en évidence.

g - *Nombre de déciduomes*

Aucune différence statistiquement significative du nombre de déciduomes n'a été mise en évidence.

TABLEAU LVI : Paramètres de gravidité des animaux traités par le stéviolside

		NOMBRE DE FEMELLES B.V. (+)	NOMBRE DE FEMELLES GRAVIDES	NOMBRE DE FEMELLES B.V. (+) SANS CORPS JAUNES	NOMBRE DE FEMELLES B.V. (+) NON GRAVIDES	NOMBRE DE FEMELLES AVEC CORPS JAUNES SANS FOETUS
Témoin		17	14	2	2	1
Stéviolside 10 mg/kg/j	n $\chi^2$ p	14 1,29 N.S.	9 2,56 N.S.	3 0,53 N.S.	7 5,44 < 0,02	6 6,0 < 0,02
Stéviolside 50 mg/kg/j	n $\chi^2$ p	14 1,29 N.S.	10 1,67 N.S.	3 0,53 N.S.	4 1,39 N.S.	2 0,62 N.S.
Stéviolside 250 mg/kg/j	n $\chi^2$ p	16 0,17 N.S.	13 0,11 N.S.	1 0,30 N.S.	3 0,31 N.S.	2 0,44 N.S.

N.S. : non statistiquement significatif au seuil de  $p < 0,05$

B.V. (+) : bouchon vaginal positif





*h - Taux de non implantations*

Une augmentation statistiquement significative du taux de non implantation a été mise en évidence aux 3 doses étudiées. Toutefois, cet effet n'est pas proportionnel à la dose et il n'existe aucune différence statistiquement significative entre les 3 doses étudiées.

*i - Total des implants morts*

Aucune différence statistiquement significative du nombre d'implants morts n'a été mis en évidence.

4) CONCLUSION

L'administration de stéviósíde dans l'eau de boisson chez la souris mâle pendant 60 jours avant la conception et chez la souris femelle pendant 14 jours avant la conception a permis de mettre en évidence une augmentation du taux de non implantation. Cet effet est sensiblement identique pour les 3 doses étudiées. Par ailleurs, une augmentation du nombre de femelles fertilisées et non gravides ou n'ayant pas conduit une gestation à terme a été notée. Cet effet, observé comme étant statistiquement significatif à la plus faible dose (10 mg/kg) est en faveur de propriétés de type anticonceptionnel du stéviósíde.

Si on compare ce résultat à celui des 2 études précédentes, on voit que, lors de la première étude, on avait noté une augmentation du nombre de résorptions précoces ; par contre, dans l'étude suivante et dans la présente, on note une augmentation statistiquement significative du taux de non implantation. Ces derniers résultats sont en faveur d'un effet de type anticonceptionnel.

Sur le plan quantitatif, on s'aperçoit que précédemment la dose de 12,5 mg/kg ne provoque qu'un léger effet alors que dans la dernière étude, la dose de 10 mg/kg met en évidence un effet nettement statistiquement significatif. Plusieurs différences apparaissent entre ces deux études.

- le traitement des mâles avant l'accouplement : cependant si telle était la cause, on aurait dû noter également une baisse du nombre de femelles présentant des corps jaunes par effet antifertilisant, ce qui n'est pas le cas ;

- le traitement des femelles avant l'accouplement : un phénomène d'accumulation peut être envisagé et ainsi provoquer des effets équivalents à une forte dose. En effet, dans cette hypothèse, on peut considérer qu'une dose de 10 mg/kg donnée pendant 14 jours équivaut à une dose unique de 140 mg/kg. Il faut cependant tenir compte d'un autre facteur : le mode d'alimentation.

- par opposition au gavage, le traitement par apport dans l'eau de boisson entretient une imprégnation constante des animaux et peut augmenter ainsi les effets du stéviolside à faibles doses.

#### D - CONCLUSIONS TOXICOLOGIQUES

Quelles que soient les doses employées, nos travaux permettent de confirmer un effet du stéviolside sur les fonctions de reproduction. Ces premiers résultats pourtant différents de ceux de PLANAS (cf § III-A-3 p. 67) mettent donc déjà en doute l'innocuité du stéviolside. Par ailleurs, la confirmation de l'hydrolyse in vivo du stéviolside demande d'autres travaux spécifiques au stéviol. Ils permettraient d'une part de déterminer si le stéviol est responsable des effets observés sur les fonctions de reproduction et d'autre part de vérifier les pouvoirs mutagènes déjà décrits.

En résumé, nos travaux ne représentent qu'une faible partie des études nécessaires pour la constitution d'un dossier toxicologique complet. En effet, seul le segment 1 des études sur les fonctions de reproduction peut être considéré comme acquis. Il reste encore à étudier le segment 2 (études des risques de tératogénèse), le segment 3 (études de toxicité péri et post-natal) mais également l'ensemble des épreuves de toxicité aiguë, subaiguë, chronique et les effets mutagènes et cancérigènes.

#### IV - FAISABILITÉ DU PROJET

##### A - FAISABILITE INDUSTRIELLE

Les résultats du chapitre II p. 108-136, démontrent qu'au niveau laboratoire, nous possédons un procédé d'extraction qui permet de préparer du stéviolside et du rébaudioside purs. Cependant, au niveau industriel, seule la préparation du stéviolside est envisageable pour l'instant. En effet, à l'heure actuelle, nous ne connaissons pas de méthode industrialisable permettant de récupérer le rébaudioside des eaux-mères de cristallisation. Cette perte non négligeable en édulcorant nous incite à envisager l'utilisation d'un mélange de molécules sucrantes obtenues directement par chromatographie sur Amberlite IRA-94 S. Le mélange à 50 p. 100 de stéviolside et 25 p. 100 de rébaudioside devra répondre à certaines exigences :

- une saveur sucrée sans arrière goût ;
- une bonne solubilité ;
- une bonne stabilité ;
- une innocuité totale.

La présence de rébaudioside devrait améliorer la saveur sucrée, la solubilité et la stabilité du produit. Cependant, en ce qui concerne l'innocuité du mélange, il sera nécessaire de refaire la totalité des études toxicologiques. De plus, il sera indispensable de s'assurer au niveau de la production, de la standardisation, de la composition et de la qualité du mélange commercialisé.

Les techniques utilisées dans notre procédé de purification sont déjà très largement employées dans les industries chimiques et agro-alimentaires. Ainsi, en dehors des problèmes d'approvisionnement et de qualité des matières premières, le facteur limitant de notre "process" est certainement la durée totale des étapes.

Les résultats de l'extraction et de la centrifugation sont facilement extrapolables. Par contre, l'ultrafiltration et la séparation sur résine demandent des études plus poussées afin de déterminer le meilleur rapport surface membranaire ou volume de résine sur volume à traiter.

Ces étapes représentent une part importante du temps de purification et demandent donc des installations en accord avec la quantité de produit à fabriquer. Enfin, si d'après nos travaux, les problèmes d'industrialisation semblent surmontables, il n'en est pas de même au niveau du dossier toxicologique. En effet, étant donné nos résultats toxicologiques et les travaux étrangers montrant que le stéviol entraîne des effets mutagènes, l'avenir immédiat du stéviol en tant qu'édulcorant pour les industries agro-alimentaires semble fort compromis. A ce stade du projet, seule une nouvelle recherche fondamentale peut permettre de résoudre un certain nombre de ces problèmes.

#### B - FAISABILITE SCIENTIFIQUE

Dans un premier temps, il serait intéressant d'analyser les propriétés physiologiques, pharmacocinétiques et toxicocinétiques du stéviol. En effet, l'hydrolyse in vivo du stéviol peut être responsable de nos problèmes sur les fonctions de reproduction. Ainsi, d'après le résultat de ces études, et afin d'éviter l'apparition de stéviol, nous pourrions ensuite envisager la transformation de la molécule de stéviol en une molécule plus stable sans en modifier les propriétés sucrantes. Il est à noter que ce type de travaux (transformation chimique) a déjà été réalisé et breveté par DUBOIS, travaillant pour SEARLE aux Etats-Unis. Nous pouvons penser que d'autres essais (chimiques, clonage, mutation dirigée...) peuvent certainement donner d'excellents résultats. Cependant, ce type de transformation ferait perdre au stéviol son "étiquette" produit naturel qui peut avoir un impact au niveau marketing.

#### C - FAISABILITE ECONOMIQUE

Quelles que soient les propriétés de notre produit, le coût de production du produit final est un élément déterminant dans la réussite d'un tel projet. Aussi, étant donné la concurrence dans le domaine des édulcorants, il est nécessaire de bien définir son marché ainsi que le produit que l'on veut commercialiser.

Ainsi le choix du marché pharmaceutique et/ou alimentaire détermine :

- le volume de production ;
- l'investissement des installations de production ;
- la qualité du produit final.

Une approche du coût de production montre que le coût de culture, de collecte et de séchage des feuilles ne devrait pas dépasser 30 p. 100 du prix de revient objectif (290 F/kg). Les autres matières, l'énergie (extraction et concentration) et les frais d'extraction et de purification doivent donc être inférieurs à 200 F/kg. Ces prix nécessitent une production à grande échelle de l'ordre de 100 tonnes/an (cf marché japonais, Tableau X p. 43) soit 300 kg/jour. Cet objectif nécessite donc la commercialisation de l'édulcorant au niveau international mais aussi au niveau alimentaire (boissons diététiques).

Une telle production demande le traitement de 6 tonnes de feuilles par jour soit 250 m<sup>3</sup> d'extrait aqueux soit approximativement : une cuve d'extraction de 50 m<sup>3</sup>, une batterie de centrifugeuse en continu, une unité d'ultrafiltration de 300 m<sup>2</sup>, une unité d'osmose inverse de 800 m<sup>2</sup>, de 23 m<sup>3</sup> de résine Amberlite IRA 94 S et enfin de 2 m<sup>3</sup> de résine XAD<sub>2</sub>. L'investissement pour une telle installation serait compris entre 100 et 150 millions de francs.

Cependant, quel que soit le marché envisagé et la composition du produit, la commercialisation d'un édulcorant demande la constitution d'un dossier toxicologique (cf p. 30-35). Le coût d'une telle étude est d'environ 10 millions de francs répartis de la façon suivante :

- Toxicité aiguë :	70.000
- Toxicité subaiguë : Rat :	400.000
non rongeur :	600.000
- Reproduction : Segment 1 :	100.000
Segment 2 :	400.000
Segment 3 (multigénération) :	2.000.000
- Cancérogénèse Rat Souris :	5.000.000
- Mutagénèse :	150.000
- Pharmacocinétique et métabolisme :	1.000.000

Si cet investissement est très important, il faut en plus prendre en compte d'une part, la durée des expertises qui peuvent se dérouler sur plusieurs années et d'autre part, le risque que le produit étudié soit refusé par les Commissions d'Experts (F.D.A., C.S.H.P.).

La rentabilisation de tels investissements devrait être difficile. En effet, aucune protection de marché n'est envisageable car, les molécules de stéviolside et de rébaudioside découvertes depuis 1931, ne sont plus brevetables. Enfin, il est à souligner que la prise de brevet d'un procédé de purification représente généralement une protection dérisoire face à toutes les possibilités de copiages.

En résumé, étant donné qu'aucune protection ne peut être envisagée pour la molécule de stéviolside, toutes les études toxicologiques, à la charge de l'industriel, pourront être utilisées par n'importe quel autre concurrent. En effet, celui-ci n'aura qu'à démontrer que son produit est identique au produit analysé. L'industriel, promoteur de l'idée ne pourra que difficilement rentabiliser ses investissements dus à la recherche et aux études toxicologiques. Il sera immédiatement concurrencé par des produits moins chers venant par exemple du Japon.

En dehors de ces problèmes financiers, il ne faut pas négliger les aspects législatifs qui sont encore loin d'être résolus (cf p. 21-27) et créent un problème supplémentaire à l'industriel désireux de commercialiser rapidement le stéviolside. En effet, pour le domaine pharmaceutique, le seul facteur limitant est le dossier toxicologique, il n'en est pas de même pour le domaine alimentaire.

Enfin, il ne faut surtout pas oublier la concurrence existant sur un marché en plein développement. Tout d'abord en ce qui concerne le stéviolside, l'avance technologique des japonais est loin d'être négligeable. Avec un coût de 44 \$ le kilogramme soit 22 cents par kilogramme d'unités sucrantes, le stéviolside japonais est très compétitif sur le marché des édulcorants (Tableau LVII p. 175).

TABLEAU LVII : Coût relatif des édulcorants par unité sucrante

	Dollar/kg	Coût par unité sucrante en cent/kg
Saccharine	7,93	2,7
Cyclamate	4,96	10
Acésulfam k	50	34
Aspartame	187	93,5
Stéviolside	44	22
H.F.C.S.* 55 p. 100	0,42	42
Sirop de fructose 42 p. 100	0,22	55
Thaumatine	1652	103
Saccharose	0,6	60
Glycyrrhizine	110	220
Sorbitol 70 p. 100	0,7	140
Xylitol	6	600
Mannitol	6,6	130

Source : Biofutur Mars 1984

\* H.F.C.S. : Hight Fructose Corn Sirop



Il faut noter ensuite que malgré une expérience de plus de 10 ans (1975 : première commercialisation du stéviolside au Japon), les japonais n'ont "pas réussi" ou n'ont "pas voulu" pénétrer le marché européen et américain.

A l'heure actuelle, ce sont uniquement des grands groupes comme MONSANTO (SEARLE), HOECHST, TATE & LYLE qui se partagent le marché des édulcorants. La pénétration de l'aspartame sur le marché pharmaceutique mais surtout sur le marché alimentaire dans les "diet drinks" souligne la volonté de SEARLE de faire de l'aspartame le premier édulcorant. De même, l'acésulfam K de HOECHST attend ses autorisations de la F.D.A. pour s'attaquer à ce marché. Aussi, le stéviolside, qui n'est pas prêt technologiquement et toxicologiquement, demande encore de nombreuses études alors que ses concurrents sont en plein développement.



## CONCLUSION GENERALE

Les travaux que nous avons effectués sur les édulcorants isolés de *Stevia Rebaudiana Bertoni* nous permettent :

1 - de démontrer qu'il est possible d'obtenir du stéviol pur à 97 p. 100 au niveau industriel par un procédé de purification comprenant 7 étapes différentes : le rendement du procédé est de l'ordre de 5,5 p. 100 en stéviol. Les résultats que nous avons obtenus concernent du matériel végétal que nous n'étions pas en mesure de contrôler. IL est bien évident que des conditions de culture parfaitement définies (saison, hauteur et nombre de coupes) permettraient d'envisager des rendements supérieurs. La sélection de clones riches en stéviol permettrait aussi d'améliorer les rendements.

2 - de doser à la fois le stéviol, le rébaudioside et le stéviol ; la mise au point de techniques de dosage (C.C.M., H.P.L.C. ou G.L.C.) permet de contrôler la pureté des édulcorants à chaque étape de purification. Elles nous ont permis de caractériser l'existence de stéviol libre dans les feuilles de *Stevia Rebaudiana Bertoni*, comme elles nous ont permis de mettre en évidence un gradient apico-basal de stéviol et de rébaudioside dans la plante. On ne peut savoir pour le moment s'il s'agit d'une disparition du stéviol dans les feuilles âgées ou s'il s'agit d'un stockage de l'édulcorant sous une forme que nous n'avons pas su doser.

3 - de conclure que le stéviol est hydrolysé par la flore caecale que ce soit in vitro ou in vivo en stéviol. Nous avons remarqué que le rébaudioside est beaucoup plus résistant à l'hydrolyse que le stéviol, en vertu semble-t-il de l'existence d'une liaison  $\beta$ 1-3 glucosidique. Cette observation ouvre un nouveau champ d'investigations, à savoir la modification de la molécule de stéviol : soit par greffage de fonctions ne permettant pas la libération de stéviol, soit par modification naturelle de la molécule de stéviol en rébaudioside. Il faut noter que dans un tractus alimentaire renfermant du glucose disponible, les vitesses d'hydrolyses du stéviol ou du rébaudioside sont plus faibles.

4 - de conclure que le stéviol possède un effet sur les fonctions de reproduction de la souris. Ces effets se traduisent par une augmentation statistiquement significative du taux de non implantation des foetus quelque soit la dose utilisée. L'édulcorant possède un effet pilule anticonceptionnel qui varie en fait d'un individu à l'autre. Si à cela, on ajoute les résultats d'autres équipes de recherche qui montrent que le stéviol issu du stéviol possède un effet mutagène, il est fort peu probable que le stéviol puisse se voir autorisé en tant qu'édulcorant en agro-alimentaire.

Il apparaît nécessaire dans un premier temps d'augmenter les connaissances sur la formation du stéviol à partir du stéviol ou du rébaudioside, comme il est indispensable d'étudier plus en détail son catabolisme. En effet, il n'est pas prouvé de façon indubitable que ce soit le stéviol qui soit responsable de nos problèmes toxicologiques.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'étudier la possibilité de transformer le stéviol en rébaudioside. A ce niveau, plusieurs voies peuvent être envisagées : mécanismes de transglucosidation ou action de glucosyltransférases spécifiques. Les informations qu'on pourrait récolter à ce niveau permettrait de mieux comprendre la biosynthèse du stéviol et la finalité (s'il y en a une) de cette molécule dans la plante (intermédiaire de biosynthèse, produit de détoxification ?).

Dans un troisième temps, il serait peut être judicieux de réétudier les propriétés attribuées par la tradition populaire au *Stévia*. D'autres principes actifs, différents des édulcorants, existent certainement dans la plante.

Enfin, le problème industriel et économique sera à reconsidérer en fonction des résultats qui seront obtenus.

En conclusion, si le stéviol ne peut présentement être commercialisé en industrie agro-alimentaire en raison de fortes suspicions toxicologiques, la recherche fondamentale devrait permettre dans un avenir relativement proche de statuer définitivement sur les propriétés du stéviol en tant qu'édulcorant.

## BIBLIOGRAPHIE

Références

- AHMED M.S., DOBBERSTEIN R.H., FARNSWORTH, N.R. (1980) 49  
J. Chromatogr., 192, 387-393
- AHMED M.S., DOBBERSTEIN R.H. (1982) 50  
J. Chromatogr., 236, 523-526
- AHMED M.S., DOBBERSTEIN R.H. (1982) 51  
J. Chromatogr., 245, 373-376
- AKASHI H., YOKOYAMA Y. (1975) 85  
The Food Industry (Shokukin Kogyo) 18, 20, 34-43
- ALLEN M.J., BOYLAND E., DUKES L.E., HORNING E.S., WATSON J.G. (1952) 17  
Brit. J. Cancer, 2, 212-228
- AMARAL G., VARELA F., DOMINGOS A. (1976) 78  
Cienca e cultura, 29, 599-601
- AMES B.N. 107  
Mutat. Res., 31, 347-364
- BEARDER J.R., McMILLAN J., WELS, C.M. (1975) 73  
Phytochemistry, 14, 1741-1748
- BRACHT A.K., ALVAREZ M., BRACHT A. (1985) 82  
Biochemical Pharmacology, 34, 6, 873-882
- BRANTOM P.G., GAUNT I.P., GRASSO P. (1973) 23  
Food. Cosmet. Toxicol., 2, 735-746
- BRIDEL M., LAVIEILLE R. (1931) 34  
Bull. Soc. Chim. Biol., 13, 636-655
- BRIDEL M., LAVIEILLE R. (1931) 43  
Bull. Soc. Chim. Biol., 13, 781-796
- BRYAN G.I., ERTURKE E., YOSHIBA O. (1970) 18  
Science, 16, 1238-1240
- BRYAN G.T., ERTURKE E. (1970) 21  
Science, 167, 996-998
- CHANG S.S., COOK J.M. (1983) 68  
J. Agr. Food. Chem., 31, 409-412
- COMPADRE C.M., PEZZUTO J.M., KINGHORN A.D., KAMATH S.K. (1985) 11  
Science, 227, 417-419
- DICK C., SCHNIERP M.L., SONDEERS R.C. (1974) 24  
Mutat. Res., 26, 199-203
- DIETERICH K. (1909) 37  
Pharm. Zentralh., 50, 435-462

- DORFMAN R.I., NES W.R. (1960) 97  
Endocrinology, 67, 282-285
- DUBOIS G.E., CROSBY G.A., SAFFRON P. (1977) 10  
Science, 195, 397-399
- DUBOIS G.E., DIETRICH P.S., LEE J.F., MCGARRAUGH G.V.,  
STEPHENSON R.A. (1981) 61  
J. Med. Chem., 24, 1969-1971
- DUBOIS G.E. (Jun. 1, 1982) 62  
Brevet, n° 4,332,830. Int. Cl. A23L 1/236
- DUBOIS G.E. (Apr. 26, 1983) 63  
Brevet, n° 4,381,402. Int. Cl. C07C 69/753 ; C07C 69/74
- DUBOIS G.E. (Sept. 6, 1983) 64  
Brevet, n° 4,402,990. Int. Cl. C07H 15/24 ; A23L 1/236
- DUBOIS G.E., BUNES L.A., DIETRICH P.S., STEPHENSON R.A. (1984) 60  
J. Agr. Food. Chem., 32, 6, 1321-1325
- DUBOIS G.E., STEPHENSON, R.A. (1985) 65  
J. Med. Chem., 28, 1, 93-98
- DUMAS P., SAUVAGEOT F. (1980) 14  
Ann. Nutr. Alim., 34, 121-136
- ERSHOFF B.H. (1977) 26  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 154, 65-68
- ESAKI S., TANAKA R., KAMIYA S. (1984) 59  
Agric. Biol. Chem., 48, 7, 1831-1834
- FAURION A., SALTO S., MacLEOD P. (1980)  
Chemical senses, 5, 2, 107-121
- FERRANDO R. (1981) 28  
Ann. Fals. Exp. Ch. Tox., 74, 796, 285-291
- FONDU M. (1976) 31  
Agricultura, 24, 213
- FRANK G., ZUBER H. (1976) 8  
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 585-592
- FUJITA H., EDAHIRO T. (1979) 67  
Shokukin Kogyo, 22, 20
- GIANFAGNA T., ZEEVAART J.A.D., LUSK W.J. (1983) 75  
Phytochemistry, 22, 427-430
- HAGIWARA A., FUKUSHIMA S., KITAORI M., SHIBATA M., ITO N. (1984) 89  
Gann, 75, 763-768
- HANSON J.R., WHITE A.F. (1968) 72  
Phytochemistry, 7, 595-597

- HARDY J., GAUNT I.F., HOOSON I., HENDY R.J., BUTTER WORTH K.R. (1976) 25  
Food. Cosmet. Toxicol., 14, 269-276
- HASHIMOTO Y., MORIYASU M., NAKAMURA S., ISHIGURO S., KOMURO M. (1978) 52  
J. Chromatogr., 161, 403-405
- HERAUD G. (1981) 15  
Ann. Fals. Exp. Ch. Tox., 74, 802, 605-612
- HERAUD G. (1985) 3  
Med. et Nut., T. XXI, 4, 247-256
- HODGE J.E., INGLET T. E.G. (1974) 66  
Symposium Sweeteners : The Avi Publishing Co., Westport Connecticut, 216-234
- HOROWITZ R.M., GENTILI B. (1974) 9  
Symposium Sweeteners : The Avi Publishing Co., Westport Connecticut, 182-193
- ISHIDATE M., YOSHIKAWA K. (1980) 93  
Arch. Toxicol. Suppl., 4, 41-44
- ISHIDATE M., SOFUNI T., YOSHIKAWA K. (1981) 94  
Gann, 27, 95-108
- ISHIMA T., KATAYAMA O., YOKOYAMA Y. (1978) 57  
Fifth International Congress of Food Science and Technology, Held at Kyoto, p. 158
- JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE FRANCAISE (15 sept. 1980) 33  
Circulaire du 8 août 1980
- KAMERLING J.P., GERWIG G.J., Vliegenthart J.F.G., CLAMPS J.R. (1975) 104  
Bioch. J., 151, 491-495
- KAMIYA S., KONISHI F., ESAKI S. (1979) 58  
Agric. Biol. Chem., 43, 9, 1863-1867
- KANEDA N., KASAI R., YAMASAKI K., TANAKA O. (1977) 56  
Chem. Pharm. Bull., 25, 9, 2466-2467
- KERR W.E., MELLO M.L.S., BONADIO E. (1983) 96  
Rev. Brasil Genet., VI, 1, 173-176
- KHAN R. (1980) 12  
Sucrierie Française, 43-45
- KIER L. (1972) 5  
J. Pharm. Sci., 61 n° 9, 1394-1397
- KINGHORN A.D., NANAYAKKARA N.P.D., SOEJARTO D.D., MEDON P.J. KAMATH S. (1982) 54  
J. Chromatogr., 237, 478-483

- KOBAYASHI M., HORIKAWA S., DEGRANDI I.H., VENO J.,  
MITSUHASHI M. (1977) 42  
Phytochemistry, 16, 1405-1408
- KODHA H., KASAI R., YAMAZAKI K., MURAKAMI K., TANAKA O. (1976) 40  
Phytochemistry, 15, 981-983
- KOMAI K., IWAMURA J.I. (1983) 71  
J. Pest. Sci., 8, 445-450
- KURAHASHI H., YAMAGUCHI Y., TSUZUKI S., MAHASHI H. (1982) 87  
Matsumoto Shigaku, 8, 1, 56-62 (Ch. Ab. 97 : 214437 z)
- LAYOUS. (1983) 105  
Mémoire de D.E.A, Lille
- LEE S.J., LEE K.R., PARK I.R., KIM K.S., TCHAI B.S. (1979) 86  
Hanguk Sikpum Kwahakhoe Khi (Corée), 11, 4, 224-231  
(Ch. Ab. 92 : 127080/t)
- MAKAPUGAY H.C., NANAYAKKARA N.P.D., KINGHORN A.D. (1984) 53  
J. Chromatogr., 283, 390-395
- MAUMEE (1963) 20  
Chem. Eng. News, 41, 76-78
- METIVIER J., VIANA A.M. (1979) 46  
J. Exp. Bot., 30, 117, 805-810
- MITSUHASHI H., UENO J., SUMITA T. (1975) 48  
Yakugaku Zasshi, 95, 1, 127-130
- MITSUHASHI H. (1981) 84  
Tama Biochemical Co. Ltd
- MORI N., SAKANOUÉ M., TAKEUCHI M., SHIMPO K., TANABE T. (1981) 91  
J. Food. Hyg. Soc. Japan, 22, 5, 409-414
- MORRISON A.S., BURINGS J.E. (1980) 19  
New England J. Med., 302, 537-539
- MOSETTIG E., BEGLINGER U., DOLDER F., LICHTI H., QUITT P.,  
WATERS J.A. (1963) 44  
Am. Chem. Soc., 85, 2305-2309
- MOSTARDI R.A., KELLER R., KOO R. (1972) 22  
Ohio J. Sci., 72, 313-318
- MUROFUSHI N., SHIGEMATSU Y., NAGURA S., TAKAMASHI N. (1982) 74  
Agric. Biol. Chem., 46, 2305-2311
- OKAMOTO H., YOSHIDA D., MIZUSAKI S. (1983) 101  
Cancer Letters, 19, 47-53
- OKAMOTO H., YOSHIDA D., SAITO Y., MIZUZAKI S. (1983) 102  
Cancer Letters, 21, 29-35
- OKUMURA M., FUJITA Y., IMAMURA M., AIKAWA K. (1978) 95  
Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 19, 5, 486-490  
(Chem. Abs. 90 : 166658/d)

- OLNEY J. (1981) 32  
Science, 213, 986-987
- OVIEDO M. (1966) 80  
Revista Medica Del Paraguay, VII, 5 et 6, 1-2
- PANGBORN R.M. (1974) 1  
Symposium Sweeteners : The Avi Publishing Co., Westport, 23-44
- PEZZUTO J.M., COMPADRE C.M., SWANSON S.M., NANAYAKKARA N.P.D., KINGHORN A.D. (1985) 100  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 2478-2482
- PLANAS G.M., KUE J. (1968) 90  
Science, 162, 1007
- PRICE J.M., BIAVA C.G., OSER B.I., VOGIN E.E., STEINFELD J. LEVY H.L. (1970) 16  
Science, 167, 1130-1138
- RANNEY R.E., OPPERMANN J.A., MULDOON E., McMAHON F.G. (1976) 30  
J. Toxicol. Env. Health., 2, 441-451
- RASENACK P. (1908) 36  
Arbeiten aus dem Kairserlichen gesundreitzamti, 28, 420-443
- REBAUDI O. (1900) 35  
Revista de Quimica y Farmacia n° 2, 3, 4
- REMSEN I., FAHLBERG C. (1879) 13  
Amer. Chem. J., 1, 426-438
- ROQUE J. (1984) 103  
Biofutur, Mars, 19-31
- RUDDAT M., LANG A., MOSETTIG E. (1963) 69  
Naturwissenschaften, 50, 23
- SAKAMOTO I., KOHDA H., MURAKAMI K., TANAKA O. (1975) 47  
Yakugaku Zasshi, 95, 12, 1507-1510
- SAKAMOTO I., YAMAZAKI K., TANAKA O. (1977) 41  
Chem. Pharm. Bull., 25, 844-846
- SALVATORE G., STAMMATI-PAGANUZZI A., SILANE V., DRACOS-AURELINI A. (1983) 55  
Chemica Fine, Chimicaoggi, Novembre, 31-37
- SCHIFFMAN S.S., LINDLEY M.G., CLARK T.B., MAHINO C. (1981) 6  
Neurobiology of Aging, 2, 173-185
- SCHMELLING G.A.V. (1977) 76  
Cienca e cultura, 29, 5, 599-601
- SCHVARTZMAN J.B., KRIMER D.B., AZORERO R.M. (1977) 92  
Experientia 33, 5, 663-665
- SHALLENBERGER R.S., ACREE T.E. (1969) 4  
J. Agr. Food. Chem., 17, 4, 701-703



- SOEJARTO D.D., COMPADRE C.M., MEDON P.J., KAMATU S.K.,  
KINGMORN A.D. (1982) 79  
Economic Botany, 37, 71-79
- TAMA BIOCHEMICAL Co., Ltd (1984) 88  
7-1 Nishishinjuku 2chome Shinjuku-ku, TOKYO, Japon 160
- TUCHMANN-DUPLESSIS H., MERCIER-PAROT L. (1970) 27  
Therapie 25, 915-928
- USAMI M., SEINO Y., TAKAI J., NAKAHARA H., SEINO S.,  
IKEDA M., IMURA M. (1980) 81  
Horm. Metab. Res., 12, 705-706
- VALIO I.F.M., ROCHA R.F. (1976) 70  
Pflanzenphysiol., 78, 90-94
- VAN DER WEL H., LOEVE K. (1972) 7  
Eur. J. Biochem., 31, 221-225
- VIGNAIS P.V., DUEE E.D., VIGNAIS P.M., HUET J. (1966) 98  
Biochim. Biophys. Acta, 118, 465-483
- VIS E., FLETCHER H.G. (1956) 39  
J. Amer. Chem. Soc., 78, 4709-4710
- WINGARD R.E., BROWN J.P., ENDERLIN F.E., DALE J.A., HALE R.L.,  
SEITZ C.T. (1980) 77  
Experientia, 36, 519-520
- WOLF E. (1978) 29  
Heath and Sugar Substitutes. Proc. Ergob. Conf., 153-158
- WOOD H.B., ALLERTON R., DIEHL H.W., FLETCHER H.G. (1955) 38  
Org. Chem., 20, 875-881
- XU W., MENG L., LI. Z. (1982) 45  
Linchan Huaxue Yu Gongye, 2, 38  
(Chem. Abst. 97 : 214442/x)
- YAKU M., TAKASE M., TODA K., TANIMOTO K., YASUTAKE A.,  
IWAMOTO Y. (1977) 83  
Hiroshima Skigaku Zasshi, 2, 12-17
- YAMAMOTO N.S., BRACHT A.M.K., ISHII E.L., KEMMELMEIER F.S.,  
ALVAREZ M., BRACHT A. (1985) 99  
Experientia 41, 55-57
- ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C., VINCENDON G. (1972) 103  
J. Chromatogr., 69, 291-304