



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Maisons-Alfort, le 12 octobre 2007

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à une autorisation provisoire, pour une durée de deux ans,
d'emploi de stéviol, extraits de *Stevia rebaudiana*, en tant qu'édulcorant
en alimentation humaine dans le cadre de l'article 5 de la directive
89/107/CEE.**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 3 août 2006 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à une autorisation provisoire, pour une durée de deux ans, d'emploi de stéviol, extraits de *Stevia rebaudiana*, en tant qu'édulcorant en alimentation humaine dans le cadre de l'article 5 de la directive 89/107/CEE, adressée par le bureau C2.

Un examen préliminaire du dossier le 12 décembre 2006 a identifié des données manquantes. Après une première demande de l'Afssa des éléments complémentaires au dossier initial ont été reçus en février 2007. A la suite de l'examen de ces éléments complémentaires, l'Afssa a considéré le 25 juin 2007 qu'il manquait encore des éléments d'information indispensables pour mener à bien l'évaluation du dossier. Après une deuxième demande de l'Afssa, des nouveaux éléments d'information ont été reçus le 17 juillet 2007.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », réuni le 5 décembre 2006 et les 10 mai et 13 septembre 2007, l'Afssa rend l'avis suivant :

Sous l'angle administratif

La demande est formulée en application de la Directive 89/107/CEE, article 5, qui prévoit, qu'un Etat membre peut autoriser sur son territoire, à titre provisoire, le commerce et l'emploi d'un additif appartenant à une des catégories énumérées à l'annexe I et non prévu dans la liste dont il s'agit, pour autant que les conditions suivantes soient respectées: a) l'autorisation doit être limitée à une période de deux ans au plus ; b) l'État membre doit exercer un contrôle officiel sur les denrées dans lesquelles est utilisé l'additif dont l'emploi est autorisé ; c) l'État membre peut, dans le cadre de l'autorisation, imposer une indication particulière pour les denrées alimentaires ainsi fabriquées.

La présente évaluation des glycosides de stéviol a été menée à partir d'un dossier de demande constitué des résumés d'avis, notamment du JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) et certains articles fournis par le pétitionnaire. Aucun rapport spécifique d'études toxicologiques n'a été fourni dans le dossier. D'autres données publiées dans la littérature scientifique et des avis d'autres instances d'évaluation ont été recueillis et consultés par l'Afssa.

La Commission européenne a émis un avis défavorable à la mise sur le marché de la plante et des feuilles de *Stevia rebaudiana* comme aliment ou ingrédient alimentaire (2000/196/EC, JO L061, 08/03/2000, p.4), en s'appuyant sur l'avis émis par le Comité scientifique de l'alimentation humaine de la Commission européenne (CSAH) « Opinion on stevioside as a sweetener » adopté le 17 juin 1999 (CS/ADD/EDUL/167 final) dans lequel ce comité a considéré que dans l'état des connaissances, l'emploi de stéviol comme édulcorant n'était pas acceptable.

En France, en 1998, le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) a donné un avis négatif à l'utilisation de *Stevia rebaudiana* sous forme de plantes ou feuilles séchées comme nouvel additif alimentaire (BO N° 98/27).

En 2004, le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) a accordé une dose journalière admissible (DJA) de 2 mg/kg poids corporel (pc)/jour¹ et le Codex alimentarius sur les recommandations du JECFA l'a inscrit comme additif (NOSIN 960). Plus récemment en juillet 2007 le JECFA a maintenu une DJA temporaire de 2 mg/kg pc par jour pour les stéviolosides².

Sous l'angle de la composition chimique, des procédés de fabrication et de la purification du produit

Le produit commercial est une poudre avec une teneur en eau de 4% et une pureté de 95 % (g/100g de matière sèche) en glycosides de stéviol, composé de : stévioloside : 63-73 % ; rébaudioside A : 13-17 % ; rébaudioside C : 7-10 %, dulcoside A : 3-6 %. Les impuretés sont constituées des stéviolosides mineurs et autres molécules issues des feuilles de stévia (la stérobine, des flavonoïdes, des polysaccharides).

D'une manière générale, diverses variétés contiennent différentes quantités de glycosides de stéviols 'édulcorants dont la composition pourrait être fortement variable. De toutes les espèces de stévia, seule *Stevia rebaudiana* contient des glycosides de stéviol à des quantités convenant à une production économique, soit environ 14 % du poids secs des feuilles. La composition du mélange en glycosides de stéviol (qui pourrait changer avec la variété, les conditions climatiques pendant la période de croissance, la méthodologie de purification et l'extraction) dépend de la biosynthèse des différents glycosides, dont le degré de glycosylation dépend de la présence de 3 glycosyl-transférases. Les molécules des différents glycosides de stéviol ont été caractérisées.

La biosynthèse des glycosides de stéviol se fait à partir de l'acide mévalonique comme tous les isoprénoïdes. Le stéviol est glycosylé dans le réticulum endoplasmique et les glycosides de stévia se concentrent dans les chloroplastes puis dans les vacuoles. La présence de rébaudioside B et de stévioldioside dans les extraits contribuerait à la toxicité en raison de leur groupement carbonyle libre.

Le rébaudioside A est plus sucrant que le stévioloside. En effet le rébaudioside A a un pouvoir sucrant 240 fois plus élevé que le saccharose, alors qu'il est de 142 pour le stévioloside.

Le procédé de fabrication comporte une phase de broyage des feuilles, concentration, précipitation/ clarification et neutralisation de la phase liquide par de l'acide citrique, suivie d'une filtration, décoloration et adsorption sur résines.

Sous l'angle des spécifications chimiques, de la spécificité, de l'intérêt technologique, des usages proposés et de la stabilité du produit

Les glycosides de stéviol présentent une stabilité variable en fonction de la température, du temps et du pH :

A température ambiante, tous les glycosides de stéviol (stévioloside, stévioldioside, rébaudioside A, rébaudioside B, rébaudioside C, rébaudioside D, rébaudioside E et dulcoside A) sont particulièrement stables dans la gamme de pH de 2 à 10.

A 37 °C en milieu acide après plus de 3 mois, le stévioloside et le rébaudioside A ne montrent pas de dégradation.

Une étude a été réalisée à 60°C pendant une période de trois mois dans différentes conditions de pH. L'analyse des différents glycosides de stéviol réalisée par chromatographie sur couche mince

¹ Safety evaluation of certain food additives. Prepared by the Sixty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 54. Geneva 2006.

² Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Sixty-eight meeting. Geneva, 19-28 June 2007. Summary and Conclusions, issued 12 July 2007.

et par CLHP selon la périodicité suivante 1h, 3h, 6h, 24h, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 2 mois et 3 mois, a montré qu'une dégradation se produit au bout de 1 à 2 mois. Le rébaudioside A et le stéviolside sont transformés respectivement en rébaudioside B et en stévioldioside, du fait de l'hydrolyse préférentielle du groupement glucose en position 19 (R1). Cette dégradation est plus efficace aux pH extrêmes (pH<3 et pH>9).

Le stéviolside est stable entre pH 3 et pH 9 à 100°C pendant 1 heure mais les autres glycosides de stéviol s'hydrolysent à cette température en dessous d'un pH de 2.

A l'état solide, le stéviolside est stable pendant 1 heure à 120°C puis une décomposition apparaît pour des températures excédant 140°C. Dans une expérience réalisée par le pétitionnaire, sur des glycosides de stéviol purifiés, exposés à l'état solide à des températures de 185°C pendant 4 heures il a été constaté une dégradation de l'ordre de 40 % des quatre principaux glycosides de stéviol conduisant à la formation de rébaudioside B et de stévioldioside à partir respectivement du rébaudioside A et du stéviolside. Le pétitionnaire n'a pas constaté d'apparition significative de stéviol ou d'isostéviol libre au cours de ses expériences.

En conclusion, les glycosides de stéviol lorsqu'ils sont soumis à des températures élevées (supérieures ou égales à 60 °C en solution dans des conditions de pH < 3 et > 9, ou supérieures à 140 °C à l'état solide) peuvent se dégrader en rébaudioside B et stévioldioside, pouvant contribuer à la toxicité en raison de leur groupement carbonyle libre.

Sous l'angle des données métaboliques et toxicologiques

Etudes de métabolisme :

D'après les résumés du pétitionnaire, les glycosides de stéviol seraient peu absorbés au niveau intestinal et une partie est métabolisée par la flore intestinale, sous la forme de l'aglycone stéviol qui est absorbée. L'existence d'un cycle entéro-hépatique a été démontrée. Il a été montré également qu'une dégradation enzymatique existait chez l'homme. Chez l'homme, la microflore intestinale dégrade le stéviolside en stéviol et en 16,17 α -époxyde, or, le stéviol est fortement suspect d'être génotoxique in vitro avec activation métabolique.

Cependant, après administration orale unique (375 mg /personne à jeun) ou répétée (9 doses non précisées) à 8 heures d'intervalle pendant 3 jours consécutifs chez des volontaires, ni le stéviol ni son époxyde n'ont été détectés dans le sang. Seul le stéviol a été mis en évidence dans les fèces.

Etudes pharmacologiques :

Des études de pharmacologie ont mis en évidence certaines propriétés du stéviolside :

Le stéviolside a un effet vaso-dilatateur sur la crosse aortique isolée du rat par l'intermédiaire d'une inhibition du flux des ions calcium au niveau de la fibre musculaire lisse. De même, le stéviolside possède des propriétés anti-hypertensives chez le rat et le chien.

Le stéviolside et le stéviol à des concentrations comprises entre 10^{-9} et 10^{-3} mol/l stimulent la sécrétion d'insuline in vitro sur les îlots pancréatiques de souris isolés et sur les cellules β .

Le stéviolside induit des effets antihyperglycémique, insulinothrompe et glucagonostatique (suppression de la sécrétion du glucagon) chez le rat diabétique.

Le stéviolside à la concentration de 0,7 mol/l interfère de façon réversible avec les fonctions de l'épithélium tubulaire rénal isolé du lapin.

Par ailleurs, plusieurs articles dont certains fournis par le pétitionnaire, donnent les résultats d'études effectuées sur l'homme. Ces résultats indiquent que le stéviolside possède des propriétés anti-hypertensives à la dose de 250 mg consommée 3 fois par jour pendant 1 an. Le mécanisme d'action serait un effet antagoniste sur les flux Ca^{2+} .

De même, d'autres études ont montré que la poudre de feuilles de stévia séchées était en mesure d'influer sur le taux d'insuline sérique et sur la glycémie de sujets diabétiques.

Mutagenèse :

Un nombre considérable d'études de génotoxicité a été réalisé mais les résultats sont présentés uniquement sous forme d'un tableau. De nombreuses études ont donné des résultats positifs pour le stéviol et quelques uns de ses dérivés dont l'époxyde dans des systèmes in vitro, uniquement après activation métabolique.

Une série d'études in vivo effectuées avec le seul stéviol est également rapportée sous forme de tableau. Les résultats sont tous négatifs. Un renvoi en bas de page précise que l'une de ces études est inadéquate, qu'une autre est un test COMET et qu'une 3^{ème} est un test « mouse liver regeneration ». Les 4 autres sont des études de micronoyau sur cellules de moelle osseuse de souris, de rat et de hamster dont il n'est pas possible d'apprécier la valeur.

Reproduction et développement :

Les études de toxicité de la reproduction ont montré que des extraits de *S. rebaudiana* administrés dans l'eau de boisson de rats provoquaient une infertilité, se prolongeant pendant 2 mois. Plusieurs études portant sur ces extraits ont confirmé l'existence d'effets sur le système reproductif mâle : réduction de la spermatogénèse, diminution du poids des vésicules séminales, réduction de la population cellulaire au niveau des testicules (CSAH, 1999). Il convient de noter que les feuilles de *S. rebaudiana* ont été utilisées comme contraceptif par les Indiens du Paraguay (CSAH, 1999).

D'après l'analyse effectuée par le CSAH (CSAH, 1999), le stéviocide ne possède pas de propriétés embryotoxiques, ce qui n'est pas le cas du stéviol qui aux doses orales de 500 et 1000 mg/kg pc/jour administrées à des hamsters du jour 6 au jour 10 de la gestation, provoque une réduction du nombre de fœtus vivants par portée et une réduction du poids fœtal moyen. En outre, ces doses entraînent des effets indésirables dose-dépendants sur les tubes contournés rénaux des mères. La Dose Sans Effet Indésirable Observable (DSEIO) maternel et fœtal est de 250 mg/kg pc/jour.

Une étude de 1999 examinée par le JECFA en 2004 effectuée sur les rats Wistar traités par gavage à la dose de 2 ml d'extraits aqueux de *S. rebaudiana* (soit 0,67 g de feuilles séchées /ml) pendant 60 jours montre les effets toxiques suivants : réduction du poids relatif de l'épididyme, des vésicules séminales et des testicules. Ainsi qu'une réduction du taux plasmatique de testostérone et du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme. Par ailleurs, le taux de fructose dans la prostate et dans les vésicules séminales était diminué.

Etudes de cancérogenèse :

En ce qui concerne la cancérogenèse, aucun effet n'a été mis en évidence.

Conclusion

Les études effectuées sur l'animal et sur l'homme (diabétique et hypertendu) ont montré que le stéviocide possédait des propriétés pharmacologiques avérées. L'Afssa estime qu'il ne peut être exclu que ces propriétés se manifestent également chez les personnes saines.

Le JECFA, lors de sa 68^{ème} réunion en juin 2007 a maintenu une DJA temporaire de 2 mg/kg poids corporel par jour fixée en 2004, en précisant que des "résultats des études toxicologiques et cliniques en cours, et en particulier les études relatives aux effets pharmacologiques" étaient nécessaires. Le statut temporaire de la DJA établie par le JECFA démontre le besoin d'évaluer dans des études supplémentaires ce produit afin de pouvoir estimer précisément un éventuel risque sanitaire pour les consommateurs. L'Afssa ne dispose pas d'informations sur la nature des études toxicologiques en cours et aucune information n'est apportée par le pétitionnaire.

L'Afssa estime, en conclusion, que dans l'état actuel de connaissances scientifiques et sur la base du dossier de demande soumis, le risque sanitaire de l'emploi de glycosides de stéviol, extraits de *Stevia rebaudiana*, en tant qu'édulcorant en alimentation humaine ne peut pas être précisément estimé. Cette position est justifiée par les résultats des études pharmacologiques chez l'homme et l'animal qui révèlent l'existence d'effets pharmacologiques associés à la consommation de ces substances par voie orale.

L'Afssa considère, en conséquence, que la preuve de l'innocuité pour le consommateur de l'emploi de glycosides de stéviol en tant qu'édulcorant n'a pas été apportée.

Pascale BRIAND