



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Afssa – Saisine n° 2008-SA-0108

Saisine liée n° 2006-SA-0231

Maisons-Alfort, le 11 septembre 2008

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à une autorisation provisoire, pour une durée de deux ans,
d'emploi de stéviol, extrait de *Stevia rebaudiana*, en tant qu'édulcorant
en alimentation humaine dans le cadre de l'article 5 de la directive
89/107/CEE, à la suite de l'avis Afssa du 12 octobre 2007.**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 11 avril 2008 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, à la suite de l'avis Afssa du 12 octobre 2007, adressée par le bureau C2.

L'Afssa avait rendu un premier avis sur cette demande, daté du 12 octobre 2007, dans lequel il était considéré 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 pouvait pas être précisément estimé. Cette position était justifiée, notamment, par les résultats des études pharmacologiques chez l'homme et l'animal qui évoquaient l'existence d'effets pharmacologiques associés à la consommation de ces substances par voie orale. L'Afssa considérait, en conséquence, que la preuve de l'innocuité pour le consommateur de l'emploi de glycosides de stéviol en tant qu'édulcorant n'avait pas été apportée.

Des nouvelles informations ont été reçues par l'Afssa le 17 avril 2008, complétées avec des informations supplémentaires le 30 mai 2008 qui consistaient en plusieurs articles scientifiques en phase d'être publiés. Le présent avis porte uniquement sur les nouvelles informations fournies sur l'un des constituants des extraits de *Stevia rebaudiana*, le rébaudioside A. Les conclusions de cet avis doivent être rapprochées de celles rapportées dans l'avis Afssa du 12 octobre 2007.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », réuni les 12 juin et 10 juillet 2008, l'Afssa rend l'avis suivant :

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

Le produit commercial initial évalué présentait une pureté de 95 % en glycosides de stéviol (g/100g de matière sèche) composé de : stévioside : 63-73 % ; rébaudioside A : 13-17 % ; rébaudioside C : 7-10 %, dulcoside A : 3-6 %. Les impuretés étaient constituées des stéviosides mineurs et autres molécules issues des feuilles de stévia (la stérebine, des flavonoïdes, des polysaccharides). Le rébaudioside A étant le stévioside le plus sucrant.

Dans les nouvelles informations objet de la présente évaluation, le pétitionnaire précise que le nouveau produit est constitué à 96 % de matière sèche, dont 98 % de rébaudioside A.

Le procédé de fabrication décrit dans le dossier précédent comportait les phases suivantes : broyage des feuilles, concentration, précipitation/ clarification et neutralisation de la phase liquide par l'acide citrique, suivie de filtration, décoloration et adsorption sur résines. Dans le présent dossier, ni le procédé d'extraction et de purification du rébaudioside A, ni la méthodologie analytique employée pour déterminer la concentration en rébaudioside A ne sont décrits. En

conséquence, le dossier communiqué n'apporte pas d'éléments garantissant que le produit commercial proposé présente bien le degré de pureté revendiqué en rébaudioside A.

D'une manière générale, la composition des extraits en glycosides de stéviol peut présenter une certaine variabilité en fonction de la variété des plantes, des conditions climatiques pendant la période de croissance, la méthodologie de purification et d'extraction ; il est donc indispensable que la reproductibilité en terme de composition quantitative des extraits susceptibles d'être utilisés pour purifier le rébaudioside A puisse être assurée.

Sous l'angle de la stabilité

Des informations générales présentées dans le présent dossier font état d'une stabilité à la température et au pH des glycosides de stéviol. Il est indiqué dans certains documents fournis dans ce dossier que dans des conditions acides (pH 2-4) les glycosides de stéviol sont stables pendant 8h à une température de 80 °C. Toutefois, il est également rapporté dans ces documents qu'à une température de 100 °C et à des pH de 3-4, des décompositions peuvent avoir lieu, de l'ordre respectivement de 4 et 8 % et de 10 et 40 %. Le principal produit de dégradation rapporté étant l'isostéviol.

Dans le dossier précédent la stabilité aux traitements technologiques des glycosides 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) n'avait pas été démontrée. La stabilité du rébaudioside A, n'a pas été documentée dans le présent dossier (par exemple, par la présentation de courbes de stabilité en fonction des températures et des conditions de pH, établies en systèmes modèles et/ou dans certaines matrices alimentaires proposées) au regard des usages potentiels dans des produits nécessitant un traitement thermique de cuisson et/ou de stabilisation à des températures supérieures à 100 °C (par exemple, les produits de biscuiterie, les pâtisseries, les confiseries, les potages et certains conserves).

Sous l'angle des nouvelles données sur le métabolisme

Deux publications récentes, parmi celles fournies dans le présent dossier, décrivent la toxicocinétique des stéviols chez le rat (Roberts. 2008) et chez l'homme (Wheeler. 2008).

Chez le rat, des doses uniques de rébaudioside A, de stéviol et de stéviol marqués radioactivement ont été administrées. Les paramètres cinétiques déterminés (T_{max}, C_{max}, AUC) ont montré que les trois molécules présentaient des profils métaboliques semblables, étant complètement absorbées rapidement et éliminées 72h après ingestion. Le métabolite prédominant des trois molécules était le stéviol, et dans des proportions plus faibles, le stéviol glucuronide. L'élimination est majoritairement fécale, sous la forme de stéviol, et uniquement 2 % de la dose administrée est éliminée dans les urines.

Dans l'étude chez l'homme, des doses uniques des rébaudioside A et de stéviol ont été administrées par voie orale. Les paramètres déterminés (T_{max}, C_{max}, AUC, clearance rénale et temps de demi-vie) ont montré que les deux molécules sont métabolisées de manière prédominante en stéviol glucuronide. L'élimination du stéviol glucuronide, majoritairement par les urines, représentait entre 59 et 62 %, respectivement, du rébaudioside A et du stéviol administrés. Il n'a pas été détecté de stéviol glucuronide dans les fèces.

Sous l'angle des nouvelles données pharmacologiques et toxicologiques

Effets pharmacologiques :

Dans l'avis précédent la consommation des glycosides de stéviol par les diabétiques et les personnes souffrant d'hypo- ou hypertension artérielle avait été questionnée au regard d'effets indésirables potentiels. En effet, certaines publications suggéraient que la consommation de ces produits avait un effet vasodilatateur sur la crosse aortique isolée du rat et que le stéviol possédait des propriétés anti-hypertensives chez le rat et le chien. D'autres publications montraient que le stéviol et le stéviol pouvaient stimuler la sécrétion d'insuline *in vitro* des îlots pancréatiques isolés de souris et par les cellules β et que le stéviol induisait des effets

antihyperglycémique, insulinothéropique et glucagonostatique (suppression de la sécrétion du glucagon) chez le rat diabétique.

Deux publications récentes d'études cliniques randomisées et contrôlées, fournies dans le présent dossier, décrivent dans la première l'impact du rébaudioside A sur la pression artérielle (Maki *et al.* 2008a), d'autre part, dans la deuxième les effets de la consommation de rébaudioside A chez l'homme et la femme présentant un diabète de type 2 (Maki *et al.* 2008b).

L'étude de l'effet sur la pression artérielle, a été réalisée sur 100 personnes (18 à 73 ans, prédominance des femmes) repartis en deux groupes, l'un recevant du rébaudioside A sous forme de capsule à 250 mg, 2 fois 2 capsules par jour, soit 1000 mg/jour pendant 4 semaines et l'autre un placebo. Les personnes ayant participé à cette étude présentaient initialement des tensions artérielles systolique et diastolique normales ou normales basses. Les résultats de cette étude ont montré que l'ensemble des paramètres mesurés (pressions systolique et diastolique, pression artérielle moyenne, fréquence cardiaque) ne différait pas statistiquement entre le groupe placebo et le groupe exposé au rébaudioside A.

L'étude des effets chez les personnes diabétiques de type 2 a été réalisée sur 122 personnes (33 à 75 ans, répartition similaire d'hommes et femmes), réparties en 2 groupes, l'un recevant du rébaudioside A sous forme de capsules à 250 mg, 2 fois 2 capsules par jour, soit 1000 mg/jour pendant 16 semaines et l'autre un placebo. Aucune différence significative dans les paramètres sanguins mesurés, hémoglobine glycosylée, glycémie à jeun, insuline ou peptide C, n'a pu être mise en évidence entre le groupe placebo et le groupe exposé au rébaudioside A.

On peut donc conclure de ces études que l'exposition au rébaudioside A, à la dose de 1000 mg/jour (soit ~17 mg/kg p.c./ jour, pour une personne de 60 kg) n'a pas montré d'effet indésirable sur la pression artérielle chez les personnes normo-tendues ou présentant une pression normale-basse, ni chez les sujets souffrant de diabète de type 2. Aucune information n'a été fournie chez les sujets hypertendus.

Effets toxicologiques :

Parmi les études publiées récemment, deux études de toxicité sub-chronique (4 et 13 semaines) ont été réalisées chez le rat Han Wistar avec du rébaudioside A présentant une pureté de 97% (Curry et Roberts 2008).

La première étude de 4 semaines (« range finding » destinée à déterminer les doses à utiliser dans l'étude de 13 semaines) a comporté des doses, à la fin de l'étude, de l'ordre de 2600, 5500, 8200 et 11700 mg de rébaudioside A/kg poids corporel (p.c.)/jour chez les mâles et de l'ordre de 2900, 6200, 9200 et 13100 mg de rébaudioside A/kg p.c./jour chez les femelles (n=10 animaux/groupe/sexe). A la plus forte dose, chez les femelles, il a été observé une baisse de gain de poids corporel qui peut être attribuée à la palatabilité de l'aliment et à sa déficience calorique. Une augmentation de la créatininémie est rapportée chez tous les mâles traités et chez les femelles traitées avec les 2 plus fortes doses. Des effets non reliés aux doses administrées montrent quelques variations mineures des taux d'acides biliaires plasmatiques et du poids des surrénales chez les femelles. Une baisse de la teneur en acides biliaires est également rapportée chez les mâles aux deux plus fortes doses. Au niveau testiculaire, une baisse de poids (-7 % par rapport aux témoins) est observée à la plus forte dose. Mais aucune altération histologique n'est rapportée après examen des testicules, des épидидymes et des tubes séminifères.

La deuxième étude 13 semaines a comporté des doses, à la fin de l'étude, de l'ordre de 690, 1500 et 3150 mg de rébaudioside A/kg p.c./jour chez les mâles et de l'ordre de 980, 1900 et 3700 mg de rébaudioside A/kg p.c./jour chez les femelles ; elle a été réalisée chez des rats pré-pubères âgés de 40 à 45 jours (n=20/groupe/sexe). Comme dans l'étude précédente, des baisses de gain de poids corporel par rapport aux témoins sont observées chez les mâles à la plus forte dose (-20 %) et à la dose intermédiaire (-9 %). Quelques modifications du comportement moteur (force d'agrippement en particulier) sont rapportées avec une diminution chez les mâles mais sans véritable relation dose-effet et avec une augmentation chez les femelles. Quelques variations non dose-dépendantes, dont certaines paraissent spécifiques du sexe sont rapportées pour l'urée et la créatinine plasmatiques, les acides biliaires, les triacylglycéroles et le cholestérol. Des baisses de poids très modérées de certains organes sont observées à la plus

forte dose : les épидidymes chez les mâles et les ovaires, le cœur et les reins chez les femelles. Sur la base des variations sur les poids des organes une dose sans effet indésirable observé (DSEIO) de 1473 mg/kg p.c./jour pourrait être proposée.

Mutagenèse :

Parmi les travaux récents, une publication fait une revue exhaustive des données existantes sur la toxicologie génétique du stéviol et des glycosides de stéviol (Brusik 2008). La grande majorité des essais réalisés fait état de résultats négatifs ce qui permet de conclure à une absence de risque génotoxique pour l'homme liée à la consommation des glycosides de stéviols. De très nombreuses études tant *in vitro* qu'*in vivo* ont été réalisées sur diverses substances rattachées au stéviol à l'aide de tests de toxicologie génétique mesurant les altérations géniques et chromosomiques ou les dommages primaires de l'ADN. Pour toutes ces études il convient de tenir compte du degré de pureté de chaque échantillon testé.

Les quelques réponses positives rapportées avec les glycosides de stéviol ou le stéviol peuvent être interprétées comme provenant des problèmes méthodologiques ou d'interprétation liés à l'interférence d'effets cytotoxiques dans les tests *in vitro* ou à l'emploi des souches bactériennes particulières ou à la pureté des lots des extraits de *S. rebaudiana* testés.

Reproduction et développement :

Dans l'avis précédent il avait été mentionné que dans une étude de toxicité sur la reproduction réalisée avec des extraits de *S. rebaudiana*, l'exposition des rats par l'intermédiaire de l'eau de boisson provoquait une infertilité, se prolongeant pendant deux mois. Plusieurs études portant sur ces extraits auraient confirmé l'existence d'effets sur le système reproductif mâle : réduction de la spermatogenèse, diminution du poids des vésicules séminales, réduction de la population cellulaire au niveau des testicules. Par ailleurs, cet avis rappelait que le stéviol administré aux doses orales de 500 et 1000 mg/kg p.c./jour à des hamsters provoquait une réduction du nombre de fœtus vivants par portée et une réduction du poids fœtal moyen.

Parmi les études publiées récemment, une étude sur deux générations chez le rat Han Wistar a été réalisée avec du rébaudioside A (pureté 97%) avec des concentrations dans l'aliment de 7500, 12 500 ou 25 000 mg/kg d'aliments, correspondant respectivement à 586 et 669, 975 et 1115 ou 2048 et 2237 mg de rébaudioside A/kg pc/jour pour les mâles et les femelles de la génération F0 et correspondant à 734 et 798, 1254 et 1364, ou 2567 et 2768 mg de rébaudioside A/kg pc/jour pour les mâles et les femelles de la génération F1 (Curry, Roberts, Brown 2008). Pour la génération F0, pendant les phases de gestation et de lactation les femelles ont été exposées respectivement aux doses maximales de 713 et 1379, 1169 et 2388 ou 2381 et 5019 mg de rébaudioside A/kg p.c./jour. Pour la génération F1, pendant les phases de gestation et de lactation les femelles ont été exposées respectivement aux doses maximales de 625 et 1406, 1058 et 2394 ou 1406 et 4893 mg de rébaudioside A/kg p.c./jour.

Des baisses légères de gain de poids, liées à une baisse transitoire des ingérés, ont été observées chez les femelles de la génération F1 traitées aux deux plus fortes doses et chez les mâles de la génération F1 ainsi que chez les mâles et femelles de la génération F2 traités avec la plus forte dose. Une augmentation modérée du poids relatif du foie (environ +10 %) a été observée chez les rats de la génération F0 et chez les femelles de la génération F1 traités aux deux plus fortes doses. Une baisse de poids du thymus (-3 à -12 %) et de la rate (-6 à -27 %) est rapportée également pour tous les animaux mâles et femelles traités, respectivement, avec les deux plus fortes doses dans la génération F1 et à la plus forte dose dans la génération F2. Concernant les paramètres des fonctions de reproduction (cycle œstral, fertilité, indice de gestation, production de sperme) aucun effet significatif du traitement n'est observé. Les auteurs de l'étude proposent une DSEIO entre 2048 et 2273 mg/kg p.c./jour.

Sous l'angle de l'estimation de l'exposition

Dans la demande initiale les extraits de stévia étaient proposés comme ingrédient dans l'ensemble des produits de l'industrie agro-alimentaire (boissons, laitages, sauces, confiserie, biscuiterie, etc.). Toutefois, les doses d'emploi par denrée n'avaient pas été précisées et il était donc impossible d'estimer l'exposition résultant de l'emploi des stéviols en tant qu'édulcorant pour la population française.

Aucun calcul d'exposition au rébaudioside A n'est proposé dans le nouveau dossier soumis pour examen.

Parmi les études publiées récemment, une étude prédictive a estimé l'exposition au rébaudioside A en utilisant des données publiées dans la littérature sur la consommation d'édulcorants dans différents pays (Renwick 2008). Cette méthodologie a permis de prédire que la population en général serait exposée, en moyenne et pour les forts consommateurs, respectivement, à 1,3 et 3,4 mg/kg p.c./jour ; pour les enfants à 2,1 et 5,6 mg/kg p.c./jour et pour les enfants diabétiques à 3,4 et 4,5 mg/kg p.c./jour.

Ces résultats restent des prédictions d'exposition car la méthodologie ne prend pas en compte les nouveaux usages potentiels d'un édulcorant, puisqu'elle remplace les usages actuels des édulcorants intenses par ceux supposément attribuables au nouvel édulcorant, en maintenant un pouvoir sucrant « équivalent ». Par ailleurs, les enquêtes alimentaires sur les apports en édulcorants utilisées dans cette publication datent du début des années 2000 et ne prennent pas en compte des éventuelles augmentations dans la consommation des boissons édulcorées.

Avec ces limitations, les prédictions d'exposition figurant dans cette publication permettent de constater que les plus fortes doses d'exposition au rébaudioside A, provenant de son emploi comme édulcorant, resteraient au maximum 263 et 365 fois inférieures aux DSEIO les plus basses identifiées dans les études récentes chez l'animal (1473 et 2048 mg/kg p.c./jour). Par ailleurs, ces mêmes prédictions permettent de constater que cette exposition resterait 3 fois inférieure aux doses ne présentant aucun effet physiologique sur la pression artérielle ou les paramètres sanguins liés au diabète, mesurés dans les études chez l'homme (~ 17 mg/kg p.c./jour) .

Conclusion

Les observations formulées dans le premier avis du 12 octobre 2007 concernaient les résultats d'études réalisées avec des extraits non purifiés de *Stevia rebaudiana*.

Le nouveau dossier présenté concerne l'emploi du seul rébaudioside A d'une pureté supérieure à 97 %. Il n'a pas été possible d'établir une dose journalière admissible (DJA) pour le rébaudioside A dans la mesure où les seules données nouvelles auxquelles l'Afssa a eu accès sont des publications, sans les données brutes de ces études. Toutefois, sur la base de l'évaluation des résultats des dernières études présentées montrant l'absence d'effets indésirables (étude de toxicité de 13 semaines, étude de reproduction sur 2 générations, analyse critique des études de mutagenèse et des études pharmacologiques chez l'homme) et sur la base des calculs d'exposition prédictifs, l'Afssa estime que l'emploi de rébaudioside A extrait de *Stevia rebaudiana*, de pureté supérieure à 97 %, ne présente pas de risque pour le consommateur. Il est précisé que cette conclusion ne concerne que le rébaudioside A objet des dernières études publiées, de pureté supérieure à 97 %.

Cependant, l'Afssa formule les remarques suivantes sous les angles technologiques et chimiques : a) il s'avère important que la stabilité du rébaudioside A, en fonction du pH et des températures d'emploi dans les usages alimentaires envisagés, puisse être assurée, b) les denrées de destination, les conditions d'usage et les doses d'emploi par denrée devront être définies, c) des spécifications chimiques doivent être établies pour le rébaudioside A, d) la méthodologie de production et le contrôle analytique nécessaire permettant d'assurer une pureté supérieure à 97 % en rébaudioside A doivent être définis.

Références :

Brusick, D.J., A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides, Food and Chemical Toxicology 46, S83-S91 (2008).

Curry, L.L., Roberts, A., Subchronic toxicity of rebaudioside A. Food and Chemical Toxicology 46, S11-S20 (2008).

Curry, L.L., Roberts, A., Brown, N. Rebaudioside A: two-generation reproductive toxicity study in rats, Food and Chemical Toxicology 46, S21-S30 (2008).

Maki, K.C., Curry, L.L., Carakostas, M.C., Tarka, S.M., Reeves, M.S., Farmer, M.V., McKenney, J.M., Toth, P.D., Schwartz, S.L., Lubin, B.C., Dicklin, M.R., Boileau, A.C., Bisognano, J.D., The hemodynamic effects of rebaudioside A in healthy adults with normal and low-normal blood pressure, Food and Chemical Toxicology 46, S40-S46 (2008a).

Maki, K.C., Curry, L.L., Reeves, M.S., Toth, P.D., McKenney, J.M., Farmer, M.V., Schwartz, S.L., Lubin, B.C., Boileau, A.C., Dicklin, M.R., Carakostas, M.C., Tarka, S.M. Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. Food and Chemical Toxicology 46, S31-S39 (2008b).

Renwick, A.G. The use of a sweetener substitution method to predict dietary exposures for the intense sweetener rebaudioside A. Food and Chemical Toxicology 46, S61-S69 (2008).

Roberts, A., Renwick, A.C. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. Food and Chemical Toxicology 46, S31-S39 (2008).

Wheeler, A., Boileau, A.C., Winkler, P.C. Compton, J.C., Prakash, I., Jiang, X., Mandarino, D.A. Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy man. Food and Chemical Toxicology 46, S54-S60 (2008).