

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N°:



DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUÉE

**Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique**

Par :DJEDDI Yassamine &BEN HALIMA Osama

Intitulé

**Usage de la Stévia (*Stévia Rebaudiana*) et des
glycosides de Stéviol chez les Diabétiques de type 2**

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. MEDJEKAL Samir

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Président

Dr. RÉGGAMI Yassine

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Rapporteur

Dr. DEHIMAT Abdelouahab

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Examineur

Année universitaire : 2021 /2022

Dédicace

Je dédie ce travail à la plus belle créature que Dieu a créée sur terre, la source de tendresse, de patience et de générosité, ma mère, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime que j'ai toujours pour toi.

À mon frère Massaoud et à mes chères sœurs ; Basma, Imane, Aicha, Malak et Nada ; je vous souhaite un avenir plein de joie.

À toute ma famille Et tous mes collègues et amies proches ; Akila, Yassamine, Ilham et Abedelnour.

YASSAMINE

Dédicace

Je dédie ce travail ;

À ma mère pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices.

*À mon père pour son soutien, son affection, et à la confiance qu'il m'a
accordé.*

À tous les membres de ma famille.

À tous mes amis.

Et tous ceux qui m'aiment.....

OSAMA

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas pu aboutir à des *résultats* satisfaisants sans l'aide et les encouragements de plusieurs personnes que nous remercions.

Nous remercions tous d'*abord le Bon Dieu pour nous avoir donné le courage et la volonté pour réaliser ce travail.*

On tient tout *particulièrement* à remercier **Dr. REGGAMI Yassine**, notre encadrant, pour sa *disponibilité*, ses pertinents conseils, ses orientations et pour les efforts qu'il avait consentis durant la *rédaction* de ce *mémoire*, ainsi pour son soutien moral et scientifique, qui nous a permis *de mener à bien ce travail.*

Nous remercions chaleureusement les membres de jury d'*avoir accepté* de juger ce travail :

Dr. MEDJEKAL Samir d'*avoir présidé ce jury*

Dr. DEHIMAT Abdelouahab d'*avoir examiné ce travail*

Nos *sincères remerciements* vont *également* à l'ensemble des *enseignants du département de Microbiologie et Biochimie.*

Finalement, Toute notre gratitude pour ceux et celles qui ont *contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

Sommaire

Résumé.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Liste des figures.....	iii
Listes des tableaux.....	iv
Introduction.....	1
Chapitre I. Généralités sur le Diabète type 2.....	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Signes et symptômes.....	3
I.3. Physiopathologie.....	4
I.3.1. L'insulinorésistance.....	4
I.3.2. L'hyperinsulinisme.....	4
I.3.3. Insulino-déficience.....	4
I.4. Les complications.....	5
I.4.1. Complications aiguës.....	5
I.4.2. Complications chroniques.....	5
I.4.2.1. Micro-angiopathies.....	5
I.4.2.2. Macro-angiopathies.....	5
I.4.2.3. Le pied diabétique.....	5
I.5. Les facteurs de risque.....	6
I.5.1. L'âge.....	6
I.5.2. La glycémie.....	6
I.5.3. Les facteurs génétiques.....	6
I.5.4. Le microbiote intestinal.....	6
I.5.5. Les facteurs environnementaux.....	7
I.5.6. Autres facteurs.....	7
Chapitre II. <i>Stévia Rébaudiana</i>	9

II.1. Historique.....	9
II.2. Description botanique.....	9
II.3. Classification.....	10
II.4. Propriétés Biologiques.....	11
II.4.1. Propriété Anti-oxydante.....	11
II.4.2. Activité Anti-inflammatoire et Immuno-modulatrice.....	11
II.5. Utilisations.....	11
II.5.1. Utilisation médicinale.....	11
II.5.1.1. Effet sur l'hypertension et le système cardiovasculaire.....	11
II.5.1.2. Effet sur le diabète sucré.....	11
II.5.1.3. Effet antimicrobien.....	12
II.5.1.4. Activité anticancéreuse.....	12
II.5.2. Application dans l'alimentation.....	12
II.6. Composition des feuilles.....	13
II.6.1. Métabolites primaires.....	13
II.6.1.1. Les glucides.....	13
II.6.1.2. Les protéines.....	13
II.6.1.3. Les lipides.....	13
II.6.2. Métabolitessecondaires.....	14
II.6.2.1. Les diterpènes.....	14
II.6.2.2. Les huiles essentielles.....	14
II.6.2.3. Les composés phénoliques.....	15
II.6.2.4. Autres métabolites.....	15
II.6.3. Cendres et humidité résiduelle.....	15
Chapitre III. Glycosides de stéviol.....	17
III.1. Généralité sur les glycosides de stéviol.....	17
III.1.1. Description ET composition.....	17

III.1.2.	Structure ET variabilité.....	18
III.1.3.	Extraction ET dosage.....	19
III.1.4.	Propriétés des SG pour la consommation humaine.....	19
III.1.4.1.	Édulcorants naturels intenses.....	19
III.1.4.2.	Propriétés organoleptiques des SG et perception du goût.....	20
III.1.4.3.	Métabolisation des SG par l'homme.....	20
III.1.5.	Biosynthèse des SG.....	21
III.1.5.1.	Synthèse du GGPP, précurseurs des diterpènes.....	21
III.1.5.2.	Synthèse du stéviol, précurseur des SG.....	22
III.1.5.3.	Synthèse des SG.....	23
III.1.5.4.	Stockage des SG.....	25
III.1.6.	Accumulation en SG à l'échelle de la plante.....	26
III.2.	Activité hypoglycémiante.....	27
	Conclusion.....	30
	Références Bibliographiques.....	32

ملخص

داء السكري هو مجموعة من الاضطرابات الأيضية غير المتجانسة التي تتميز بشكل رئيسي بحالة من فرط سكر الدم المزمن الذي يعرض لخطر الإصابة بمضاعفات الأوعية الدموية. تعتبر منظمة الصحة العالمية هذا المرض بمثابة وباء زاد انتشاره بشكل ملحوظ خلال السنوات الأخيرة. يوجد حاليًا ما يقرب من 463 مليون شخص في جميع أنحاء العالم مصابون بمرض السكري. أكثر أشكال هذا المرض شيوعًا هو داء السكري من النوع الثاني، والذي يمثل 90-95% من مرضى السكري.

ستيفيا ريبوديانا، أو ببساطة ستيفيا ، هو نبات أخضر من أمريكا الجنوبية ينتمي إلى عائلة *أستراسي*. تحتوي أوراقها على ستيفيوزيدات وريبوديوسيدات وهي مركبات ذات خصائص تحلية تفوق تلك الموجودة في *البسكونيز* الستيفيا مفيدة بشكل خاص للأشخاص المصابين بداء السكري من النوع 2 حيث لها تأثير خافض لسكر الدم ونشاط مضاد للالتهابات وكذلك مضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: السكري من النوع 2 ، ستيفيا ، المحليات ، بدائل السكر ، جليكوسيدات الستيفيول.

Abstract

Diabetes mellitus is a group of heterogeneous metabolic disorders characterized mainly by a state of chronic hyperglycemia exposing to a risk of vascular complications. This disease is considered by the WHO as an epidemic whose prevalence has increased significantly in recent years. Currently, nearly 463 million people worldwide have diabetes. The most common form of this pathology is type 2 diabetes, which accounts for 90-95% of diabetic patients.

Stevia rebaudiana, or simply stevia, is a South American green plant belonging to the Asteraceae family. Its leaves contain steviosides and rebaudiosides, compounds with sweetening properties superior to those of sucrose. *Stevia* is especially beneficial for people with type 2 diabetes; it has a hypoglycemic effect and anti-inflammatory as well as antioxidant activities.

Keywords: Type 2 diabetes, Stevia, Sweeteners, Sugar substitutes, Steviol glycosides.

Résumé

Le diabète sucré est un groupe de désordres métaboliques hétérogènes caractérisé principalement par un état d'hyperglycémie chronique exposant à un risque de complications vasculaires. Cette maladie est considérée par l'OMS comme une épidémie dont la prévalence a augmenté de façon très importante au cours de ces dernières années. Actuellement, près de 463 millions de personnes dans le monde sont atteintes de diabète, La forme la plus répandue de cette pathologie est le diabète de type 2, qui représente 90-95% des personnes diabétiques.

La *stevia rebaudiana*, ou simplement *stévia*, est une plante verte sud-américaine appartenant à la famille des astéracées. Ses feuilles contiennent des stéviolosides et des rebaudiosides, des composés aux propriétés sucrantes supérieures à celles du saccharose. La stévia est particulièrement bénéfique pour les personnes atteintes de diabète de type 2 ; elle a un effet hypoglycémiant et des activités anti-inflammatoires ainsi que antioxydantes.

Mots clés : Diabète de type 2, Stévia, Edulcorants, Substituts de sucres, glycosides de stéviol.

Liste des abréviations

ABC	<i>ATP Binding Cassette.</i>
AG	Acide Gras.
AGL	Acide Gras Libres.
ATP	Adénosine Tri Phosphatase.
DNID	Diabète Non insulino-dépendant.
DT2	Diabète Type2.
HbA1c	Hémoglobine Glyquée.
HGPO	HyperGlycémie Provoquée par voie Orale.
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance.
HTA	Hyper-Tension Artérielle.
IC50	Concentration Inhibitrice Médiane.
IDI	Isopentényl diphosphate isomérase.
IL	Interleukine.
IMC	Indice de Masse Corporelle.
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PH	Potentiel Hydrogène
Pyr	Pyruvate
RebA	Rebaudioside A
RMN	Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire
SG	Glycosides de stéviol
SPIR	Spectroscopie dans le proche infrarouge
ST	Stévioside
TNF	Facteurs de Nécrose Tumorale.

Liste des figures

Figure 1. Les 5 principales anomalies dues au diabète de type 2.....	3
Figure 2. Sécrétion d'insuline chez un sujet sain et un diabétique de type 2.....	5
Figure 3. Prévalence du diabète en fonction de l'âge.....	6
Figure 4. Feuilles et fleurs de <i>stévia</i> (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni).....	10
Figure 5. Exemples de diterpènes de type labdanes issus de feuilles de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni : (a) Jhanol (b) Austroinuline (c) Stérébine A	14
Figure 6. Aglycones des principaux glycosides de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	17
Figure 7. Structures chimiques du stévioside (a) et du rébaudioside A (b).....	18
Figure 8. Structure chimique du stéviol, partie aglycone des glycosides de stéviol.....	19
Figure 9. Seuils de détection de 9 SG pour les saveurs amères et.....	20
Figure 10. Absorption, digestion, métabolisation, et excrétion des glycosides de stéviol chez l'homme.....	21
Figure 11. Biosynthèse du GGPP, précurseurs des diterpènes, par la voie plastidiale du méthylérithritol phosphate plastidiale (MEP).....	22
Figure 12. Biosynthèse du Stéviol, précurseur des glycosides de stéviol.....	23
Figure 13. Biosynthèse connue des glycosides de stéviol.....	24
Figure 14. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol montrant la localisation des différents composés.....	25

Listes des tableaux

Table 1. Composition et propriétés des principaux glycosides de stéviol des feuilles de <i>Stevia rebaudiana</i>	18
Table 2. Teneur en glycosides de stéviol dans les différents organes de la plante, exprimée en valeur relative par rapport à la teneur observée dans les feuilles.....	26
Table 3. Les métabolites bioactifs potentiels de la Stévia et leur mode d'action contre le diabète	28

Introduction

Introduction

Stevia Rebaudiana Bertoni est un arbuste sud-américain employé depuis des millénaires au Paraguay par les Indiens Guarani pour sucrer leur boisson traditionnelle. Il est également utilisé à plusieurs fins thérapeutiques. Les Européens ont découvert cette plante en 1887 et ont examiné sa composition chimique. Les molécules édulcorantes sont des diterpènes glycosylés, ou glycosides de stéviol ; le pouvoir édulcorant est engendré principalement par le rebaudioside A et le stéviolside.

La *Stévia* a connu une transformation significative dans le monde d'aujourd'hui. En effet, elle n'était autrefois qu'une simple plante sauvage commune qui a progressivement piqué la curiosité et a été intégrée dans la culture avant de gagner un rang sociétal et une valeur commerciale. C'est l'une des nouvelles perspectives pour les populations des pays industrialisés dont l'alimentation est excessivement riche en glucides et en graisses, grâce à son grand pouvoir sucrant.

La suralimentation est à l'origine de deux maladies graves : le diabète et l'obésité. Pour faire face à ces deux problèmes majeurs, les entreprises agro-alimentaires tentent de mettre au point des produits moins gras et édulcorés avec des molécules au goût sucré, dont la plupart sont synthétiques. Il s'agit d'édulcorants artificiels ou chimiques comme l'aspartame, l'acésulfame K, la saccharine ou le cyclamate. Malgré leur utilisation très répandue, on a découvert que de nombreux produits avaient des effets nocifs sur la santé après plusieurs années d'utilisation.

C'est l'une des raisons pour lesquelles la découverte de cet édulcorant naturel a le potentiel de transformer complètement l'industrie des édulcorants. La *Stevia rebaudiana* pourrait être le sucre naturel sans calorie que nous recherchions. L'extrait de cette plante est approuvé comme édulcorant alimentaire au Japon depuis 1969. Actuellement, La stévia représente 40 % du marché des édulcorants. Sa popularité a explosé en Asie et en Amérique du Sud.

Par ce travail, nous avons cherché à connaître un peu plus cette plante, ses origines, son histoire, mais également son utilisation et leur effet sur le diabète.

Cette recherche théorique a été subdivisée en trois chapitres, la première porte sur le diabète type 2. Par la suite, nous envisagerons un chapitre sur la plante étudiée, *stevia rebaudiana*, ses origines, ses propriétés biologique, et leur utilisation médicinale et alimentaire. Et finalement, nous évoquerons la biosynthèse et l'effet hypoglycémiant des glycosides de stéviol.

Chapitre I

Généralités sur le Diabète type 2

Chapitre I. Généralités sur le Diabète type2

I.1. Définition

Le diabète sucré est un groupe de pathologies métaboliques caractérisées, principalement, par une augmentation persistante du taux de glucose sanguin (hyperglycémie) due à des troubles de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline ([Haute autorité de santé, 2014](#)).

Le diabète de type 2(DT2), souvent appelé "diabète gras", "diabète de la maturité" ou "diabète non insulino-dépendant (DNID)", il représente 90 à 95 % de tous les cas du diabète sucré ([Grimaldi A, 2009](#)).

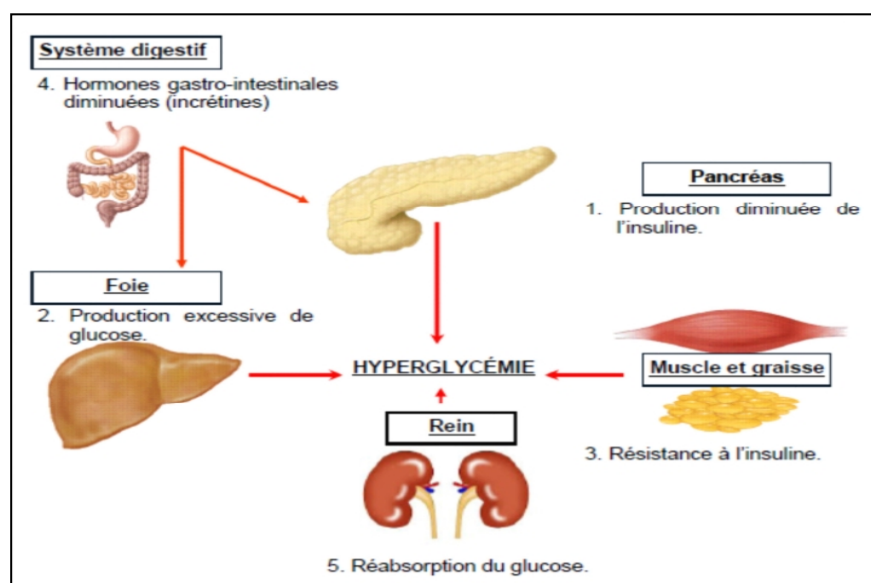


Figure 1. Les 5 principales anomalies dues au diabète de type 2 ([Centre de jour du Diabète de l'Estrée, 2014](#)).

I.2. Signes et Symptômes

Le DT2 peut toucher aussi bien les tout-petits que les adultes de plus de 40 ans ([Grimaldi A, 2009](#)); Les symptômes de cette maladie apparaissent généralement sur une période de plusieurs semaines ou mois. Ses signes et symptômes sont liés à l'élévation de la glycémie, tels que :

- Un besoin fréquent d'uriner, en particulier la nuit.
- Une augmentation de la faim et de la soif, ainsi qu'une sécheresse de la bouche.
- Somnolence prolongée, en particulier après les repas.
- Troubles de la vue.
- Des infections bactériennes ou fongiques (les plus fréquentes sont des infections urinaires, vaginites, etc.) ([Queen's, 2008](#)).

I.3. Physiopathologie

Le DT2 est provoqué par un complexe de gènes de susceptibilité dont l'expression est influencée par des facteurs environnementaux (consommation de graisses saturées, de sucres rapides et sédentarité). Les anomalies de base qui caractérisent le diabète de type 2 sont :

- La résistance à l'insuline ;
- L'insulino-déficience ;
- Et l'augmentation de la sécrétion de glucagon ([Grimaldi A, 2001](#)).

Le développement du DT2 se fait en trois étapes :

I.3.1. L'insulinorésistance

La résistance à l'insuline est définie comme un problème lié à l'action de l'insuline sur ses tissus cibles (muscle, graisse et foie) ([Lahreche I, et al., 2016](#)). Une quantité considérable d'acides gras libres (AGL) est libérée dans la circulation sanguine lorsqu'il y a une surabondance de graisse dans le tissu adipeux viscéral. Ceux-ci sont responsables d'une synthèse accrue de triglycérides dans le foie et stimulent la néoglucogenèse hépatique. Il y a une bataille entre ces AGL et le glucose au niveau musculaire. Les AGL étant plus facilement oxydables, ils sont catabolisés en premier. Le taux de glucose sanguin reste stable, et cette oxydation préférentielle entraîne la synthèse d'acétyl-COA, qui inhibe les enzymes de la glycolyse ([Herbourg C., 2013](#)).

I.3.2. L'hyperinsulinisme.

Pour permettre aux cellules de recevoir le glucose dont elles ont besoin, le pancréas produit une grande quantité d'insuline. L'hyperinsulinisme engendré par la résistance à l'insuline dans les tissus périphériques peut perdurer pendant dix à vingt ans, ce qui permet à la glycémie de rester presque normale ([Lahreche I, et al., 2016](#)).

I.3.3. Insulino-déficience

Chez les diabétiques de type 2, une augmentation initiale de la production d'insuline en réponse à la résistance à l'insuline conduit à l'épuisement du pancréas, incapable de libérer les quantités d'insuline nécessaires pour gérer la glycémie. La génération excessive d'acides gras par le tissu adipeux chez les personnes en surpoids, ainsi que l'augmentation de la glycémie que la résistance à l'insuline finit par provoquer, sont autant de facteurs qui contribuent à l'incapacité du pancréas à sécréter de l'insuline ([Lahreche I, et al., 2016](#)).

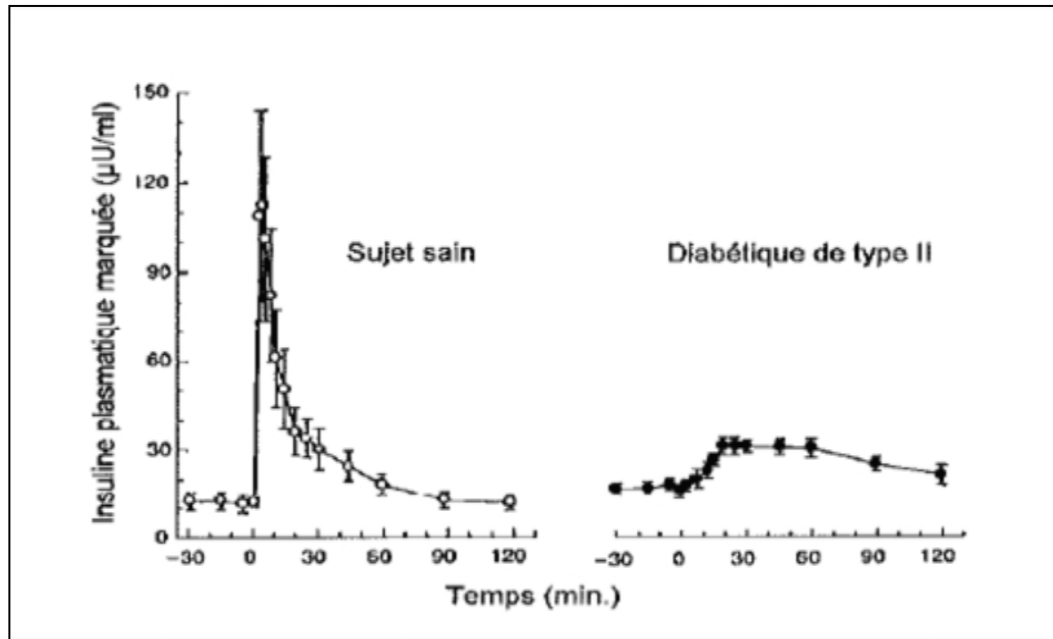


Figure 2.Sécrétion d'insuline chez un sujet sain et un diabétique de type 2 (Lebon G, 2003).

I.4. Les Complications

I.4.1. Complications aiguës

- L'hypoglycémie
- L'acidocétose (Tenoutasse S, et al., 2010).
- Le coma hyper-osmolaire (Carlier A ? et al., 2018).
- L'acidose lactique (Orban J, et al., 2003).

I.4.2. Complications chroniques

I.4.2.1. Micro-angiopathies

- La rétinopathie diabétique (Delyfer M& Delcourt, 2018).
- La néphropathie diabétique (Roussel R, 2011).
- La neuropathie diabétique (Bril V, et al., 2013).

I.4.2.2. Macro-angiopathies

Les troubles vasculaires des artères ont été rapportés (Leutenegger M& Bertin, 1995).

I.4.2.3. Le pied diabétique

Cette complication a été citée (Richard J& Schuldiner, 2008).

I.5. Les Facteurs de Risque

I.5.1. L'âge

La prévalence du DT2 augmente avec l'âge(Fig.3) (Hirst M, 2013).

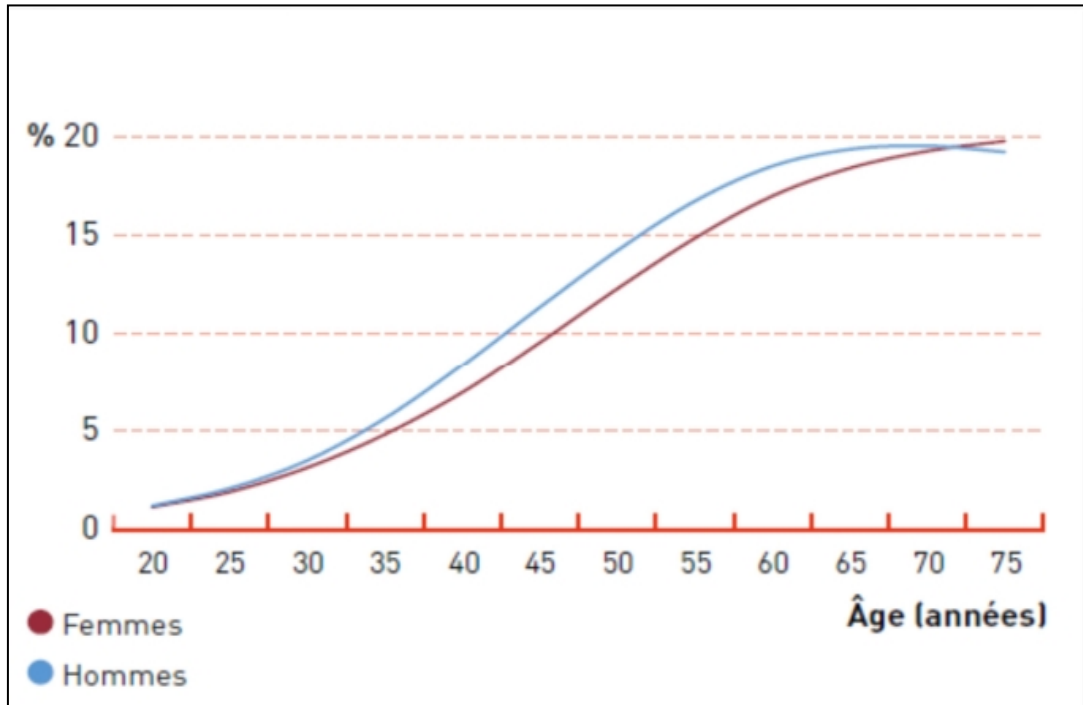


Figure 3.Prévalence du diabète en fonction de l'âge (Hirst M, 2013).

I.5.2. La glycémie

Les personnes dont la glycémie à jeun et après l'HGPO était légèrement inférieure au seuil du diabète avaient un risque considérablement plus élevé de développer cette pathologie, selon des études prospectives (Lahreche I, *et al.*, 2016).

I.5.3. Les Facteurs génétiques

Selon de nombreuses recherches, l'hérédité du DT2 varie de 20 à 80 % (Grimaldi A & Hartemann A, 2019).

I.5.4. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est composé de bactéries, virus, champignons, phages, protozoaires et archées qui colonisent le corps humain. La santé du microbiote intestinal, qui joue un rôle essentiel dans la gestion de la prise alimentaire et la synthèse hépatique du glucose, influence la production intestinale de glucose (Burcelin R, 2018).

Une dysbiose du microbiote intestinal a été identifiée dans des maladies métaboliques telles que le diabète (Qin J, *et al.*, 2012 ; Chatelier E, *et al.*, 2013).

I.5.5. Les Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux qui favorisent une constitution en surpoids sont sans aucun doute importants dans le développement du DT2.

- L'obésité ([DeFronzo R, et al., 1997](#); [Lev-Ran A, et al., 1999](#)).
- La sédentarité ([Haute autorité de la santé, 2014](#)).
- L'alimentation ([Lahreche I, et al., 2016](#)).
- Le stress ([Lahreche I, et al., 2016](#)).
- Hormones et médicaments ([Lahreche I, et al., 2016](#)).

I.5.6. Autres facteurs

- L'hypertension artérielle (HTA) ([Ferrannini E, et al., 1997](#)).
- La dyslipidémie ([Bonnet F, 2013](#)).
- Accouchement d'un enfant de poids de naissance élevé (macrosomie) ([Balkau B, et al., 2008](#)).
- Accouchement d'un enfant de faible poids de naissance ou grossesse avec un retard de croissance intra-utérin.
- Le tabagisme chronique ([Willi C, et al., 2007](#)).
- Le syndrome des ovaires poly-kystiques ([Jaureguy F, et al., 2003](#)).

Chapitre II

Stévia Rébaudiana

Chapitre II. *Stévia Réboudiana*

II.1. Historique

P. J. Stevus, un botaniste espagnol, a été le premier à étudier les différentes espèces du genre *Stevia*, et le mot *Stevia* est dérivé de son nom. M. S. Bertoni a découvert la plante et son goût sucré pour la première fois en 1899. Le nom botanique de la plante *Stevia rebaudiana* a été proposé en référence au nom d'un scientifique paraguayen, le Dr Rebaudi. Deux chimistes français Bridel et La vieille ont isolé les composés Steviosides et Rebaudioside A des feuilles de *stevia* en 1931, ce qui a donné naissance au goût sucré. En 1952, la structure moléculaire du stéviol a été établie et exprimée comme un aglycone, le stéviol avec trois molécules de glucose glycoside. Dans les années 1970, on a découvert un nouveau produit chimique appelé rebaudioside, qui avait un pouvoir sucrant supérieur à celui du stéviol. Lorsque la saccharine a été interdite au Japon, la *stévia* a été domestiquée pour la première fois comme édulcorant de substitution. Bien que la *stevia* ait d'abord été domestiquée au Japon, la culture commerciale a commencé au Paraguay en 1964. Ensuite, pendant la Seconde Guerre mondiale, la *stévia* a été utilisée comme édulcorant pour pallier la pénurie alimentaire en Grande-Bretagne. Plus tard, d'importantes recherches sur la *stévia* ont prouvé ses effets bénéfiques sur le corps humain, ce qui a conduit à sa commercialisation dans un certain nombre de nations, notamment en Amérique latine, au Canada, en Chine, au Japon, en Indonésie et aux États-Unis. Elle a ensuite été employée comme produit à base de plantes, augmentant ainsi sa part de marché dans ces pays. Ses extraits ont été approuvés pour être utilisés comme complément alimentaire aux États-Unis dans les années 1970 et 1980, et en 1994. (FDA 1995). Par la suite, le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA) a évalué les glycosides de stéviol et a établi une spécification temporaire et une DJA de 0-2 mg/kg pc/jour lors de ses 58e, 63e et 68e réunions ([Singh D,et al.,2019](#)).

II.2. Description botanique

Le genre *stévia* est composé de 200 types de différents herbes et arbustes appartient à la famille des Astéracées (composées) ([Singh D,et al.,2019](#) ; [Suweesha A, 2021](#)).

La *Stevia rebaudiana* Bertoni (**Fig. 4**) est le nom scientifique de la plante *Stevia*, communément appelée feuille douce, feuille de sucre, herbe douce et herbe à sucre. Elle est un arbuste vivace originaire du Paraguay. Il atteint 1 m de haut. La plante a un système racinaire étendu et des tiges cassantes qui produisent de petites feuilles ovales. Les feuilles sont sessiles, de 3 à 4 cm de long, minces ou spatulées, avec une pointe émoussée, un bord dentelé du milieu à

la pointe et une marge inférieure entière. La face supérieure des feuilles est légèrement granuleuse et pubescente. Base de la tige ligneuse et faiblement pubescente. Le rhizome a des racines légèrement ramifiées. Les fleurs sont pentamériques, petites et blanches, avec une gorge lavande. Ils sont entourés d'un calice commun. Les capitules sont des cymes jointes lâches et irrégulières. Les minuscules fleurons blancs sont constitués de 2 à 6 petits corymbis disposés en panicules lâches. Le fruit est un akène épineux à cinq nervures (Lemus-Mondaca Ret al., 2012).



Figure 4. Feuilles et fleurs de *stévia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) (Suweesha A, 2021).

II.3. Classification

D'après (Rather A, et al., 2019), la classification de l'espèce *Stevia rebaudiana* dans le règne végétal est la suivante :

- **Royaume :** *Plantae*
- **Division :** *Magnoliophyta*
- **Classe :** *Magnoliopsida*
- **Sous-classe :** *Asteridae*
- **Ordre :** *Asterales*
- **Famille :** *Asteraceae*
- **Genre :** *Stevia*
- **Espèce :** *rebaudiana*

II.4. Propriétés Biologiques

II.4.1. Propriété Anti-oxydante

L'effet de différents composés naturels isolés des feuilles de *S. rebaudiana* sur la phosphorylation oxydative a été étudié. Le stevioside, ainsi que le steviolbioside, l'isosteviol et le steviol, ont inhibé la phosphorylation oxydative dans les mitochondries du foie de rat. Ils ont diminué l'activité de l'ATPase, de la NADH-oxydase, de la succinate-oxydase, de la succinate déshydrogénase et du glutamate déshydrogénase, qui sont toutes impliquées dans la phosphorylation oxydative (Rather A, *et al.*, 2019).

II.4.2. Activité Anti-inflammatoire et Immuno-modulatrice

Le stevioside et son métabolite, le steviol, ont été étudiés pour leurs propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices. Dans les cellules THP-I, le stéviolate à 1Mm a considérablement inhibé la production de TNF- et d'IL-1 induite par le lipopolysaccharide (LPS) et a quelque peu supprimé la libération d'oxyde nitrique sans avoir d'effet nocif direct, mais le steviol ne l'a pas fait même à 100 µm. Le stéviolate a inhibé l'activation d'IKKβ et du facteur de transcription NF-κB, comme l'a montré le western blotting ; de plus, seul le stéviolate a favorisé la production de TNF-, IL-1 et d'oxyde nitrique dans les cellules THP-1 non stimulées. L'anticorps anti TLR4 a pu partiellement inhiber la libération de TNF- (Rather A, *et al.*, 2019).

Le stéviolate inhibe la fabrication de médiateurs inflammatoires dans les cellules THP-I stimulées par le LPS en interférant avec les voies de signalisation IKK β et NF κB, selon l'étude, et la libération de TNF induite par le stéviolate est partiellement médiée par TLR4 (Rather A, *et al.*, 2019).

II.5. Utilisations

II.5.1. Utilisation médicale

II.5.1.1. Effet sur l'hypertension et le système cardiovasculaire

Il a été démontré que la *stévia* a un effet bénéfique sur la pression artérielle. La plante peut contenir des propriétés cardiotoniques, qui contrôlent le pouls et équilibrent la pression artérielle (Ranjan R, *et al.*, 2011).

II.5.1.2. Effet sur le diabète sucré

Les feuilles de *stévia* contiennent des glycosides de steviol (principalement du stéviolate et du rebaudioside), qui sont 300 fois plus sucrés que le sucre mais n'ont aucun effet sur la

glycémie, ce qui en fait un produit bénéfique pour l'hypoglycémie et le DT2 (Midmore D& Rank A, 2002 ; Soejarto D, 2002).

Administré par voie orale, le stéviol a réduit la glycémie chez les rats diabétiques de type II (Ranjan R,et *al.*, 2011).Le stéviol est un tonique digestif qui régule la glycémie en augmentant la sécrétion d'insuline et l'utilisation de l'insuline chez les animaux insulino-déprimés (Ranjan R,et *al.*, 2011).

II.5.1.3. Effet antimicrobien

Selon diverses recherches, l'extrait de feuilles de stévia possède des qualités antifongiques et antibactériennes en plus de ses nombreuses autres applications. L'activité antimicrobienne de l'extrait de feuilles de *stévia* a varié en fonction du milieu solvant utilisé (Suweesha A,2021).

II.5.1.4. Activité anticancéreuse

La stévia semble offrir des avantages prospectifs pour la santé en matière de cancer, de caries dentaires, de stress oxydatif et d'infections microbiennes, selon plusieurs recherches (Ahmad J, et *al.*, 2020).

Le stéviol contenu dans la *stévia* a été signalé comme ayant un effet anticancéreux sur les cellules gastro-intestinales et les cellules cancéreuses du sein humain (Chen J, et *al.*, 2018).Le stéviol a montré des propriétés anti-prolifératives contre la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 en induisant l'apoptose et en inhibant la synthèse de l'ADN (Paul S,et *al.*, 2012; Gupta E,et *al.*, 2017).

II.5.2. Application dans l'alimentation

Les plantes de *stévia* sont non toxiques, non addictives non cancérogènes et non mutagènes, elles ont été utilisées comme substitut du saccharose par de nombreux fabricants de produits alimentaires au Japon au cours des 40 dernières années (Thomas J& Glade M, 2010).La stévia et ses dérivés sont présents dans une variété d'aliments, notamment les boissons gazeuses, les boissons non alcoolisées, les formulations d'édulcorants de table, les chewing-gums et les yaourts. Lorsque le stéviol et le chlorure de sodium sont combinés, ils produisent de la douceur dans les repas ; par conséquent, ils sont employés commercialement dans la création de légumes marinés, de fruits de mer séchés et de sauces soja (Goyal S,et *al.*, 2010).

II.6. Composition des Feuilles

Le désir d'utiliser *Stévia rebaudiana* Bertonii comme édulcorant commercial a conduit à d'importants examens phyto-chimiques de l'espèce, qui ont permis d'identifier plus de 300 substances chimiques (Cerde-Garcia-Rojas C& Pereda-Miranda R, 2001 ; Kennelly E, 2002). Nous ferons la distinction entre les métabolites primaires et secondaires dans la section suivante, en nous concentrant sur les glycosides de stéviol.

II.6.1. Métabolites primaires

Le métabolisme et le développement des plantes dépendent des métabolites primaires. Les glucides, les lipides et les protéines sont les trois catégories de substances organiques qu'on y trouve.

II.6.1.1. Les glucides

Les glucides sont des composants structurels et de stockage essentiel des plantes. Ils peuvent être trouvés sous forme de sucres libres ou de polysaccharides. Leur contenu dans la feuille de *Stévia* a été déterminé par différence ou par une méthode avec Anthrone (Dreywood R, 1946). La différence a été calculée en soustrayant de la masse totale de l'échantillon ; les quantités de protéines, de graisses, de cendres, d'eau et de fibres brutes (si ces dernières ont été identifiées). La méthode Anthrone est basée sur l'examen des sucres simples produits après l'hydrolyse acide de la matière.

II.6.1.2. Les protéines

Les protéines sont des molécules constituées d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés. La méthode de Kjeldahl a été utilisée pour déterminer leur teneur en *Stévia* à partir du dosage global de l'azote (Kjeldahl J, 1883).

II.6.1.3. Les lipides

Les lipides sont des molécules amphiphiles ou hydrophobes (composés chimiques constitués de longues chaînes carbonées apolaires et d'une tête polaire). L'extraction par solvant a été utilisée pour déterminer leur teneur moyenne dans les feuilles de *Stevia rebaudiana* (alcool-éther). Elle contient 3,6 - 1,2 grammes de lipides pour 100 grammes de masse sèche.

Selon Korobko N, et al., (2008), est constitué des acides linoléique et linolénique, auxquels s'ajoute l'acide palmitique. Les triterpénoïdes, les phytostérols, les pigments, les glycolipides et les phospholipides sont des exemples d'autres lipides (Ceunen S& Geuns J, 2013a). Les stérols sont des lipides mineurs des triterpènes et constituent un sous-groupe de stéroïdes. La *stévia*

contient du stigmasterol et du sitostérol, qui ont été identifiés. Ce sont des produits chimiques naturels que l'on trouve dans les plantes (Sholichin M, et *al.*, 1980; Cerda-Garcia-Rojas C & Pereda-Miranda R, 2001; Kennelly E, 2002; Ibrahim Net *al.*, 2007; Korobko N, et *al.*, 2008; Hossain M, et *al.*, 2011; Sheeja R & Lawrence B, 2015).

II.6.2. Métabolites Secondaires

Les diterpènes, les substances chimiques volatiles, les composés phénoliques et les autres métabolites secondaires ont été classés en quatre catégories.

II.6.2.1. Les diterpènes

Les diterpènes sont des composés à 20 atomes de carbone constitués de quatre unités isoprènes, dont les plus connus sont les glycosides de stéviol (Kennelly E, 2002).

La stévia contient également des diterpènes de type labdane (Sholichin M, et *al.*, 1980 ; Oshima Y, et *al.*, 1986; Brandle J, et *al.*, 1998 ; Kennelly E, 2002 ; McGarvey B, et *al.*, 2003 ; Ibrahim N, et *al.*, 2007). La **Figure 5** montre plusieurs exemples de la structure de ces composés. Leur contenu est significatif, et ils peuvent être responsables de l'arrière-goût amer/astringent associé aux extraits purs de glycosides de stéviol (McGarvey B, et *al.*, 2003).

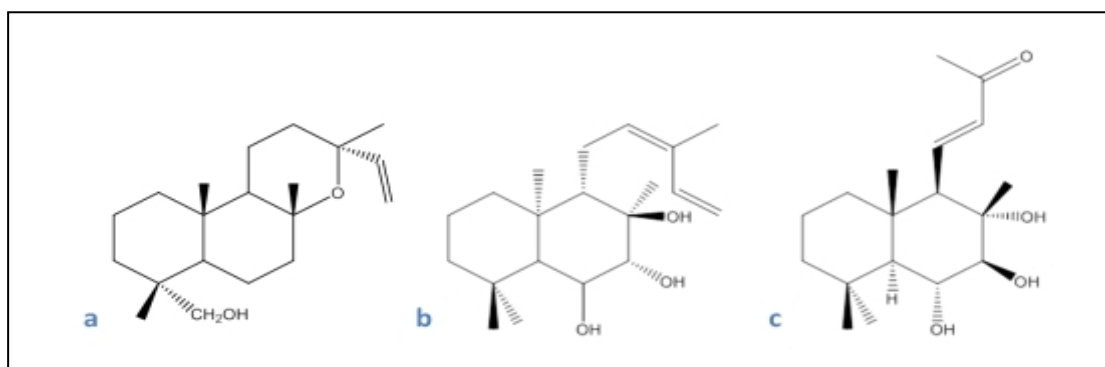


Figure 5.Exemples de diterpènes de type labdanes issus de feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni : (a) Jhanol (b) Austroinuline (c) Stérébine A (Kennelly E, 2002).

II.6.2.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, selon la norme **AFNOR (1986)**, sont des produits obtenus par distillation à l'eau de matières premières naturelles ou par des procédés mécaniques, et séparés de la phase aqueuse par des opérations physiques. L'huile essentielle est une caractéristique commune à la famille des Astéracées, il n'est donc pas rare d'en découvrir dans la *Stévia* (Cerda-Garcia-Rojas C & Pereda-Miranda R, 2001).

Les huiles essentielles des feuilles de Stévia se trouvent dans les trichomes, qui sont les structures de surface de la feuille (Baser K & Buchbauer G, 2009; Ceunen S & Geuns J, 2013).

La feuille de *Stévia* contient jusqu'à 300 substances chimiques volatiles, dont la grande majorité est des quiterpènes. L'oxyde de caryophyllène et le spathulénol sont deux des molécules les plus importantes (Martelli et al., 1985 ; Cioni et al., 2006 ; Turko Y, et al., 2007 ; Muanda F, et al., 2011; Ceunen S& Geuns J, 2013a).

II.6.2.3. Les Composés phénoliques

Les substances chimiques phénoliques sont essentielles à la défense de la plante contre les maladies et les attaques des animaux herbivores. Ils réagissent également aux facteurs de stress abiotiques, notamment les précipitations et les rayons UV (Daglia M, 2012). On connaît environ 8000 substances chimiques (Wagner H, 1979 ; Collin S&Crouzet J, 2011). Les extraits de feuilles de *stévia* comprennent une variété de produits chimiques phénoliques, notamment des glycosides de flavonol (quercétine, apigénine et ses dérivés), des coumarines et des acides cinnamiques (acide ferrulique, acide caféique, acide chlorogénique), des tanins et des flavonoïdes (Kennelly E, 2002 ; Tadhani M& Subhash R, 2006 ; Hossain M,et al., 2011 ; Ceunen S& Geuns J, 2013a ; Shivanna N,et al., 2013 ; Barba F,et al., 2015 ; Sheeja R,& Lawrence B, 2015).

II.6.2.4. Autres métabolites

Les feuilles de *stévia* comprennent une variété de composés différents, notamment :

- Des acides organiques tels que ; L'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide formique, l'acide lactique, l'acide malique, l'acide succinique et l'acide tartrique (Savita, S et al., 2004).
- Des vitamines telles que ; L'acide folique, l'acide ascorbique et la vitamine B2(Kim, Iet al., 2011).
- Le criblage phyto-chimique a détecté également des saponines, anthraquinones, steviamine et autres alcaloïdes (Tadhani, M& Subhash, R 2006 ; Hossain, Met al., 2011 ; Sheeja, R& Lawrence, B 2015).

II.6.3. Cendres et humidité résiduelle

L'humidité résiduelle moyenne des feuilles séchées, mesurée par différents auteurs, est de 7,8 à 2,5 g pour 100 g de feuilles. Le résidu d'une matière végétale après une combustion à 550°C est la teneur en cendres de cette matière. Les auteurs ont calculé que la teneur en cendres de la *Stévia* était de 8,7 à 2,2 g / 100 g de matière sèche en moyenne montre la composition minérale des feuilles de *Stevia*. Les composants les plus abondants sont le potassium et le calcium, suivis du magnésium et du phosphore (Savita, S, et al., 2004).

Chapitre III

Glycosides de stéviol

Chapitre III. Glycosides de stéviol

III.1. Généralité sur les glycosides de stéviol

Les glycosides de stéviol sont (SG) les substances chimiques qui confèrent à la stévia ses caractéristiques édulcorantes.

III.1.1. Description et Composition

Les SG sont des composés acaloriques et édulcorants. Un glycoside est un produit chimique qui contient au moins une molécule de glucide reliée à un composant non glucidique (aglycone) (**Fig.6**) (Lemus-Mondaca M, et al., 2012). À ce jour, 34 SG, ainsi que 8 isomères ou formes glycosylées du stéviol, ont été trouvés dans *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ceunen S& Geuns J, 2013c). Les SG se trouvent principalement dans *S. rebaudiana*, *Stevia phlebophylla* A.Gray, *Rubus suavissimus* S. Lee, et *Angelica keiskei* (Miq.) Koidz sont les seules autres plantes qui accumulent actuellement ces produits chimiques (Ceunen S& Geuns J, 2013c). Les SG peuvent représenter jusqu'à 20% de la matière sèche des feuilles (Brandle J et al., 1998). Ils se présentent sous forme de fins cristaux ou d'une poudre blanche hygroscopique à l'état pur. Ils sont pratiquement inodores, ou ont une odeur distincte. Lorsqu'ils sont sous forme anhydre, ils restent stables pendant des années (Geuns M, et al., 2010).

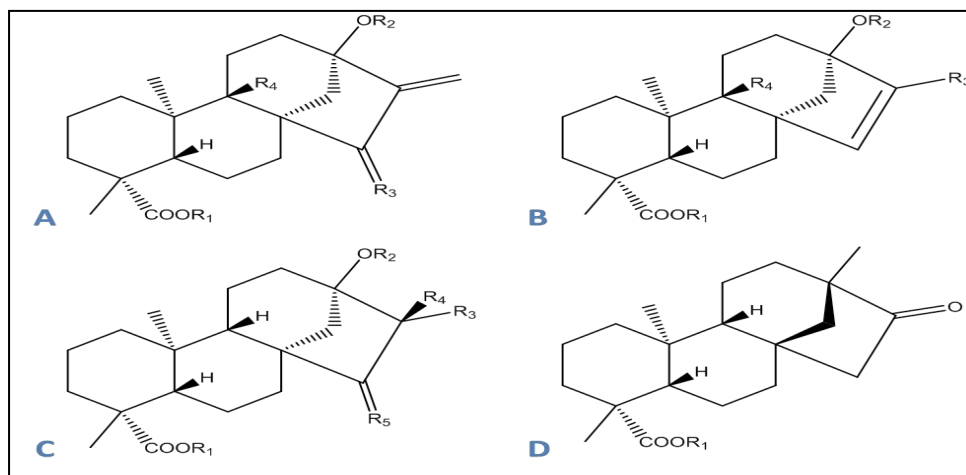


Figure 6. Aglycones des principaux glycosides de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Geuns Met al., 2010).

Les premières substances chimiques identifiées dans les feuilles de la plante, le stéviolside, les rébaudiosides A, C, D, E et F (**Fig. 7**), le dulcoside A et le stéviolbioside (Dacome et al., 2005). Le **Tableau 1** montre la composition moyenne de ces composés ; toutefois, celle-ci peut varier en fonction du génotype, du stade ontogénétique et des conditions de culture de la plante (Ceunen S& Geuns J, 2013c; Lemus-Mondaca R et al., 2012; Wölwer-Rieck U, 2012).

Le stéviol reste stable pendant 1 heure à 120°C et se décompose entièrement à 200°C. Il est stable pendant 2 heures à 60°C en solution aqueuse (0,5 g/L) sur une gamme de pH de 2 à 10, et une décomposition mineure de l'ordre de 5% est détectée si la solution est chauffée à 80°C. Il se dégrade rapidement dans des circonstances très acides (pH=1) et est complètement désintégré après 2 heures à 80°C (Mona I, et al., 2005).

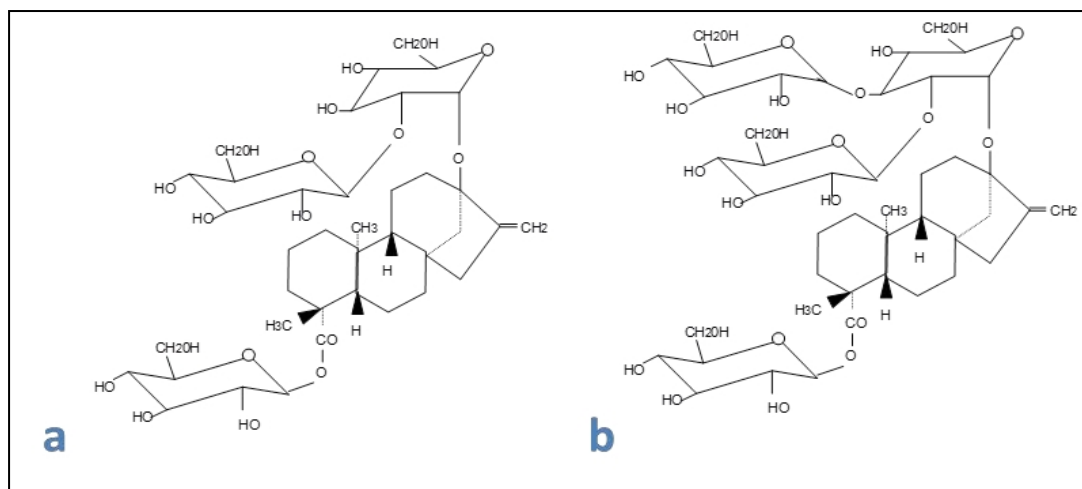


Figure 7. Structures chimiques du stéviolside (a) et du rébaudioside A (b) (Ceunen S& Geuns J, 2013c).

Table 1. Composition et propriétés des principaux glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* (Ceunen S& Geuns J, 2013c).

Nom	Quantité (g/g de matière sèche) ^a	Pouvoir sucrant ^b	Solubilité (g/L)
Stéviolside	10%	250-300	1,25
Rébaudioside A	2-5%	300-450	8,0
Rébaudioside C	1%	50-120	2,1
Dulcoside A	0,5%	50-120	5,8
Rébaudioside D	0,2%	250-400	10,0
Rébaudioside E	0,2%	150-300	17,0
Rébaudioside F	0,2%	N.D.	±1
Stéviolbioside	0,1%	100-125	0,03

III.1.2. Structure et Variabilité

Les SG sont des hétérosides appartenant à la famille des diterpènes (C₂₀) de type ent-kaurane qui confèrent aux feuilles de *Stevia rebaudiana* leur douceur. Il existe aujourd'hui quatre structures aglycones sur lesquelles sont greffés des résidus osidiques distincts. Le stéviol (**Fig. 8**) est l'aglycone le plus courant. Grâce à une liaison ester en R1 et une liaison osidique en R2, son squelette permet la synthèse d'un nombre élevé de SG (Ceunen S& Geuns J, 2013c).

Les propriétés structurales de ces SG peuvent être divisées en dix types basés sur le type de résidus osidiques greffés (glucose, fructose, xylose, rhamnose, arabinose) et le type de liaison entre les oses (Ceunen S& Geuns J, 2013 ; Ibrahim N,et *al.*, 2016a, b ; Mao G,et *al.*, 2017 ; Perera W,et *al.*, 2017 ; Prakash I,et *al.*, 2017).

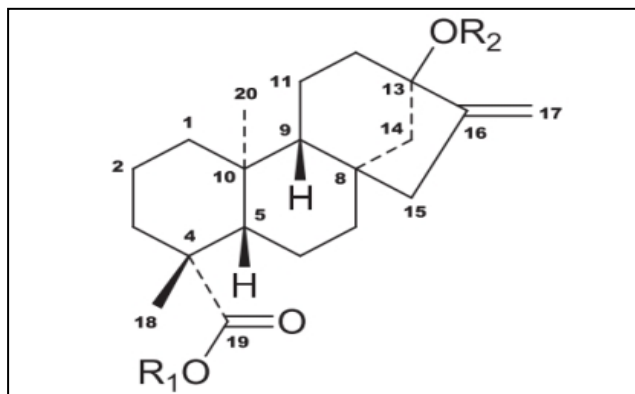


Figure 8. Structure chimique du stéviol, partie aglycone des glycosides de stéviol (Perera W,et *al.*, 2017).

III.1.3.Extraction et Dosage

La majorité des procédures d'extraction de SG recommandent d'utiliser l'eau comme solvant d'extraction. Des procédures d'extraction impliquant le chloroforme, le méthanol ou l'extraction par fluide supercritique ont également été décrites. L'utilisation de diverses procédures de purification, comme l'extraction en phase solide (EPS), peut ensuite être mise en œuvre (Woelwer-Rieck U,et *al.*, 2010). La recristallisation peut également être utilisée pour purifier le SG, qui est parfois combinée à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Ceunen S & Geuns J, 2013a).

De nombreuses méthodes analytiques pour déterminer les SG ont été développées après la découverte de l'AR en 1975 : chromatographie, électrophorèse, approche enzymatique et spectroscopie dans le proche infrarouge (NIRS) (Brandle J,et *al.*, 1998). L'HPLC est la technologie la plus utilisée de nos jours pour déterminer les glycosides (Brandle J,et *al.*, 1998; Woelwer-Rieck U, 2012). La RMN a été également utilisée pour identifier quatre SG (Pieri V,et *al.*, 2011).

III.1.4.Propriétés des SG pour la consommation humaine

III.1.4.1.Édulcorants naturels intenses

Les SG sont des édulcorants non nutritifs, concentrés et naturels. Depuis les années 1970, elles sont utilisées comme additifs alimentaires au Japon, le plus grand consommateur au monde.

Elles ont été approuvées par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis en 2009, et par le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA) en Europe en 2011. Leur présence dans les aliments est indiquée par le code E960 (Faus I& Sisniega H, 2005).

III.1.4.2. Propriétés organoleptiques des SG et perception du goût

Les SG ont des saveurs amères et sucrées (Soejarto D, et al., 1982). Les qualités gustatives des SG sont déterminées par leur variabilité. Le goût sucré, la capacité à interagir avec les récepteurs gustatifs de la langue et le seuil sensoriel sont les caractéristiques qui les distinguent. La longueur et le type des chaînes glyconiques, la substitution de l'empreinte du sucre sous forme de pyranose et la double liaison en C16 sont les propriétés structurales qui permettent aux SG de susciter des sensations amères et sucrées. Les concentrations auxquelles chaque SG induit l'expérience de la saveur sucrée et amère ont été déterminées (Fig.9) (Hellfritsch C, et al., 2012).

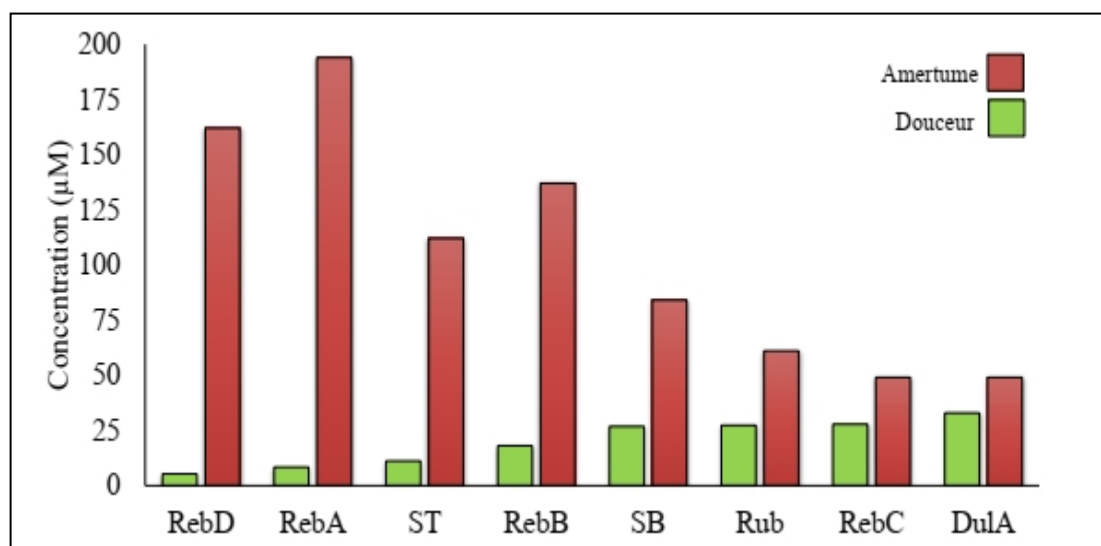


Figure 9. Seuils de détection de 9 SG pour les saveurs amères et (Hellfritsch C, et al., 2012).

III.1.4.3. Métabolisation des SG par l'homme

En termes de métabolisme humain, les SG diffèrent des autres édulcorants non nutritifs (Magnuson B, et al., 2016). Une étude pharmacocinétique a révélé le métabolisme des deux principales SG, ST et RebA, chez l'homme (Wheeler A, et al., 2008). Après une consommation orale de ST et de RebA, les chercheurs ont prélevé des échantillons de plasma sanguin, d'urine et de fèces chez 10 personnes humaines en bonne santé. La rupture des liaisons osidiques par la flore bactérienne de l'intestin grêle et du gros intestin pour créer du stéviol est la première étape du métabolisme. Des recherches cliniques ont démontré que les SG n'ont aucun effet sur la glycémie chez l'homme et qu'ils ont une caractéristique acétalique (Carakostas M, et al., 2008). Par conséquent, on pense que le microbiote du côlon utilise les résidus osidiques créés par le

clivage des SG en stéviol (Magnuson B,et al.,2016). Grâce à l'action de l'UDP-glucuronosyl-transférase UGT2B7, le stéviol est absorbé et transporté vers le foie, où il est glucuro-conjugué pour créer du stéviol glucuronide (Chen Let al.,2017). Entre 8 et 12 heures après la prise orale, ce conjugué apparaît dans le plasma. Le glucuronide de stéviol est éliminé dans l'urine 72 heures après le traitement oral, ce qui entraîne une élimination de 59 % et 62 % de la quantité ingérée dans RebA et ST, respectivement. Des études *in vitro* ont démontré que les fèces hydrolysent RebA, RebB, RebC, RebD, RebE, RebF, RebM, DulA et SB en stéviol dans les 24 heures (Purkayastha S,et al.,2014, 2015), ce qui démontre que toutes les SG ont un métabolisme similaire chez les humains(Fig.10).

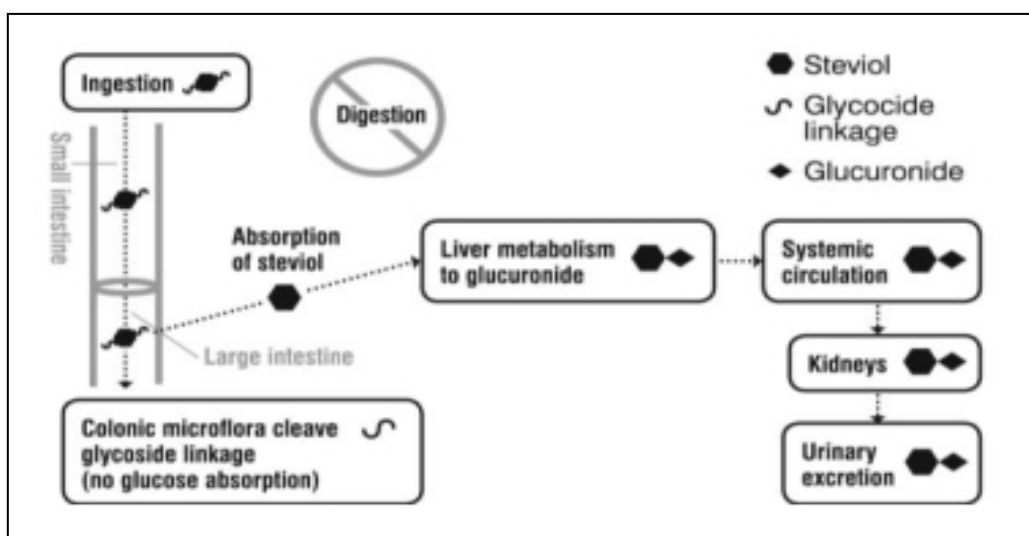


Figure 10. Absorption, digestion, métabolisation, et excrétion des glycosides de stéviol chez l'homme (Magnuson Bet al.,2016).

III.1.5. Biosynthèse des SG

III.1.5.1. Synthèse du GGPP, précurseurs des diterpènes

La conversion du pyruvate (Pyr) et du glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) en 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) dans le plaste est médiée par la 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) et son cofacteur, la thiamine pyrophosphate (TPP). Ce désoxy-ose est ensuite converti en 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate par la 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) (MEP). Les activités catalytiques de la 4-diphosphocytidil-2-C-méthyl-D-érythritol synthase (CMS), de la 4-(cytidine 5' diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (CMK) et de la 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclopyrophosphate synthase (MCS) produisent du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate. Le (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl pyrophosphate (HMB-PP) est formé lorsque le MeCPP est réduit par la (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl

diphosphate synthase (HDS). L'isopentényl pyrophosphate (IPP) et le diméthylallyl pyrophosphate (DMP) sont formés par une seconde réduction médiée par la (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphatase (HDR) (DMAPP). L'isomérisation réversible de l'IPP en DMAPP est catalysée par l'isopentényl diphosphate isomérase (IDI). La trans-géranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPPS) combine ensuite trois molécules d'IPP avec une molécule de DMAPP pour produire du géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), un précurseur de diterpène (**Fig.11**) (Brandle J& Telmer P, 2007 ; Ceunen S& Geuns J, 2013c).

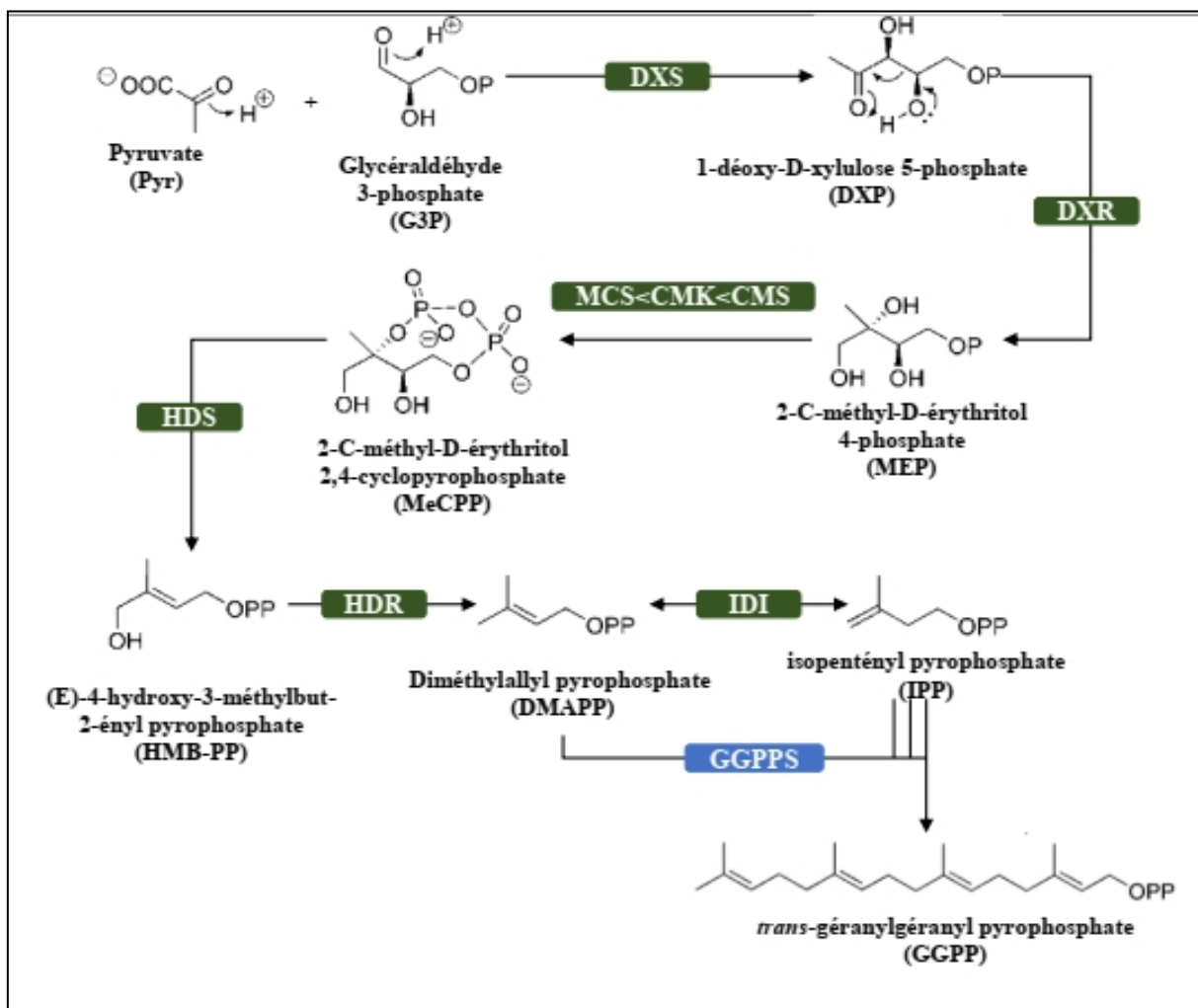


Figure 11. Biosynthèse du GGPP, précurseurs des diterpènes, par la voie plasmidiale du méthylérythritol phosphate (MEP) (Ceunen S, 2012).

III.1.5.2. Synthèse du stéviol, précurseur des SG

La GGPP est cyclisée dans le plaste pour créer l'ent-copalyl pyrophosphate (CPP), qui est synthétisé par l'ent-copalyl pyrophosphate synthase (ent-CPPS). L'ent-kaurène synthase (entKS) catalyse la synthèse de l'ent-kaurène tétracyclique. L'entkaurène est transporté dans le cytosol après sa synthèse, où il est oxydé en acide ent-kaurénoïque par l'ent-kaurène oxydase (ent-KO),

une monooxygénase à cytochrome P450 située au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Humphrey T,et al.,2006 ; Ceunen S& Geuns J, 2013c). Cette molécule constitue l'étape finale de la production des AG et des SG, dont les précurseurs sont obtenus par l'activité catalytique des CYP à la membrane du RE. L'acide entkaurenoïque oxydase (KAO) catalyse la formation de GA12, qui est le prédécesseur de toutes les gibbérellines, tandis que l'acide entkaurenoïque13-hydroxylase (ent-KA13H) catalyse la formation de stéviol (**Fig.12**), qui est le précurseur des SG. L'ent-KA13H est la première enzyme spécifique de la voie de biosynthèse du stéviol, qui est nécessaire à la fabrication des édulcorants (Ceunen S& Geuns J, 2013c; Brandle J& Telmer P, 2007).

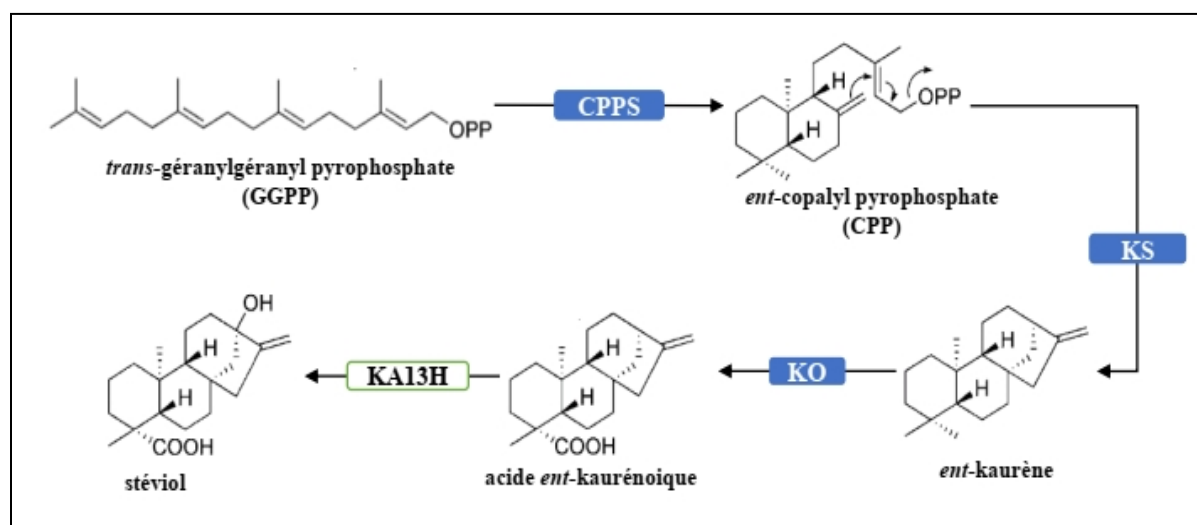


Figure 12. Biosynthèse du Stéviol, précurseur des glycosides de stéviol (Ceunen S, 2012).

III.1.5.3. Synthèse des SG

Après la production de stéviol, une séquence de glycosylations dans le cytoplasme aboutit à la formation de la grande famille des SG (Humphrey T,et al.,2006). Pour établir la grande famille des SG (Humphrey T,et al.,2006), les glycosyltransférases dépendantes de l'UDPG ou de l'UDP-glucose catalysent ces processus (UGTs). Les UGT sont membres de la superfamille des glycosyl-transférases (GTs), qui est divisée en 14 groupes, les UGTs impliquées dans la synthèse des SG appartenant à la famille 1. Les UGT sont des enzymes qui transfèrent un résidu d'un donneur actif (généralement l'UDP-glucose) à une molécule réceptrice, comme des hormones, des métabolites secondaires et des xénobiotiques (Li Y,et al.,2001 ; Wang J& Hou B, 2009).

La boîte PSPG (*Plant Secondary Product Glycosyltransferase*) est un motif hautement conservé dans la séquence C-terminale des gènes UGT dans le règne végétal qui est impliqué dans la liaison de l'UDP au sucre activé (Richman A,et al.,2005). Ce motif a été utilisé pour

découvrir la superfamille des glycosyltransférases chez *Arabidopsis thaliana*, qui comprend 119 UGT impliquées dans l'homéostasie de l'hormone de croissance, la détoxification des produits chimiques exogènes, ainsi que la production et le stockage de métabolites secondaires (Wang J& Hou B, 2009).

La production d'UDP-glucose par une UDP-glucose pyrophosphorylase était largement localisée dans le cytoplasme du mésophylle des feuilles de *Stevia rebaudiana*, avec une activité mineure dans l'appareil de Golgi (Ceunen S& Geuns J, 2013c). Richman A,et al.,(2005) ont identifié trois UGTs impliquées dans la production de SG après une analyse fonctionnelle de 12 UGTs de *Stevia rebaudiana* (Fig.13).

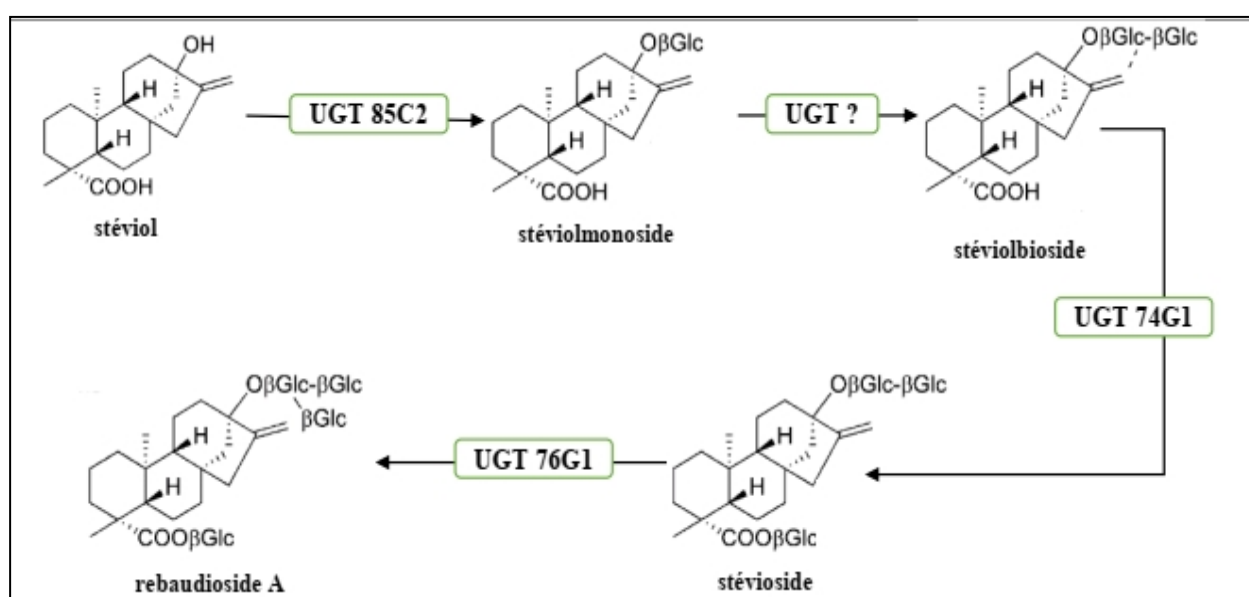


Figure 13. Biosynthèse connue des glycosides de stéviol (Ceunen S, 2012).

Le stéviolmonoside est formé par la glycosylation du groupe hydroxyle en C-13 (R2), qui est catalysée par **UGT85C2**. Le stéviolbioside est formé lorsque celui-ci est glycosylé sur le C-2' de son résidu glucose. Bien que l'UGT responsable de cette glycosylation n'ait pas encore été découverte *in vivo*, une UGT candidate a été trouvée : **UGT91D2** (Kishore G, et al., 2011). L'UGT74G1 catalyse la formation du stévioside via la glycosylation du groupe carboxyle (R1) situé en C-19 de la molécule d'aglycone.

La glycosylation du glucose en C-13 sur son C-3', médiée par l'UGT76G1, aboutit à la formation du rebaudioside A. Un nouveau type d'UGT vient d'être identifié : l'UGTSr (Madhav H,et al., 2013). Elle partage 98 % d'homologie de séquence nucléotidique avec l'UGT76G1 et a une action de glycosylation comparable contre le ST, formant le RebA. Cependant, il a été démontré que la perte de fonction de l'UGT76G1 entraîne l'absence de production de RebA.

(Yang Y,et al., 2014), ce qui indique qu'il n'existe pas de complémentation fonctionnelle de ce processus *in vivo* par d'autres UGT.

Bien que ST et RebA soient les SG les plus abondants dans les feuilles de Stévia, ils ne sont pas les produits finaux de la voie de biosynthèse. D'autres glycosylations se produisent parce que les SG comme le Rebaudioside IX ont jusqu'à 9 résidus osidiques (Prakash I,et al., 2017), compliquant considérablement ce processus métabolique, qui est encore inconnu après RebA (Fig.14). *Stevia rebaudiana* possède 118 transcrits présentant une homologie avec 45 UGTs connues, selon une étude récente (Singh G,et al., 2017b). Bien que les produits de ces gènes aient une large gamme de substrats, certaines UGT de *Stevia rebaudiana* ont une faible activité enzymatique contre les SG (Richman Aet al., 2005).

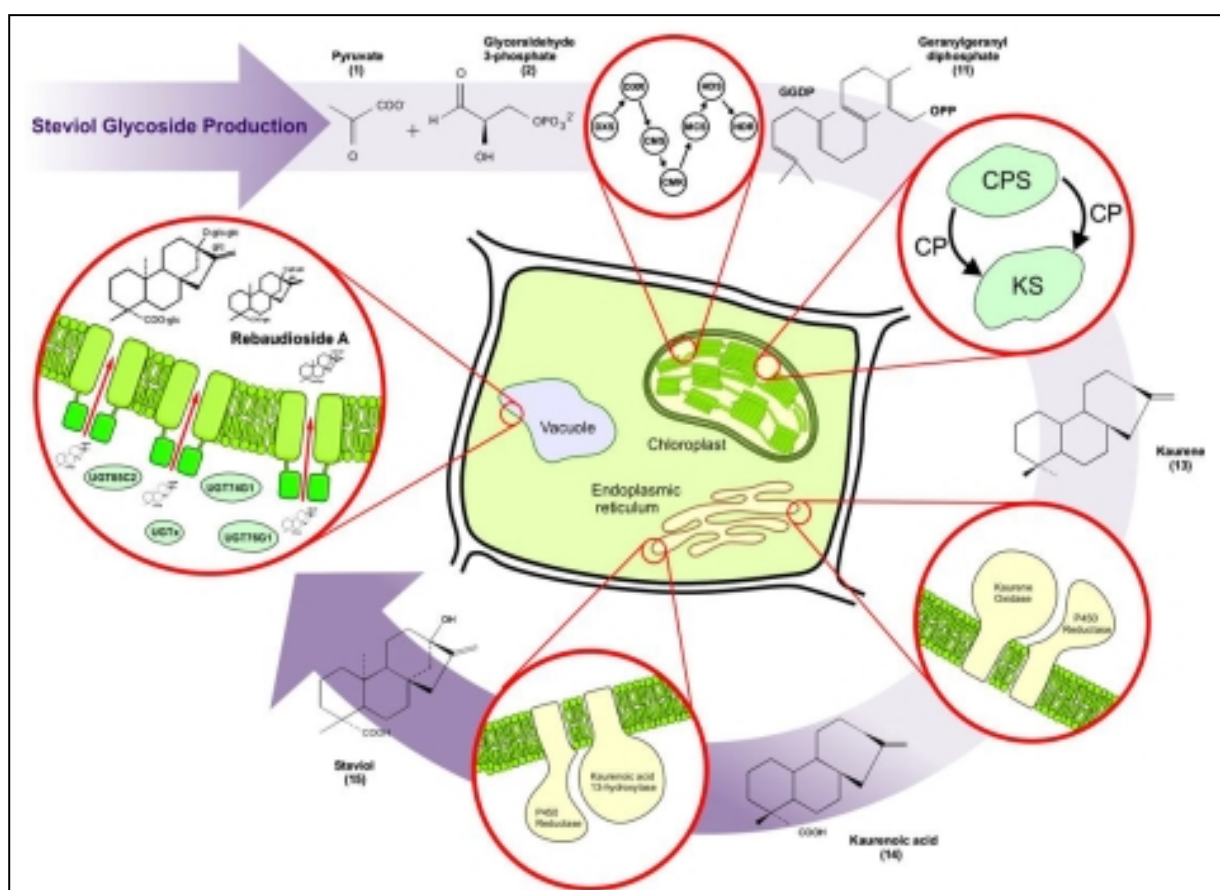


Figure 14. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol montrant la localisation des différents composés (Brandle J& Telmer P, 2007).

III.1.5.4. Stockage des SG

La vacuole est supposée être l'endroit où les SG sont stockés (Brandle J& Telmer P, 2007 ; Ceunen S& Geuns J, 2013c). Cependant, le mécanisme de stockage des SG est encore inconnu.

Les vacuoles des cellules végétales sont reconnues depuis longtemps pour piéger les métabolites secondaires et les xénobiotiques nocifs (Brandle J& Telmer P, 2007). En général, la translocation des composés à travers la membrane sélective de la vacuole nécessite des transporteurs intégrés à la membrane avec une activité spécifique au substrat (Ceunen S& Geuns J, 2013c). Ils utilisent l'énergie stockée dans les gradients électrochimiques ou l'énergie délivrée directement par l'hydrolyse de l'ATP. Les transporteurs MFS (*Major Facilitator*) et MATE (*Multi-drug and Toxic Compound Extraction*) qui utilisent les gradients de protons ou d'ions ont déjà été impliqués dans le stockage des endogènes dans la vacuole (Brandle J& Telmer P, 2007 ; Ceunen S& Geuns J, 2013c). Une autre superfamille de transporteurs observée dans le transport de la membrane vacuolaire est celle des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*), qui utilisent l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP (Brandle J& Telmer P, 2007) pour déplacer la molécule d'intérêt.

III.1.6. Accumulation en SG à l'échelle de la plante

L'accumulation de SG est principalement observée dans les feuilles de *S. rebaudiana*. Les autres parties de la plante (fleurs, tiges, graines, racines) présentent des concentrations nettement plus faibles, comme le montre le **Tableau 2** (Barbet-Massin C, 2015).

Organe	Teneur en glycosides de stéviol (% par rapport aux feuilles)			
	RA et RC	ST	ST	RA
Feuilles	100	100	100	100
Fleurs	12,5-14,3	40	-	-
Tiges	7,7-8,3	Traces	78	7
Graines	5,9-6,3	-	-	-
Racines	< 2,5	Aucune trace	52	0
Référence	Bondarev <i>et al.</i> (2003)	Zaidan <i>et al.</i> (1980)	Kumar H. <i>et al.</i> (2012a)	Kumar H. <i>et al.</i> (2012a)

Table 2. Teneur en glycosides de stéviol dans les différents organes de la plante, exprimée en valeur relative par rapport à la teneur observée dans les feuilles (Barbet-Massin C, 2015).

III.2. Activité Hypoglycémiante

Stévia rebaudiana a montré un effet hypoglycémiant chez les personnes diabétiques en inhibant la glycogénolyse et la gluconéogenèse, ainsi qu'en absorbant le glucose dans le duodénum. La *stévia* et ses glycosides ont été associés à des propriétés antioxydantes et anti-hyperglycémiantes dans de nombreux sites corporels, notamment le pancréas, le foie et les reins, chez les patients diabétiques. Il est bénéfique pour le tissu pancréatique en augmentant les niveaux d'insuline et en améliorant les qualités antidiabétiques d'une manière dépendante du PPAR, ainsi que par ses capacités antioxydantes. En outre, il a été démontré que le stéviolside de la *stévia* réduit l'inflammation en diminuant les niveaux de cytokines pro-inflammatoires (Jan S, et al., 2021).

Selon Jeppesen P, et al., (2000) le stéviolside augmente le taux d'insuline et diminue le taux de sucre dans le sang en modifiant les cellules du pancréas. Chez des rats albinos diabétiques induits par la streptozotocine, des extraits de *Stévia* ont diminué la glycémie à jeun et le taux d'hémoglobine glycosylée (HbA1c) (5,32 %). En outre, après huit semaines de traitement, les animaux diabétiques présentaient de meilleurs niveaux d'insuline et de glycogène hépatique.

Le stéviolside augmente non seulement le taux d'insuline mais réduit également la gluconéogenèse dans le foie des rats en diminuant l'expression du gène de la phosphoénolpyruvate carboxykinase, ce qui entraîne une glycémie optimale. Les substances bioactives stéviolside et stéviol réduisent l'inflammation en activant et en stimulant l'expression du gène IB (Chen J, et al., 2006). D'autres recherches (Bayat E, et al., 2017) ont trouvé des résultats similaires lorsqu'ils ont employé des extraits aqueux des tévia pour réduire les niveaux d'interleukine-6 (IL-6) dans le sérum de souris diabétiques induites par la streptozotocine-nicotinamide. Ils ont suggéré que l'association *stévia* et metformine pourrait être bénéfique aux patients diabétiques présentant une résistance à l'insuline en réduisant la glycémie à jeun et les taux d'IL-6 dans le groupe diabétique.

Il a été démontré que les glycosides de stéviol stimulent l'absorption du glucose dans les fibroblastes de rats nouveau-nés en activant la voie PI3K/Akt, ce qui entraîne la translocation de Glut4 vers la membrane plasmique. De plus, il a été révélé que les deux composants bioactifs (stéviol et stéviolside) de *Stévia* avaient une action insulino-mimétique (Bhasker S, et al., 2015).

Shivanna N, et al., (2013) ont montré des propriétés antidiabétiques des feuilles de *stévia* dans un modèle expérimental de rat diabétique, Ils ont également révélé qu'elle protège le foie et les reins en réduisant le stress oxydatif.

Toskulkao C, et al., (1995) ont découvert qu'à une concentration de 1 mM, le stéviol réduisait l'absorption intestinale du glucose jusqu'à 43 % et modifiait la forme des cellules absorbantes intestinales chez les hamsters.

Aranda-Gonzalez I, et al., (2016) ont constaté que l'administration de 20 mg/kg de glycosides de stéviol mineurs de *Stévia rebaudiana* par voie intrapéritonéale ou orale pendant un an n'avait aucun effet anti-hyper-glycémique chez les rats Wistar normo-glycémiques ou diabétiques induits.

Le **Tableau 3** énumère les utilisations spécifiques des glycosides de *Stévia* dans le traitement du diabète.

Table 3. Les métabolites bioactifs potentiels de la *Stévia* et leur mode d'action contre le diabète (Toskulkao C, et al., 1995).

Potential agents	Mode of action
Stevia extracts	Stevia extract at a dose of (300 mg/kg) has a significant anti-hyperglycemic action in diabetic rats. In addition, the combined dose of stevia extract (300 mg/kg) and glimepiride (1 mg/kg) showed a more reduction in the BGL
Stevioside	It lower random BGL and fasting blood glucose level and glycosylated (HbA1c) hemoglobin amount in streptozotocin induced based diabetic albino rats
Steviol	Act as a strong antioxidant compound by lowering the concentration of glutathione and by increasing the expression of two important antioxidant enzymes i.e. superoxide dismutase and catalase
Glycosides	Stevia crystal reduces body weight loss and BGL
Glycosides	It leads hypoglycemia by lowering the glycogenolysis and gluconeogenesis processes and by absorbing the glucose into the duodenum
Glycosides	Enhance the anti-diabetic activity of pancreatic tissue by increasing the insulin level by increasing anti-oxidant activity and PPAR γ -dependent mechanism
Stevioside and steviol	It promote Glut4 protein and glucose transport, together with an enhanced transcription of Glut4 mRNA
Stevioside	It can lower the inflammation by lowering the level of pro-inflammatory cytokines
Stevioside and steviol	Low inflammation by activation and increasing the expression <i>IκB</i> gene (NF- κ B localization inhibitor)
Stevioside and steviol	It lowers gene expression of IL-1 β , IL-6, and IL-10. In addition, it enhances glucose uptake and shows strong anti-oxidant activity in neonatal rat fibroblast
Stevioside	Inhibits the NF- κ B and <i>IκB</i> levels by lowering the amounts of IL-1 β , IL-6, and TNF- α
Stevioside	Raise insulin level and lower the gluconeogenesis by decreasing the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in rats' liver

CONCLUSION

Conclusion

La *stévia* contient plusieurs substances phyto-chimiques essentielles (stéviol, stéviolides, rébaudiosides, et autres). Elle a une action anti-hyperglycémiant significative et peut être utilisée pour remplacer le saccharose chez les patients diabétiques. La plante possède des propriétés antidiabétiques et exerce une activité favorable sur les tissus pancréatiques en augmentant les niveaux d'insuline. Il aide également à contrôler la glycémie en réduisant l'inflammation et le stress oxydatif. Pour le secteur en plein essor de l'alimentation naturelle, elle constitue une source essentielle d'édulcorants à haute puissance. Les infusions, thés, gelées et autres produits fonctionnels efficaces à base de *Stévia* peuvent non seulement fournir des nutriments optimaux à l'organisme, mais aussi contribuer à la gestion du diabète. D'autres études sont nécessaires pour savoir si une ingestion fréquente présente des avantages à long terme pour l'homme.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- 1- Ahmad, J., Khan, I., Blundell, R., Azzopardi, J., & Mahomoodally, M. F. (2020). *Stevia rebaudiana Bertoni*: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 177-189.
- 2- Aranda-González, I., Moguel-Ordóñez, Y., Chel-Guerrero, L., Segura-Campos, M., & Betancur-Ancona, D. (2016). Evaluation of the antihyperglycemic effect of minor steviol glycosides in normoglycemic and induced-diabetic wistar rats. *Journal of medicinal food*, 19(9), 844-852.
- 3- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2009). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press.
- 4- Balkau, B., Lange, C., Fezeu, L., Tichet, J., de Lauzon-Guillain, B., Czernichow, S., ... & Eschwège, E. (2008). Predicting diabetes: clinical, biological, and genetic approaches: data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes care*, 31(10), 2056-2061.
- 5- Barba, F. J., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2015). Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana Bertoni* leaves. *Journal of Food Engineering*, 149, 222-228.
- 6- Barbet-Massin, C. (2015). *Sélectionner et cultiver Stevia rebaudiana Bertoni en milieu tempéré: exploration de la variabilité de la teneur et de la composition en glycosides de steviol* (Doctoral dissertation).
- 7- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2009). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press.
- 8- Bayat, E., Dastgheib, S., Egdar, S., & Mokarram, P. (2017). Effect of the aquatic extract of stevia on the serum level of interleukin-6 in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Shiraz E-Medical Journal*, 18(2).
- 9- Bhasker, S., Madhav, H., & Chinnamma, M. (2015). Molecular evidence of insulinomimetic property exhibited by steviol and stevioside in diabetes induced L6 and 3T3L1 cells. *Phytomedicine*, 22(11), 1037-1044.
- 10- Bonnet F., 2013 « Facteurs de risque de diabète de type 2 chez l'individu non obèse ». *Médecine des Maladies Métaboliques* 7, no 1.
- 11- Brandle, J. E., Starratt, A. N., & Gijzen, M. (1998). *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of plant science*, 78(4), 527-536.

- 12- Brandle, J. E., & Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14), 1855-1863.
- 13- Bril, V., Perkins, B., & Toth, C. (2013). Neuropathie. *Canadian Journal of Diabetes*, 37, S518-S521.
- 14- Burcelin, R. (2018). Le microbiote, après une décennie d'étude dans le domaine du diabète: qu'a-t-on appris, quelles pistes thérapeutiques?. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 12(2), 156-159.
- 15- Carakostas, M. C., Curry, L. L., Boileau, A. C., & Brusick, D. J. (2008). Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), S1-S10.
- 16- Carlier A., Amouyal C. Cétoacidose diabétique, *Endocrinologie-Nutrition*, Elsevier Masson, 2018, 15(4) Pages 1-10. [DOI : 10.1016/S1155-1941(18)79592-9].
- 17- Centre de santé communautaire de l'Estrie 2014, <http://www.cscestrie.on.ca>. Mise à jour : 2022.
- 18- Cerda-García-Rojas, C. M., & Pereda-Miranda, R. (2001). The phytochemistry of Stevia: a general survey. *Stevia. The genus Stevia*, 19, 87-118.
- 19- Ceunen, S., Werbrouck, S., & Geuns, J. M. (2012). Stimulation of steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* by red LED light. *Journal of plant physiology*, 169(7), 749-752.
- 20- Ceunen, S., & Geuns, J. M. (2013). Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science*, 198, 72-82.
- 21- Ceunen, S., & Geuns, J. M. (2013). Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Phytochemistry*, 89, 32-38.
- 22- Ceunen, S., & Geuns, J. M. (2013). Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function. *Journal of natural products*, 76(6), 1201-1228.
- 23- Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G. & Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541-546.
- 24- Chen, J., Jeppesen, P. B., Abudula, R., Dyrskog, S. E., Colombo, M., & Hermansen, K. (2006). Stevioside does not cause increased basal insulin secretion or β -cell desensitization as does the sulphonylurea, glibenclamide: Studies in vitro. *Life sciences*, 78(15), 1748-1753.

- 25- Chen, L., Sun, P., Li, Y., Yan, M., Xu, L., Chen, K., & Ouyang, P. (2017). A fusion protein strategy for soluble expression of Stevia glycosyltransferase UGT76G1 in *Escherichia coli*. *3 Biotech*, 7(6), 1-8.
- 26- Chen, J., Xia, Y., Sui, X., Peng, Q., Zhang, T., Li, J., & Zhang, J. (2018). Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively. *Oncotarget*, 9(41), 26299.
- 27- Cioni, P. L., Morelli, I., Andolfi, L., Macchia, M., & Ceccarini, L. (2006). Qualitative and quantitative analysis of essential oils of five lines *Stevia rebaudiana* Bert. genotypes cultivated in Pisa (Italy). *Journal of Essential Oil Research*, 18(1), 76-79.
- 28- Collin, S. and Crouzet, J. 2011. *Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Lavoisier.
- 29- Dacome, A. S., Da Silva, C. C., Da Costa, C. E., Fontana, J. D., Adelmann, J., & Da Costa, S. C. (2005). Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry*, 40(11), 3587-3594.
- 30- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- 31- DeFronzo, R. A. (1997). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *The Netherlands journal of medicine*, 50(5), 191-197.
- 32- Delyfer, M. N., & Delcourt, C. (2018). Épidémiologie de la rétinopathie diabétique dans les données internationales et françaises. *Médecine des maladies métaboliques*, 12(7), 553-558.
- 33- Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 18(8), 499-499.
- 34- Faus I, Sisniega H. 2005. Sweet-tasting proteins. *Biopolymers Online*: 203–210.
- 35- Ferrannini, E., Natali, A., Bell, P., Cavallo-Perin, P., Lalic, N., & Mingrone, G. (1997). Insulin resistance and hypersecretion in obesity. *The Journal of clinical investigation*, 100(5), 1166-1173.
- 36- Geuns, J. M. (2010). *Stevia and steviol glycosides*. Euprint, Heverlee.
- 37- Goyal, S. K., Samsher, & Goyal, R. K. (2010). *Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetener: a review*. *International journal of food sciences and nutrition*, 61(1), 1-10.

- 38- Grimaldi A., (2001). Traitement du diabète de type 2 : place des nouveaux antidiabétiques oraux. Dossier du CNHIM : Revue d'évaluation sur le médicament. P11-13.
- 39- Grimaldi A., (2009). Guide pratique du diabète, Issy-les-Moulineaux: Masson.
- 40- Grimaldi, A., & Hartemann, A. (2019). *Guide pratique du diabète*. Elsevier Health Sciences.
- 41- Gupta, E., Purwar, S., Maurya, N. K., Shakyawar, S., & Alok, S. (2017). Formulation of value added low-calorie, high fibre biscuits using flax seeds and Stevia rebaudiana. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 8(12), 5186-5193.
- 42- Haute autorité de la santé, (2014). Actualisation du référentiel de pratique de l'examen périodique de santé, prévention et dépistage du DT2 et des maladies liées au diabète.
- 43- Hellfritsch, C., Brockhoff, A., Stähler, F., Meyerhof, W., & Hofmann, T. (2012). Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(27), 6782-6793.
- 44- Herbourg, C. (2013). Elaboration d'un programme d'éducation thérapeutique du diabète de type 2 adapté au milieu carcéral (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- 45- HIRST M., 2013 - ATLAS du DIABETE de la FID 6e édition. Fédération Internationale du Diabète. P13-22-23-24-47
- 46- Hossain, M. S., Alam, M. B., Asadujjaman, M., Islam, M. M., Rahman, M. A., Islam, M. A., & Islam, A. (2011). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of different fractions of Stevia rebaudiana leaves in alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(7), 1722.
- 47- Humphrey, T. V., Richman, A. S., Menassa, R., & Brandle, J. E. (2006). Spatial organisation of four enzymes from Stevia rebaudiana that are involved in steviol glycoside synthesis. *Plant molecular biology*, 61(1), 47-62.
- 48- Ibrahim, N. A., El-Gengaihi, S., Motawe, H., & Riad, S. A. (2007). Phytochemical and biological investigation of Stevia rebaudiana Bertoni; 1-labdane-type diterpene. *European Food Research and Technology*, 224(4), 483-488.
- 49- Jan, S. A., Habib, N., Shinwari, Z. K., Ali, M., & Ali, N. (2021). The anti-diabetic activities of natural sweetener plant Stevia: an updated review. *SN Applied Sciences*, 3(4), 1-6.
- 50- Jauregui, F., Carton, M., Teboul, J., Butel, M. J., Panel, P., Ghnassia, J. C., & Doucet-Populaire, F. (2003). Facteurs de risque et stratégie de dépistage de la colonisation par le

- streptocoque du groupe B chez la femme enceinte: résultats d'une étude prospective. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 32(2), 132-138.
- 51-Jeppesen, P. B., Gregersen, S., Poulsen, C. R., & Hermansen, K. (2000). Stevioside acts directly on pancreatic β cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate—sensitive K^+ -channel activity. *Metabolism*, 49(2), 208-214.
- 52-Kennelly, E. (2002). Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. *Stevia, the Genus of Stevia*, Medicinal and aromatic plants-industrial profiles. Ed.
- 53-Kjeldahl, J. G. C. T. (1883). A new method for the estimation of nitrogen in organic compounds. *Z. Anal. Chem*, 22(1), 366.
- 54-Kim, I. S., Yang, M., Lee, O. H., & Kang, S. N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 44(5), 1328-1332.
- 55-Kishore G, Motion M, Hicks PM, Hansen J, Houghton-Larsen J, Hansen EH, Mikelsen MD, Tavares S, Blom C. 2011. Recombinant Production of Steviol Glycosides. International Patent Application, N° WO 2011/153378 A1. United States.
- 56-Korobko, N. V., Turko, Y. A., Shokun, V. V., Chernyak, E. N., Pokrovskii, L. M., Smetankina, O. N., & Baltaev, U. A. (2008). GC-MS investigations. II. Lipid composition of *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(3), 359-360.
- 57-LAHRECHE I, KAHINA, C. (2016). Incidence de diabète de type 2 comportement alimentaire glucidique et lipidique. *Mémoire Master recherche: Biologie Cellulaire Physio et Physiopathologie*. p85.
- 58-Lebon, G. (2003). *Le diabète de type II: prise en charge actuelle de la maladie et nouvelles perspectives thérapeutiques* (Doctoral dissertation).
- 59-Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food chemistry*, 132(3), 1121-1132.
- 60-Leutenegger, M., & Bertin, E. (1995). Diabète sucré et athérosclérose. Physiopathologie de la macroangiopathie diabétique. *La Revue de médecine interne*, 16(1), 31-42.
- 61-Lev-Ran, A., & Raskin, L. (1999). Spontaneous recovery of severe weight loss in diabetic amyotrophy. *Diabetes care*, 22(11), 1906-1906.

- 62- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E. K., & Bowles, D. J. (2001). Phylogenetic Analysis of the UDP-glycosyltransferase Multigene Family of *Arabidopsis thaliana** 210. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4338-4343.
- 63- Madhav, H., Bhasker, S., & Chinnamma, M. (2013). Functional and structural variation of uridine diphosphate glycosyltransferase (UGT) gene of *Stevia rebaudiana*—UGTSr involved in the synthesis of rebaudioside A. *Plant physiology and biochemistry*, 63, 245-253.
- 64- Magnuson, B. A., Carakostas, M. C., Moore, N. H., Poulos, S. P., & Renwick, A. G. (2016). Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews*, 74(11), 670-689.
- 65- Mao, G., Chaturvedula, V. S. P., Vick, J. E., & Yu, O. (2017). Enzymatic Synthesis and Structural Characterization of Rebaudioside D3, a Minor Steviol Glycoside of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *American Journal of Plant Sciences*, 8(03), 441.
- 66- Martelli, A., Frattini, C., & Chialva, F. (1985). Unusual essential oils with aromatic properties—I. Volatile components of *Stevia rebaudiana bertoni*. *Flavour and fragrance journal*, 1(1), 3-7.
- 67- McGarvey, B. D., Attygalle, A. B., Starratt, A. N., Xiang, B., Schroeder, F. C., Brandle, J. E., & Meinwald, J. (2003). New Non-Glycosidic Diterpenes from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of natural products*, 66(10), 1395-1398.
- 68- Midmore, D. J., & Rank, A. H. (2002). *A new rural industry-Stevia-to replace imported chemical sweeteners* (pp. 1-23). Wagga Wagga, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation.
- 69- Mona, I. M., & Wafaa, A. A. (2005). Synergistic Effects of some alternative sweeteners on the unpleasant attributes of stevia sweetener and its application in some fruit drinks. *Food Science & Technology*, 2(2), 1-10.
- 70- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., & Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana Bertoni* leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1865-1872.
- 71- Orban, J. C., Giunti, C., Levraut, J., Grimaud, D., & Ichai, C. (2003, May). L'acidose lactique reste une complication grave du traitement par métformine. In *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* (Vol. 22, No. 5, pp. 461-465). Elsevier Masson.
- 72- Oshima, Y., Saito, J. I., & Hikino, H. (1986). Sterebins A, B, C and D, bisnorditerpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. *Tetrahedron*, 42(23), 6443-6446.

- 73- Paul, S., Sengupta, S., Bandyopadhyay, T. K., & Bhattacharyya, A. (2012). Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutrition and cancer*, 64(7), 1087-1094.
- 74- Perera, W. H., Ghiviriga, I., Rodenburg, D. L., Alves, K., Bowling, J. J., Avula, B., & McChesney, J. D. (2017). Rebaudiosides T and U, minor C-19 xylopyranosyl and arabinopyranosyl steviol glycoside derivatives from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. *Phytochemistry*, 135, 106-114.
- 75- Pieri, V., Belancic, A., Morales, S., & Stuppner, H. (2011). Identification and quantification of major steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* purified extracts by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 4378-4384.
- 76- Prakash, I., Ma, G., Bunders, C., Charan, R. D., Ramirez, C., Devkota, K. P., & Snyder, T. M. (2017). A novel diterpene glycoside with nine glucose units from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biomolecules*, 7(1), 10.
- 77- Purkayastha, S., Pugh Jr, G., Lynch, B., Roberts, A., Kwok, D., & Tarka Jr, S. M. (2014). In vitro metabolism of rebaudioside B, D, and M under anaerobic conditions: comparison with rebaudioside A. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(2), 259-268.
- 78- Purkayastha, S., Bhusari, S., Pugh, G., Teng, X., Kwok, D., & Tarka, S. M. (2015). In vitro metabolism of rebaudioside E under anaerobic conditions: comparison with rebaudioside A. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72(3), 646-657.
- 79- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., ... & Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55-60.
- 80- Queen's Printer and Controller of HMSO. Diabète. NHS choices, 2008. P01.
- 81- Ranjan, R., Jaiswal, J., & Jena, J. (2011). *Stevia* as a natural sweetener. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 1(4), 1199-1202.
- 82- Rather, A. H., Singh, S., Suhail, B., & Patel, G. (2019). *Stevia* (Meethi Patti) as an alternative form of sugar. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(2), 453-457.
- 83- Richard, J. L., & Schuldiner, S. (2008). Épidémiologie du pied diabétique [Epidemiology of diabetic foot problems]. *Rev. Med. Interne*, 29(Suppl. 2), S222-S230.
- 84- Richman, A., Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R., & Brandle, J. (2005). Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *The Plant Journal*, 41(1), 56-67.

- 85- Roussel, R. (2011). Histoire naturelle de la néphropathie diabétique. *Médecine des maladies métaboliques*, 5, S8-S13.
- 86- Savita, S. M., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A. G., & Ramakrishna, P. (2004). *Stevia rebaudiana*—A functional component for food industry. *Journal of Human Ecology*, 15(4), 261-264.
- 87- Sheeja, R. R., & Lawrence, B. (2015). Phytochemical screening of the leaves of *Stevia rebaudiana*, Bertoni. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), 344-347.
- 88- Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F., & Kaul, V. K. (2013). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications*, 27(2), 103-113.
- 89- Sholichin, M., Yamasaki, K., Miyama, R., Yahara, S., & Tanaka, O. (1980). Labdane-type diterpenes from *Stevia rebaudiana* [leaves]. *Phytochemistry*.
- 90- Singh, G., Singh, G., Singh, P., Parmar, R., Paul, N., Vashist, R., & Sharma, R. K. (2017). Molecular dissection of transcriptional reprogramming of steviol glycosides synthesis in leaf tissue during developmental phase transitions in *Stevia rebaudiana* Bert. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- 91- Singh, D. P., Kumari, M., Prakash, H. G., Rao, G. P., & Solomon, S. (2019). Phytochemical and pharmacological importance of stevia: A calorie-free natural sweetener. *Sugar Tech*, 21(2), 227-234.
- 92- Soejarto, D. D., Kinghorn, A. D., & Farnsworth, N. R. (1982). Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *Journal of natural products*, 45(5), 590-599.
- 93- Soejarto, D.D. 2002. Ethnobiology of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In *Stevia the genus Stevia* (Medicinal and Aromatic Plants— Industrial Profiles), ed. A.D. Kinghorn, 40–67. New York: Taylor and Francis.
- 94- Suweesha A. (2021). *Stevia rebaudiana*—A review on agricultural, chemical and industrial applications. *Journal of Nature and Applied Research*, 1(1), 14-27.
- 95- Tadhani, M. B., & Subhash, R. (2006). In vitro antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 557-560.
- 96- Tenoutasse, S., Mouraux, T., & Dorchy, H. (2010). L'acidocétose diabétique: diagnostic, prise en charge, prévention. *Rev Med Brux*, 31, 71-6.

- 97- Thomas, J., & Glad, M. J. (2010). Stevia: It's Not Just About Calories. *The Open Obesity Journal*, 2, 101-109.
- 98- Toskulkao, C., Sutheera watananon, M., Wanichanon, C., Saitongdee, P., & Suttajit, M. (1995). Effects of stevioside and steviol on intestinal glucose absorption in hamsters. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 41(1), 105-113.
- 99- Turko, Y. A., Korobko, N. V., Shokun, V. V., Chernyak, E. N., Vyalkov, A. I., Stepankina, O. N., Kerimzhanova, B. F. and Baltaev, U. A. 2007. GC—MS research. I. Essential oil from *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds* 43 (6): 744–745.
- 100- Wang, J., & Hou, B. (2009). Glycosyltransferases: key players involved in the modification of plant secondary metabolites. *Frontiers of Biology in China*, 4(1), 39-46.
- 101- Wagner, H. (1979). Phenolic compounds in plants of pharmaceutical interest. In *Biochemistry of Plant Phenolics* (pp. 589-616). Springer, Boston, MA.
- 102- Wheeler, A., Boileau, A. C., Winkler, P. C., Compton, J. C., Prakash, I., Jiang, X., & Mandarino, D. A. (2008). Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), S54-S60.
- 103- Willi, C., Bodenmann, P., Ghali, W. A., Faris, P. D., & Cornuz, J. (2007). Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 298(22), 2654-2664.
- 104- Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A., & Wüst, M. (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*, 231(4), 581-588.
- 105- Wölwer-Rieck, U. (2012). The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(4), 886-895.
- 106- Yang, Y. H., Huang, S. Z., Han, Y. L., Yuan, H. Y., Gu, C. S., & Zhao, Y. H. (2014). Base substitution mutations in uridinediphosphate-dependent glycosyltransferase 76G1 gene of *Stevia rebaudiana* causes the low levels of rebaudioside A: mutations in UGT76G1, a key gene of steviol glycosides synthesis. *Plant physiology and biochemistry*, 80, 220-225.