

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 30.06.17.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 04.01.19 Bulletin 19/01.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés : Division demandée le 30/06/17 béné-
ficiant de la date de dépôt du 18/01/17 de la
demande initiale n° 1750390.

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : YNSECT Société par actions simpli-
fiée — FR.

⑦② Inventeur(s) : MOTTE CONSTANT, ARMENJON
Benjamin, HUBERT ANTOINE et BÉREZINA NATHA-
LIE.

⑦③ Titulaire(s) : YNSECT Société par actions simplifiée.

⑦④ Mandataire(s) : SANTARELLI.

⑤④ UTILISATIONS THERAPEUTIQUES D'UNE POUDRE D'INSECTES.

⑤⑦ L'invention concerne une poudre d'insectes pour son
utilisation en tant que médicament, en particulier dans le
traitement de la vibriose, affectant notamment la crevette
blanche.



5 La présente invention se rapporte à une poudre d'insectes et à son utilisation, notamment en aquaculture.

 L'aquaculture est aujourd'hui l'un des secteurs les plus dynamiques de l'industrie alimentaire. L'aquaculture concerne notamment les productions de poissons (pisciculture), de coquillages (conchyliculture) ou encore de crustacés (astaciculture et
10 pénéculture).

 La forte demande en poissons a eu pour conséquence d'augmenter significativement le prix des aliments destinés à l'élevage des poissons, coquillages et crustacés.

 L'un des produits les plus utilisé dans l'aquaculture est la farine de poisson. C'est
15 une farine très riche en protéines animales (riche en acides aminées type lysine et méthionine), facile à digérer. Une demande croissante accompagnée d'une offre limitée a eu pour conséquence d'un augmenter significativement son prix, engendrant un risque pour la croissance durable de l'aquaculture. Ainsi, il y existe une forte demande en sources alternatives de protéines de qualité élevée, et dans la mesure du
20 possible, renouvelables, pour les aliments de l'aquaculture.

 Les poudres d'insectes ou farine d'insectes proposent des sources protéiques naturelles de remplacement, ainsi que la possibilité d'être produite en masse avec une empreinte écologique minimale. En particulier, certains coléoptères tels que *Tenebrio molitor* présentent l'intérêt de pouvoir être adaptés à une production en masse
25 intensive.

 Par ailleurs, les élevages de poissons, de coquillages ou de crustacés, du fait du regroupement d'un nombre important d'individus dans les bassins d'élevage, sont très fréquemment assujettis à des épidémies d'origine bactérienne telle que par exemple *Vibrio parahaemolyticus* qui a décimé plus de 70% de la population de crevettes
30 d'élevage dans certaines régions.

Vibrio parahaemolyticus est une bactérie qui infecte principalement les coquillages (notamment les huîtres et les moules), les crustacés (en particulier les crevettes) et les poissons. Cette bactérie est transmissible à l'homme, notamment lors de l'ingestion de coquillage, crustacé ou poisson infecté et cause des entérites et gastro-entérites.

35

Il existe donc un besoin en un moyen efficace de prévenir le risque d'infections et/ou de combattre efficacement les épidémies bactériennes.

A cet effet, les inventeurs ont mis en évidence que l'administration de poudre d'insectes permettait prévenir et de guérir des infections bactériennes.

5 Aussi, la présente invention concerne donc une poudre d'insecte pour une utilisation en tant que médicament.

Par « poudre d'insectes », on entend une composition, sous forme de particules, préparée uniquement à partir d'insectes et éventuellement d'eau.

10 Le taux d'humidité résiduel de la poudre d'insectes est compris entre 2 et 15%, de préférence entre 5 et 10%, plus préférentiellement, entre 4 et 8%. Ce taux d'humidité peut par exemple être déterminé selon la méthode issue du règlement CE 152/2009 du 27-01-2009 (103 °C / 4 h).

On notera que dans le cadre de la présente demande, et sauf stipulation contraire, les gammes de valeurs indiquées s'entendent bornes incluses.

15 Dans toute la demande, lorsqu'aucune date n'est précisée pour un règlement, une norme ou une directive, il s'agit du règlement, de la norme ou de la directive en vigueur à la date de dépôt.

Lorsque la poudre d'insectes est broyée à une taille de particules acceptable pour l'alimentation humaine ou animale, celle-ci peut être désignée sous l'appellation
20 « farine d'insectes ». Par « taille de particules acceptable pour l'alimentation humaine ou animale », on vise une taille de particules comprise entre 100 µm et 1,5 mm, préférentiellement comprise entre 300 µm et 1 mm, plus préférentiellement entre 500 et 800 µm.

Par « insectes », on désigne notamment les coléoptères, les diptères, les
25 lépidoptères, les orthoptères, les hyménoptères, les dictyoptères regroupant notamment les blattoptères, y inclus isoptères, et les mantoptères, les phasmoptères, les hémiptères, les hétéroptères, les éphéméroptères et les mécoptères, de préférence, les coléoptères ; ou leurs mélanges.

Préférentiellement, les coléoptères préférés selon l'invention appartiennent aux
30 familles des Tenebrionidae, Melolonthidae, Dermestidae, Coccinellidae, Cerambycidae, Carabidae, Buprestidae, Cetoniidae, Dryophthoridae, ou leurs mélanges.

Plus préférentiellement, il s'agit des coléoptères suivants : *Tenebrio molitor*,
Alphitobius diaperinus, *Zophobas morio*, *Tenebrio obscurus*, *Tribolium castaneum* et
35 *Rhynchophorus ferrugineus* ; ou leurs mélanges.

Avantageusement, la poudre d'insectes est obtenue à partir du stade larvaire des espèces d'insectes visées ci-avant.

La poudre d'insectes selon l'invention peut être administrée à l'homme ou à l'animal en vue d'un traitement préventif et/ou curatif.

5 Cette poudre d'insectes permet notamment de lutter efficacement contre les infections bactériennes causées par des bactéries du genre *Vibrio species*, en particulier les infections bactériennes causées par *Vibrio parahaemolyticus*.

En effet, lorsque l'on nourrit des crevettes blanches infectées par *Vibrio parahaemolyticus* avec de la poudre d'insectes plutôt qu'avec de la farine de poisson,
10 le taux de mortalité des crevettes blanches s'en trouvait limité. Cela résulte probablement d'un renforcement des défenses immunitaires des crevettes blanches, due à une stimulation leur système immunitaire et/ou à un meilleur développement de leur cellules hépatocytaires (voir Exemple 4 ci-après).

Plus particulièrement, l'invention vise une poudre d'insectes pour une utilisation
15 dans le traitement de la vibriose.

Par « vibriose », on entend toutes infections bactériennes causées par des bactéries du genre *Vibrio spp*, appartenant à la famille des *Vibrionaceae*, bactéries vivant dans l'eau. Comme indiqué ci-avant, ces bactéries possèdent un pouvoir pathogène contre les hommes (pouvant créer des infections graves) et/ou contre les
20 animaux, notamment les animaux aquatiques pouvant ainsi contaminer l'homme par le biais de son alimentation.

De préférence, ces bactéries sont *Vibrio aestuarianus* responsable de la maladie de l'huître, *Vibrio parahaemolyticus* responsable d'entérites et de gastro-entérites ou *Vibrio splendidus* responsable de la maladie infectieuse de l'huître creuse. De
25 préférence, la poudre d'insectes est destinée à une utilisation dans le traitement de la vibriose causée par *Vibrio parahaemolyticus*.

Plus particulièrement, la poudre d'insectes peut être utilisée dans le traitement de la vibriose chez les mollusques et les crustacés.

Par « mollusques », on désigne un animal invertébré à corps mou, composé d'une
30 tête, d'un pied et d'une masse viscérale. Parmi les sept classes de mollusques, on peut citer trois grands embranchements : les gastéropodes, les bivalves et les céphalopodes.

Les gastéropodes regroupent notamment les escargots, les limaces ou encore les patelles. Les bivalves regroupent notamment les moules, les huîtres ou encore les

palourdes. Les céphalopodes regroupent notamment les poulpes, les calmars ou encore les seiches.

Les mollusques visés par l'invention peuvent être des animaux terrestres ou aquatiques, de préférence aquatiques. Par « aquatique », on entend des animaux d'eaux douces ou des animaux marins, de préférence marins.

De préférence, les mollusques visés par l'invention appartiennent aux groupes des bivalves comprenant notamment les *Palaeotaxodonta*, les *Cryptodonta*, les *Pteriomorphia*, les *Palaeoheterodonta*, les *Heterodonta* et les *Anomalodesmata*.

Préférentiellement, les mollusques sont choisis parmi les *Mytilida* (moules) et les *Ostreida* (huîtres). Les *Ostreida* regroupent notamment les *Ostrea*, les *Crassostrea* (huîtres creuses), les *Ostreola* (huîtres plates) ou encore les *Saccostrea*.

En particulier, les espèces visées de mollusques sont : *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes rhomboides* (palourde rose), *Venerupis decussata* (palourde grise européenne), *Venerupis philippinarum* (palourde grise japonaise), *Venerupis aurea* (palourde dorée), *Corbicula fluminea* (palourde asiatique), *Ostrea edulis* (huître gravette), *Crassostrea angulata* (Huître portugaise), *Crassostrea gigas* (huître japonaise), *Ostreola conchaphila* (huître olympique), *Crassostrea virginica* (huître américaine ou huître de Virginie).

Par « crustacés », on désigne des animaux dont le corps est revêtu d'un exosquelette chitinoprotéique appelé exocuticule qui est souvent imprégné de carbonate de calcium. Ce groupe comporte des animaux de tailles variables appartenant aux classes inférieures telles que les *Branchiopoda*, les *Cephalocarida*, les *Malacostraca*, les *Maxillopoda*, les *Ostracoda*, les *Remipedia*.

Encore plus préférentiellement, les espèces de crustacés visés par l'invention appartiennent à l'ordre des décapodes.

Par « décapodes », on désigne des crustacés possédant 5 paires de pattes. Les espèces de décapodes sont regroupées en deux sous-classes : les *Dendrobranchiata* et les *Pleocyemata*.

Parmi les *Dendrobranchiata*, on peut citer, de leur nom vernaculaire, les gambas appartenant à la super-famille des *Penaeoidea* *Rafinesque*.

Parmi les *Pleocyemata*, on peut citer, de leur nom vernaculaire, les galathées appartenant à l'infra-ordre des *Anomourea*, les crabes appartenant à la subsection des *Heterotremata* ou aux infra-ordres des *Brachyura* ou des *Paguroidea*, les crevettes appartenant à l'infra-ordre *Caridea*, les écrevisses et les homards appartenant à l'infra-ordre des *Astacidea* ou encore langoustes appartenant à l'infra-ordre des *Chelata*.

De préférence, les crustacés visés par l'invention sont des crevettes. Les crevettes peuvent être des espèces marines ou dulcicoles. De façon avantageuse, il s'agit d'espèces de crevettes adaptées à la pénéculture ou à l'élevage d'eau douce.

Avantageusement, les espèces de crevettes visées par l'invention appartiennent à
5 la famille des *Penaeidae* et notamment au genre *Penaeus*.

Préférentiellement, les espèces de crevettes visées par l'invention sont les suivantes : la crevette à pattes blanches (*Litopenaeus vannamei*), la crevette géante tigrée (*Penaeus monodon*), la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*), la crevette charnue (*Penaeus chinensis*), la crevette impériale ou crevette japonaise (*Penaeus japonicus*),
10 la crevette blanche des Indes (*Penaeus indicus*), la crevette banane (*Penaeus merguensis*), la crevette akiامي (*Metapenaeus spp*) et la crevette géante d'eau douce (*Macrobrachium rosenbergii*), encore préférentiellement *Litopenaeus vannamei*.

Les crevettes ont plusieurs stades de développement, trois stades larvaires, à savoir Nauplius, Zoés, Mysis, puis elles se métamorphosent en post-larves. La poudre
15 d'insectes est particulièrement adaptée aux stades post-larvaire et/ou adulte.

L'invention concerne donc tout particulièrement une poudre d'insectes pour une utilisation dans le traitement de la vibriose chez les bivalves et les décapodes.

Elle concerne également une poudre d'insectes pour une utilisation dans le traitement de l'entérite de la crevette.

20 En particulier, la poudre d'insectes peut être utilisée pour une utilisation dans le traitement du syndrome de mortalité précoce de la crevette / syndrome de nécrose hépatopancréatique aiguë chez la crevette.

Le syndrome de mortalité précoce de la crevette / syndrome de nécrose hépatopancréatique aiguë (dit de « EMS/AHPNS ») est responsable d'un taux de
25 mortalité chez la crevette infectée par *Vibrio parahaemolyticus* dépassant les 70%.

Lorsqu'elle est infectée, la crevette paraît affaiblie et désorientée. Elle présente parfois des blessures noires sur sa cuticule. Certaines souches bactériennes très virulentes peuvent décimer jusqu'à 80% des crevettes d'élevages telles que les crevettes géantes tigrées (*Penaeus monodon*) et les crevettes à pattes blanches
30 (*Penaeus vannamei*).

Avantageusement, la poudre d'insectes selon l'invention comporte au moins 67% en poids de protéines et au moins 0,1% en poids de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes.

Par « protéines », on vise la quantité de protéines brutes. La quantification des
35 protéines brutes est bien connue de l'homme du métier. A titre d'exemple, on peut citer

la méthode Dumas ou la méthode Kjeldhal. De préférence, la méthode Dumas, correspondant à la norme NF EN ISO 16634-1 (2008) est utilisée.

Des exemples d'une telle poudre sont décrits dans les Exemples 1 à 3 ci-après.

5 Préférentiellement, la poudre d'insectes comporte 68% en poids de protéines brutes, plus préférentiellement 70% en poids de protéines brutes, plus préférentiellement 71% en poids de protéines brutes, les pourcentages en poids étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes.

10 Selon l'invention, par « chitine », on entend tout type de dérivé chitinique, c'est-à-dire de dérivé de polysaccharides comportant des unités N-acétyl-glucosamine et des unités D-glucosamines, en particulier les copolymères chitine-polypeptides (parfois désignés sous l'appellation « composite chitine-polypeptides »). Ces copolymères peuvent également être associés à des pigments, souvent de type mélanine.

15 La chitine serait le deuxième polymère le plus synthétisé dans le monde vivant après la cellulose. En effet, la chitine est synthétisée par de nombreuses espèces du monde vivant : elle constitue en partie l'exosquelette des crustacés et des insectes et la paroi latérale qui entoure et protège les champignons. Plus particulièrement, chez les insectes, la chitine constitue ainsi 3 à 60% de leur exosquelette.

La détermination du taux de chitine est effectuée par extraction de celle-ci. Une telle méthode peut être la méthode AOAC 991.43.

20 Selon un premier mode de réalisation, la poudre d'insectes selon l'invention comporte au moins 67% en poids de protéines et au moins 5% en poids de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes.

25 Préférentiellement, cette poudre d'insecte comporte entre 5 et 16% en poids de chitine, plus préférentiellement entre 8 et 14% de chitine, les pourcentages en poids étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes.

Avantageusement, cette poudre d'insectes présente une teneur en cendres inférieure ou égale à 4% en poids sur le poids total de poudre d'insectes, et encore plus avantageusement inférieure ou égale à 3,5%.

30 Les cendres constituent le résidu résultant de la combustion de la composition selon l'invention.

La méthode de détermination de la teneur en cendres est bien connue de l'homme du métier. De préférence, les cendres ont été déterminées selon la méthode relevant du règlement CE 152/2009 du 27-01-2009.

La teneur en matière grasse de cette poudre d'insectes est de préférence comprise entre 5 et 20% en poids sur le poids total de poudre d'insectes, plus préférentiellement entre 9 et 17%.

Les méthodes de détermination de la teneur en matière grasse sont bien connues de l'homme du métier. A titre d'exemple et de manière préférée, la détermination de cette teneur sera effectuée en suivant la méthode du règlement CE 152/2009.

Avantageusement, les protéines de cette poudre d'insectes présentent une digestibilité supérieure ou égale à 85% en poids sur le poids total de protéines brutes.

La digestibilité est une digestibilité pepsique mesurée par la méthode décrite dans la directive 72/199/CE.

De préférence, la digestibilité est supérieure ou égale à 86%, plus préférentiellement, supérieure ou égale à 88%.

Avantageusement, cette poudre d'insectes selon l'invention comporte entre 35 et 65% en poids de protéines solubles par rapport au poids total de protéines, et au moins 50% des protéines solubles ont une taille inférieure ou égale à 12400g/mol.

Par « poids total de protéines », on entend le poids de protéines brutes présentes dans la poudre d'insectes selon l'invention.

Par « protéines solubles », on entend, parmi les protéines brutes, celles qui sont solubles dans une solution aqueuse dont le pH est compris entre 6 et 8, avantageusement entre 7,2 et 7,6.

De préférence, la solution aqueuse est une solution tampon dont le pH est compris entre 6 et 8, avantageusement entre 7,2 et 7,6. Préférentiellement, la solution tampon est une solution tampon phosphate NaCl, dont le pH est égal 7,4 +/- 0,2.

Avantageusement, cette poudre d'insectes comporte entre 38 et 60% en poids, de préférence entre 43 et 55% en poids de protéines solubles par rapport au poids total de protéines.

De préférence, au moins 60%, préférentiellement au moins 70% des protéines solubles ont une taille inférieure ou égale à 12400g/mol.

Plus particulièrement, les protéines solubles ont une taille comprise entre 6500 et 12400g/mol.

Avantageusement, moins de 10%, de préférence moins de 8%, plus préférentiellement moins de 6% de protéines solubles ont une taille supérieure ou égale à 29000g/mol.

Cette poudre d'insectes peut être préparée par un procédé comportant les étapes suivantes :

- i) abattage des insectes,
- ii) pressage des insectes pour obtenir un gâteau de presse, et
- iii) broyage du gâteau de presse.

L'abattage des insectes peut être effectué par ébouillantage ou blanchiment,
5 comme cela est plus amplement décrit ci-après l'Exemple 1 ci-après.

De même, les étapes de pressage et de broyage sont plus amplement décrites dans cet Exemple.

Enfin, le procédé de préparation selon l'invention peut comporter en outre une étape de séchage du gâteau de presse.

10 L'étape de séchage est avantageusement réalisée après l'étape de pressage et avant l'étape de broyage et est également décrite plus amplement dans l'Exemple 1 ci-après.

Selon un second mode de réalisation, la poudre d'insectes selon l'invention comporte au moins 71% en poids de protéines et comporte entre 0,1 et 2% en poids
15 de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes.

De préférence, cette poudre d'insectes a une teneur en protéines supérieure ou égale à 72% en poids, plus préférentiellement supérieure ou égale à 74% en poids, encore plus préférentiellement supérieure ou égale à 75% en poids, sur le poids sec total de poudre.

20 Plus particulièrement, cette poudre a une teneur en chitine comprise entre 0,5 et 3% en poids, plus préférentiellement comprise entre 0,8 et 2% en poids, encore plus préférentiellement comprise entre 0,8 et 1,7% en poids sur le poids sec total de poudre.

De préférence, cette poudre comprend entre 5 et 20% en poids, de préférence
25 entre 7 et 17% en poids de lipides, sur le poids sec total de poudre.

Plus particulièrement, cette poudre comprend entre 1 et 10% en poids, de préférence entre 2 et 6% en poids de cendres, sur le poids sec total de poudre.

Avantageusement, les protéines de cette poudre d'insectes présentent une digestibilité supérieure ou égale à 85% en poids sur le poids total de protéines brutes.

30 De préférence, la digestibilité est supérieure ou égale à 88%, plus préférentiellement, supérieure ou égale à 92%.

Cette poudre d'insectes peut être préparée par un procédé comportant les étapes suivantes :

- abattage des insectes,
- 35 - la séparation des cuticules de la partie molle des insectes,

- la séparation de la partie molle des insectes en une fraction solide, une fraction huileuse et une fraction aqueuse,
- le séchage de la fraction solide pour obtenir une fraction solide sèche;
- le broyage de la fraction solide sèche pour obtenir une poudre d'insectes.

5 L'abattage des insectes peut être effectué par ébouillantage ou blanchiment, comme cela est plus amplement décrit ci-après l'Exemple 1 ci-après.

La cuticule est la couche externe (ou exosquelette) sécrétée par l'épiderme des insectes. Elle est en général formée de trois couches : l'épicuticule, l'exocuticule et l'endocuticule.

10 Par « partie molle », on vise la chair (comportant notamment les muscles et les viscères) et le jus (comportant notamment les liquides biologiques, l'eau et l'hémolymphe) des insectes. En particulier, la partie molle ne consiste pas en le jus des insectes.

La séparation des cuticules de la partie molle des insectes peut être effectuée à l'aide d'un filtre presse ou d'un séparateur à bande.

Par séparateur à bande, on vise un dispositif qui comporte une bande de serrage (ou bande presseuse) et un tambour perforé.

Avantageusement, la poudre d'insectes selon l'invention est obtenue à partir d'une espèce d'insectes appartenant à l'ordre des coléoptères, de préférence à partir de l'espèce *Tenebrio molitor*, et ce quel que soit le mode de réalisation de l'invention. La

20 poudre d'insecte selon l'invention est alors une poudre de coléoptères.

L'invention vise donc plus particulièrement une poudre de coléoptères pour une utilisation :

- en tant que médicament,
- 25 - dans le traitement de la vibriose, notamment chez les bivalves et les décapodes,
- dans le traitement de l'entérite de la crevette, et/ou
- dans le traitement du syndrome de mortalité précoce de la crevette / syndrome de nécrose hépatopancréatique aiguë chez la crevette.

30 L'invention concerne en outre un régime alimentaire pour mollusque et/ou crustacés, comportant au moins 5 % en poids de poudre d'insectes.

La poudre d'insectes selon l'invention peut être utilisée comme alternative à la farine de poisson généralement administrée dans le régime alimentaire des mollusques et des crustacés. Elle peut remplacer partiellement ou en totalité la farine

35 de poisson. Préférentiellement, la poudre d'insectes remplace la farine de poisson à 50

% ou plus, en poids de farine de poisson, encore préférentiellement à 75 % ou plus, en poids de farine de poisson.

La substitution de la farine de poisson par de la poudre d'insectes permet avantageusement d'améliorer le système immunitaire des mollusques et/ou des crustacés, notamment du fait de la grande digestibilité des protéines et des lipides de la poudre d'insectes. En outre, cela augmente la densité, ainsi que la longueur des villosités intestinales, en particulier chez la crevette blanche tout en augmentant la taille des cellules hépatocytaires. Aussi, cette substitution de farine de poisson par de la poudre d'insectes présente une alternative riche en protéines et en lipides, peu onéreuse et qui permet de prévenir et/ou de guérir certaines maladies telles que la vibriose de la crevette.

Le régime alimentaire administré aux mollusques ou aux crustacés, comporte avantageusement au moins 10 % en poids de poudre d'insectes, préférentiellement au moins 15% en poids de poudre d'insectes, encore préférentiellement au moins 25% en poids de poudre d'insectes.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le régime alimentaire administré aux mollusques ou aux crustacés, comportant 20 % en poids de poudre d'insectes.

Préférentiellement, la poudre d'insectes remplace en totalité la farine de poisson généralement administrée aux mollusques et aux crustacés. Aussi, le régime alimentaire administré aux mollusques ou aux crustacés, comporte avantageusement 25 % en poids de poudre d'insectes.

Ce régime est particulièrement adapté aux crevettes, les autres constituants du régime, ainsi que leurs proportions, étant définis le manuel publié par le National Research Council (NRC) en 2011.

Avantageusement, le régime alimentaire selon l'invention la comprend une poudre d'insectes comportant au moins 71% en poids de protéines et comprenant entre 0,1 et 2% en poids de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes.

De préférence, la poudre d'insectes est une poudre de coléoptères, plus préférentiellement de *Tenebrio molitor*.

L'invention concerne par ailleurs, l'utilisation d'une poudre d'insectes comportant au moins 67% en poids de protéines et comprenant au moins 0,1% en poids de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes, comme complément alimentaire dans la nutrition humaine ou animale.

La poudre d'insectes utilisée comme complément alimentaire dans la nutrition humaine ou animale peut comporter au moins 67% en poids de protéines et au moins 5% en poids de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes. Il s'agit alors de la poudre d'insectes du premier mode de réalisation décrit ci-avant, y inclus toutes les caractéristiques avantageuses, particulières et préférées et son procédé d'obtention.

Alternativement, la poudre d'insectes utilisée comme complément alimentaire dans la nutrition humaine ou animale peut comporter au moins 71% en poids de protéines et comprenant entre 0,1 et 2% en poids de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes. Il s'agit alors de la poudre d'insectes du second mode de réalisation décrit ci-avant, y inclus toutes les caractéristiques avantageuses, particulières et préférées et son procédé d'obtention.

Avantageusement, la poudre d'insectes est une poudre de coléoptères, de préférence de *Tenebrio molitor*.

L'invention concerne avantageusement, l'utilisation d'une poudre d'insectes, notamment telles que décrites ci-avant, comme complément alimentaire dans la nutrition des mollusques et des crustacés.

Avantageusement, la poudre d'insectes est utilisée comme complément alimentaire dans la nutrition des crevettes, en particulier des crevettes d'élevage.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention, apparaîtront dans les exemples qui suivent, donnés à titre illustratif, avec référence à :

- la Figure 1 est un diagramme illustrant le poids final des crevettes blanches nourries selon différents régimes alimentaires, comportant ou non de la poudre d'insectes à la place de la farine de poisson ;

- la Figure 2 est un diagramme illustrant le gain de poids des crevettes blanches nourries selon différents régimes alimentaires, comportant ou non de la poudre d'insectes à la place de la farine de poisson ;

- la Figure 3 est un diagramme illustrant l'activité de la phénol oxydase en fonction de la réduction bactérienne du pathogène, chez les crevettes blanches infectées par *Vibrio parahaemolyticus* et nourries selon différents régimes alimentaires, comportant ou non de la poudre d'insectes à la place de la farine de poisson ; et

- la Figure 4 est un diagramme illustrant le taux de survie des crevettes infectées par *Vibrio parahaemolyticus* en fonction du régime alimentaire apportés, comportant ou non de la poudre d'insectes à la place de la farine de poisson.

EXEMPLE 1 : Procédé de préparation d'une poudre d'insectes

La composition selon l'invention est préparée à partir de larves de *Tenebrio molitor*. A réception des larves, ces dernières peuvent être stockées à 4°C pendant 0 à 15 jours dans leurs bacs d'élevages avant l'abattage sans dégradation majeure. Le poids des larves par rapport à l'âge des larves utilisées est variable et par conséquent leur composition peut varier, comme cela est illustré dans le Tableau 1 ci-après :

Biomasse (Insectes)	mg	23	35	58	80	108	154
Matière sèche	%*	34	34	34,2	37,9	39,6	39,5
Cendres	%*	1,59	1,52	1,6	1,75	1,67	1,43
Protéines brutes	%*	22,6	22,2	22	23,2	23,1	23,2
Lipides	%*	6,62	6,88	7,98	10,3	10,9	11,7

* Les % sont exprimés en poids sec par rapport au poids humide de larves.

Tableau 1 : Composition biochimique des larves de *Tenebrio molitor* selon leur poids.

• **Etape 1 : Blanchiment des insectes**

Les larves vivantes (+ 4°C à + 25°C) sont convoyées en couche d'épaisseur comprise entre 2 et 10 cm, sur un tapis à bande perforé (1mm) jusqu'à une chambre de blanchiment. Les insectes sont ainsi blanchis à la vapeur (buses ou lit de vapeur) à 98°C ou bien à l'eau à 100°C (buses d'aspersion) ou en mode mixte (eau + vapeur). Le temps de séjour dans la chambre de blanchiment est compris entre 1 à 15 minutes, idéalement 5 min.

La température des larves en sortie de blanchiment est comprise entre 75°C et 98°C.

• **Etape 2 : Pressage**

Les larves, une fois blanchies, sont convoyées jusqu'à la trémie d'alimentation d'une presse mono-vis continue. Les larves lors du passage en presse sont maintenues à une température supérieure à 70°C pour augmenter les rendements de déshuilage. Le principe de déshuilage est de mettre en pression la matière à l'intérieur d'une cage cylindrique au moyen d'un arrangement de vis et de bagues disposées sur l'axe central. La cage est tapissée à l'intérieur de barreaux répartis en section et maintenus écartés par des espaces d'épaisseurs différentes suivant la zone de travail. Les interstices ainsi ménagés permettent l'écoulement d'une fraction huile et limitent le

passage de la matière dite « sèche », la fraction protéique, que l'on appellera « gâteau de presse », participant de la sorte à la mise en pression.

Les rendements de pressage obtenus sont compris entre 48 et 55 %.

$$R_{\text{gâteau}} = (\text{masse}_{\text{gâteau}} / \text{masse}_{\text{jus}} + \text{masse}_{\text{gâteau}})$$

- 5 Le gâteau de presse obtenu contient 35 à 40 % de matières sèches, 67 à 75 % de protéines et 13 à 17 % de matières grasses, les pourcentages en poids étant donnés sur le poids sec de gâteau de presse.

• **Etape 3 : Séchage**

- 10 Le gâteau de presse est ensuite disposé sur plateau en couche fine (2 cm environ) et, est séché en air ventilé/brassé à 90°C pendant 5 heures afin d'obtenir un gâteau de presse ayant une teneur en matière sèche supérieure à 92%.

Cette étape permet de se prémunir de toute contamination ayant eu lieu depuis l'abattage.

- 15 L'Aw (activité en eau) en sortie séchage est de 0,35. Les résultats microbiologiques montrent une absence de Salmonella spp (méthode : IRIS Salmonella BKR 23/07-10/11) et des valeurs en Entérobactéries inférieures à 10 UFC/g (méthode : NF ISO 2128-2, décembre 2004, 30°C et 37°C).

• **Etape 4 : Broyage**

- 20 Le gâteau de presse séché, comportant majoritairement des protéines, est enfin broyé à l'aide d'un broyeur à marteau continu (6 mobiles réversibles – épaisseur 8 mm). Le broyeur est alimenté par une trémie avec trappe de réglage de débit (180kg/h). La grille perforée utilisée pour contrôler la granulométrie en sortie est de 0,8 mm. La vitesse de rotation du moteur est de 3000tr/min (motorisation électrique, puissance absorbée 4kW (5,5 CV)).

25

EXEMPLE 2 : Caractérisation de la poudre d'insectes obtenue dans l'Exemple 1

La poudre d'insectes préparée à l'Exemple 1 a été caractérisée.

1. Analyses

1.1 Détermination du taux d'humidité

- 30 Le taux d'humidité est déterminé selon la méthode issue du règlement CE 152/2009 du 27-01-2009 (103 °C / 4 h).

1.2 Détermination de la quantité de protéines brutes

Les protéines brutes sont déterminées selon la méthode, dite de Dumas, et correspondant à la norme NF EN ISO 16634-1 (2008).

35

1.3 Détermination de la quantité de chitine

Les fibres alimentaires de la farine des insectes sont essentiellement composées de chitine, cette dernière a donc été dosée suivant la méthode AOAC 991.43. Les valeurs ainsi obtenues sont par conséquent légèrement surestimées.

1.4 Détermination de la quantité de matière grasse

- 5 La matière grasse a été déterminée suivant la méthode du règlement CE 152/2009.

1.5 Détermination de la quantité de cendres

Les cendres brutes ont été déterminées selon la méthode relevant du règlement CE 152/2009 du 27-01-2009.

1.6 Détermination de la quantité de phosphore

- 10 Le phosphore est dosé par ICP (« induced coupled plasma ») avec étalonnage interne.

1.7 Détermination de l'énergie

La valeur énergétique est obtenue avec les coefficients du règlement UE 1169/2011.

1.8 Détermination des quantités en acides aminés et en acides gras

- 15 Cette détermination a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse après hydrolyse et dérivation des acides aminés et acides gras respectivement.

1.9 Détermination de la digestibilité pepsique

La digestibilité pepsique est mesurée par la méthode décrite dans la directive 72/199/CE.

2. Résultats

- 20 La poudre d'insectes est détaillée dans le Tableau 2 ci-après.

Macronutriment	Unité	Composition	Acides gras	Unité	Composition
Humidité	%*	5,32	C12:0	%*	0,03
Protéine	%*	67,09	C14:0	%*	0,22
Chitine	%*	8,0	C15:0	%*	0,01
Matière grasse	%*	13,6	C16:0	%*	1,33
Cendre	%*	3,21	C16:1	%*	0,05
Phosphore total	%*	0,75	C16:1n-7	%*	0,16
Énergie	MJ/kg	23,74	C17:0	%*	0,02
			C17:1	%*	0,01

Acides aminés	Unité	Composition	C18:0	%*	0,35
Arginine	%*	2,56	C18:1n-9	%*	3,03
Histidine	%*	1,39	C18:1n-7	%*	0,04
Isoleucine	%*	2,11	C18:2n-6	%*	2,96
Leucine	%*	3,99	C18:2tn-6	%*	0,02
Lysine	%*	3,32	C18:3n-3	%*	0,14
Thréonine	%*	1,87	C20:0	%*	0,02
Valine	%*	2,91	C20:1n-9	%*	0,01
Méthionine	%*	1,43	C20:2n-6	%*	0,01
Cystéine	%*	0,63	C22:0	%*	0,01
Phénylalanine	%*	1,98	* Les pourcentages en poids sont exprimés sur le poids total de composition de poudre.		
Tyrosine	%*	2,68			
Taurine	%*	0,42			
Acide aspartique + asparagine	%*	4,51			
Acide glutamique + glutamine	%*	6,36			
Alanine	%*	3,83			
Glycine	%*	2,54			
Proline	%*	3,18			
Serine	%*	2,94			

Tableau 2 : Composition de la poudre d'insectes

Par ailleurs, une digestibilité pepsique de 90+/-2% est obtenue.

EXEMPLE 3 : Procédé alternatif de préparation d'une poudre d'insectes

200 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100°C et contenant 200 mL d'eau préalablement portée à ébullition. Après 5 minutes, le bécher est retiré du bain-marie, les larves sont essorées, puis mixées avec un volume d'eau de 200 mL. Le liquide ainsi obtenu est passé dans une presse de type bi-vis. Le gâteau de presse ainsi obtenu est séché 24 heures dans une étuve à 70°C, puis broyé à 250 µm. On obtient ainsi une poudre d'insectes.

EXEMPLE 4 : Effets de la poudre d'insectes obtenue à l'Exemple 1 sur les crevettes blanches, notamment sur leur résistance à la bactérie pathogène *vibrio parahaemolyticus*

Trois expériences ont été menées afin d'évaluer l'appétence des poudres d'insectes chez la crevette (expérience 1), la digestibilité des protéines, des lipides et de l'énergie des poudres d'insectes chez la crevette (expérience 2) et l'efficacité de la poudre d'insectes sur la croissance et l'immunité de la crevette blanche (expérience 3).

15

1. Matériel et méthode des expériences menées

La farine de poisson utilisée pour l'ensemble de ces expériences est une farine de poisson provenant de Thaïlande (« Fish meal ») et comportant un taux de protéines brutes de 56 %, exprimé sur le poids total de ladite farine de poisson.

De la même manière, la poudre d'insectes utilisée est identique pour l'ensemble de ces expériences et correspond à la poudre d'insecte obtenue à l'Exemple 1.

Statistiques

Ces expériences ont été conçues de manière complètement aléatoire (CMCA). Toutes les données ont été analysées par ANOVA (analyse de variance). Le test à gamme multiple de Duncan a été utilisé pour déterminer les différences entre les moyennes des différents régimes alimentaires. La notation alphabétique a été utilisée pour marquer les différences au niveau significatif d'un alpha 0,05. Toutes les recherches des expériences 2 et 3 ont été menées au Laboratoire de nutrition et aliment pour animaux aquatiques, Département de l'aquaculture, Faculté des Pêches, Université Kasetsart, à Bangkok en Thaïlande.

30

Expérience 1: Test d'appétence des poudres d'insectes sur la crevette blanche par rapport à un régime alimentaire usuel constitué de 15 % de farine de poisson.

a. Les différents régimes alimentaires de l'expérience.

35

La capacité d'attraction des poudres d'insectes sur la crevette blanche a été évaluée de manière complètement aléatoire à l'aide des 5 régimes suivants, chacun répété quatre fois :

- Régime 1 (R1) : Contrôle 30 % farine de poisson (ci-après nommée FM) ;
- 5 - Régime 2 (R2) : Contrôle négatif 15 % de FM ; 0 % de poudre d'insectes (ci-après nommée INSM) ;
- Régime 3 (R3) : Contrôle négatif 10 % de FM ; 5% de INSM ;
- Régime 4 (R4) : Contrôle négatif 5% de FM ; 10% de INSM ;
- Régime 5 (R5) : Contrôle négatif 0 % de FM ; 15% de INSM ;
- 10 Quatre répliques de chaque régime ont été utilisés pour évaluer l'appétence.

b. Formulations et production des régimes alimentaires

Les régimes ont été formulés avec des ingrédients utiles pour répondre aux besoins nutritionnels connus des crevettes blanches, notamment décrit dans le manuel de référence du National Research Council (NCR) publié en 2011.

- 15 La poudre d'insectes utilisée dans les régimes alimentaires expérimentaux est celle obtenue selon l'Exemple 1.

La capacité d'attraction des poudres d'insectes sur la crevette blanche a été évaluée dans cinq régimes alimentaires détaillés ci-dessus et dont la composition est présentée dans le Tableau 3 ci-après.

- 20 Les compositions approximatives des aliments à l'essai telles que l'humidité, les protéines, les lipides, les fibres, les cendres ont été analysées conformément à la description de l'AOAC (2000), qui est la méthode internationale de référence.

Ingrédient de la formule	R1 INSM 0 % - FM 30 %	R2 INSM 0 % - FM 15 %	R3 INSM 5 % - FM 10 %	R4 INSM 10 % - FM 5 %	R5 INSM 15 % - FM 0 %
Farine de poisson	30,0	15,0	10,0	5,0	0,0
Soja	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Gluten de blé	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Poudre de foie de calmar	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Farine de blé	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0
Brisures de riz	2,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Concentré de protéine de soja	0,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Poudre d'insectes	0,0	0,0	5,0	10,0	15,0

Gluten de maïs	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Huile de thon	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Huile de soja	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Lécithine de soja	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Phosphate monocalcique	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Liant	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Prémix de vitamines	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Somme	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Composition chimique par (AOAC, 2000)					
Humidité (%)	7,38	7,14	7,09	7,25	7,18
Protéines (%)	37,38	36,88	37,06	37,84	38,81
Lipides (%)	7,18	6,50	6,97	7,23	7,60
Fibre (%)	2,69	2,95	3,09	3,33	3,68
Cendre (%)	10,39	8,02	7,70	6,58	5,96
Énergie (Kcal/Kg)	4560,14	4467,36	4477,59	4487,82	4498,05

Tableau 3 : Compositions des régimes alimentaires des crevettes blanches contenant de la poudre d'insectes à la place de la farine de poisson

c. Protocole de nourrissage des crevettes blanches

Les crevettes blanches ont été nourries par des granulés contenant 36 % de protéines brutes et 7 % de lipides bruts, à une quantité d'environ 5 % du poids corporel moyen des crevettes/jour (soit 1,5-2 % du poids corporel / repas) en déposant les aliments sur un plateau et en appliquant 3 repas par jour.

Durant 10 jours et uniquement lors du repas de 13h00, le temps nécessaire aux crevettes pour ingérer initialement la nourriture, le nombre de crevettes atteignant la nourriture dans les 15 minutes qui suivent le dépôt des aliments sur le plateau et la consommation des aliments pour un repas ont été enregistrés.

Quatre réplicas de chaque régime ont été réalisés pour évaluer la capacité d'attraction.

La nourriture non consommée a été recueillie une heure après son dépôt à partir du plateau et séchée par sublimation à -40°C (« freeze-dried »), puis pesée pour déterminer la consommation alimentaire totale.

Sur une étude de 10 jours, la ration alimentaire de chaque plateau dans chaque régime a été calculée pour déterminer l'appétence, en se focalisant sur le temps nécessaire pour ingérer l'aliment, la quantité d'aliments consommée et le nombre de crevettes consommant les aliments.

5

Expérience 2 : Étude de la digestibilité des protéines, des lipides et de l'énergie des poudres d'insectes chez la crevette blanche

La digestibilité *in vivo* des protéines, des lipides et de l'énergie de la poudre d'insectes chez la crevette blanche ont été déterminées par une méthode indirecte.

10 Trois cents crevettes avec un poids moyen de 5 à 8 g ont été réparties de façon aléatoire dans chacun des vingt aquariums. Dix répétitions avec dix crevettes, chacune nourrie avec un régime de référence alimentaire composé de 25 % de farine de poisson et de 5% de farine de calmar, de 63,7 % de farine de blé, de gluten et d'isolat de soja et lécithine de soja, de 3 % d' un mélange d'huile de thon et de soja, de 3,3 %

15 de prémix de vitamines et de 1 % d'oxyde chromique comme marqueur de digestibilité.

Un autre régime alimentaire a été fourni aux 200 autres crevettes (20 répétitions de 10 crevettes), composé de 30 % de poudre d'insectes plus 1 % d'oxyde chromique comme marqueur, de 63,7 % de farine de blé, de gluten et d'isolat de soja et lécithine de soja, de 3 % d'un mélange d'huile de thon et de soja, de 3,3 % de prémix de

20 vitamines et de 1 % d'oxyde chromique comme marqueur de digestibilité.

La période d'acclimatation était d'une semaine. Après cette période, les crevettes ont été nourries avec les régimes alimentaires affectés en excès (4 %) trois fois par jour. Deux heures après le repas, les aquariums ont été nettoyés et une demi-heure avant le repas suivant, les matières fécales ont été collectées pendant 1 à 2 semaines.

25 Les échantillons provenant de chaque régime alimentaire ont été rassemblés à la fin de l'expérience de manière à avoir assez de matière pour l'analyse. Ils ont été séchés dans un four à air chaud à 65 °C. Les échantillons des aliments et des matières fécales ont été analysés pour les lipides et les protéines (AOAC, 2000). L'oxyde chromique a été déterminé (Scott, 1978). Le coefficient de digestibilité apparente

30 (CDA) a été calculé tel que décrit par Cho et al. (1985).

- Coefficient de digestibilité apparente (CDA %) = $100 - (\text{Indicateur dans le régime alimentaire en \%}) / \text{Indicateur dans les matières fécales en \%}$
- Coefficient de digestibilité apparente des nutriments (CDA Nu %) = $100 - (\text{Indicateur dans le régime alimentaire en \%} \times \text{nutriments dans les matières fécales en \%}) / \text{Indicateur dans les matières fécales en \%}$

fécales en %) / Indicateur dans les matières fécales en % X nutriment dans le régime alimentaire en %)

Expérience 3 : Efficacité de la poudre d'insectes sur la performance de croissance et l'immunité de la crevette blanche (*Litopenaeus vanammei*)

a. Conception des essais

L'expérience a été conçue de manière complètement aléatoire (CMCA) de 5 régimes avec 4 réplicas.

Les différents régimes alimentaires sont indiqués dans le Tableau 4 ci-dessous.

Régime alimentaire	Description	Niveau de farine de poisson dans le régime alimentaire	Poudre d'insectes remplaçant les protéines de la farine de poisson
T1	INSM remplace 0 % de FM	25 %	0 %
T2	INSM remplace 25 % de FM	18,75 %	25 % (5,15 % INSM)
T3	INSM remplace 50 % de FM	12,5 %	50 % (10,30 % INSM)
T4	INSM remplace 75 % de FM	6,25%	75 % (15,40 % INSM)
T5	INSM remplace 100 % de FM	0 %	100 % (20,50 % INSM)

Tableau 4 : Les différents régimes alimentaires

L'expérience a été réalisée dans 20 aquariums en verre ayant chacun des capacités de 100 litres dont 70 litres d'eau saline à 15 ppt (partie par trillion). Des crevettes blanches juvéniles (env. 3 à 4 g) ont été stockées à une densité de 40 crevettes/m² (10 par aquarium). La poudre d'insectes a été mélangée dans l'alimentation tandis que l'huile de poisson a été réduite graduellement. Les aliments ainsi préparés ont été appliqués aux crevettes 3 fois par jour à une quantité comprise entre 3 et 5 % du poids corporel moyen des crevettes pendant 8 semaines. Tous les 2 à 3 jours, les déchets de nourriture étaient siphonnés et l'eau était renouvelée à 15 - 20 %.

Les ingrédients des différents régimes alimentaires ont été broyés à 150-250 microns, mélangés ensemble, puis 25 % d'eau a été ajoutée avant le passage par le hachoir Hobart. Les granulés ainsi obtenus ont été séchés dans un four à air chaud.

Les compositions approximatives des régimes alimentaires testés telles que l'humidité, les protéines, les lipides, les fibres, les cendres et l'énergie ont été analysées conformément à la description de l'AOAC (2000). Cette composition chimique ainsi que celle en ingrédients sont résumés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Matière	T1 INSM remplace 0 % de FM	T2 INSM remplace 25 % de FM	T3 INSM remplace 50 % de FM	T4 INSM remplace 75 % de FM	T5 INSM remplace 100 % de FM
Farine de poisson	25	18,75	12,5	6,25	0
Soja	25	25	25	25	25
Gluten de blé	10	10	10	10	10
Poudre de foie	5	5	5	5	5
Farine de blé	26,7	26,6	26,65	26,15	25,55
Poudre d'insectes	0	5,15	10,3	15,4	20,5
Huile de thon	2	2	2	2	2
Huile de soja	1	0,85	0,75	0,65	0,55
Lécithine de	2	2	2	2	2
Lysine	0	0,1	0,2	0,3	0,4
Méthionine	0	0,05	0,1	0,15	0,2
Phosphate monocalcique	0	1,2	2,2	3,3	4,5
Roche calcaire / coquille d'huître	0	0	0	0,5	1
Carbamide	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Prémix de vitamines	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Somme	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Composition chimique par (AOAC, 2000)					
Humidité (%)	9,38	8,82	8,75	9,02	9,45
Protéines (%)	35,30	35,66	35,73	36,39	36,37
Lipides (%)	7,18	7,16	7,18	7,06	7,06
Fibre (%)	2,86	2,86	2,85	2,79	2,78
Cendre (%)	8,25	8,02	7,35	6,65	6,03

Énergie (Kcal/Kg)	4470,38	4434,08	4404,79	4362,88	4318,97
----------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Tableau 5 : Composition des régimes alimentaires expérimentaux

b. Paramètres

Les données nécessaires pour cette expérience concernent la performance de croissances des crevettes dans des conditions de test. Celles-ci incluent :

5 ✓ Performances de croissance.

- Le poids vif ou poids moyen de la crevette, le gain de poids
- Le taux de croissance spécifique (TCS : $\{(Ln \text{ poids Semaine } 8) - (Ln \text{ poids Semaine } 0)\} \times 100 / \text{jours de la période de culture}$)
- Le taux de conversion alimentaire (TCA : consommation d'aliments / production de crevettes)
- La survie (selon la méthode usuelle du laboratoire de recherche) / Taux de mortalité

10

✓ Statut immunitaire.

Le statut immunitaire est déterminé à la fin de l'étude par le comptage total des hémocytes, l'activité phénol-oxydase, les protéines de l'hémolymph.

15

✓ Morphologie des villosités intestinales et de l'hépatopancréas.

A la fin de l'étude, une histopathologie des villosités intestinales et de l'hépatopancréas a été effectuée.

✓ Test de résistance face au pathogène *Vibrio parahaemolyticus*.

La résistance des crevettes blanches du Pacifique face au *Vibrio parahaemolyticus* a été étudiée afin de déterminer la capacité des crevettes à résister contre les bactéries pathogènes.

20

Après avoir alimenté les crevettes avec un régime alimentaire expérimental pendant 8 semaines, trente crevettes de chaque régime ont été échantillonnées et ont fait l'objet d'une injection de pathogènes, à savoir la bactérie *Vibrio parahaemolyticus*, 4,3.10⁵ UFC (unité formant colonie)/ml (4,6logUFC/ml) injectées par voie intramusculaire. La mortalité a été enregistrée durant 10 jours. La capacité de réduction bactérienne a été déterminée.

25

30 **2. Résultats des Expériences 1, 2 et 3**

Résultats de l'Expérience 1

L'appétence de la poudre d'insectes dans le régime alimentaire de la crevette blanche (*Litopenaeus vannamei*) a été étudiée en se focalisant sur le temps de démarrage de la consommation des aliments par les crevettes, le nombre de crevettes consommant les aliments dans les 15 minutes et la quantité d'aliments consommée lors du repas observé. Les résultats de la capacité d'attraction de la poudre d'insectes ont été présentés dans le Tableau 6 ci-après. La capacité d'attraction, en termes de quantité d'aliments consommée lors du repas observé, le temps de démarrage de la consommation des aliments et le nombre de crevettes consommant les aliments, ne sont pas significativement différentes entre les différents régimes alimentaires ($p > 0,05$). La consommation alimentaire quotidienne par repas des crevettes nourries avec 30 % de farine de poisson (R1) semble être stable alors que les groupes de crevettes alimentées avec 15 % de farine de poisson avec et sans poudre d'insectes de *Tenebrio molitor* (R2-R5) présentent une forte variation de la consommation d'aliments par repas. Le temps nécessaire aux crevettes pour démarrer la consommation des aliments et le nombre de crevettes consommant les aliments sont tout à fait stables après cinq jours d'étude. Ces éléments peuvent signifier que le repas à base de poudre d'insectes de *Tenebrio molitor* n'a pas montré une meilleure attractivité dans les régimes alimentaires de la crevette blanche. De plus, cela met également en évidence que la diminution des farines de poisson dans les régimes alimentaires de la crevette blanche a un effet non significatif sur la consommation alimentaire des crevettes.

	R1 INSM 0 % - FM 30 %	R2 INSM 0 % - FM 15 %	R3 INSM 5 % - FM 10 %	R4 INSM 10 % - FM 5 %	R5 INSM 15 % - FM 0 %	Valeur- P
Attraction						
Consommation alimentaire (g/repas)	1,32	1,25	1,18	1,12	1,19	0,340
Temps de démarrage de la consommation alimentaire (seconde)	31,35	30,18	27,35	31,13	28,78	0,685
Nombre de	5,40	5,28	4,85	4,38	4,80	0,307

crevettes consommant des aliments dans les 15 minutes						
--	--	--	--	--	--	--

Tableau 6 : Capacité d'attraction du repas à base de poudre d'insectes dans le régime alimentaire de la crevette blanche d'un taux d'inclusion de 15 % dans la farine de poisson

5 **Résultats de l'Expérience 2**

La digestibilité *in vivo* de la poudre d'insectes de *Tenebrio molitor* chez la crevette blanche a été déterminée par la méthode indirecte selon Cho et al. (1985). La digestibilité apparente des nutriments est présentée dans le Tableau 7 ci-après. Les résultats indiquent que la poudre d'insectes de *Tenebrio molitor* a une teneur élevée en protéines, lipides, et une digestibilité énergétique de 96 à 97 %.

Digestibilité apparente	Poudre d'insectes
Digestibilité des protéines (%)	97,47+1,66
Digestibilité des lipides (%)	97,85+0,36
Digestibilité énergétiques (%)	96,05+1,20

Tableau 7 : Digestibilité apparente des nutriments dans la poudre d'insectes selon l'Exemple 1 (moyenne $\pm$ ET)

Résultats de l'Expérience 3

- Efficacité de la poudre d'insectes sur la performance de la crevette blanche.

Les effets de la poudre d'insectes sur la performance de la crevette blanche (*L. vannamei*) ont été étudiés pendant 8 semaines. Les résultats sur la performance de croissance des crevettes ont été présentés dans le Tableau 8, ainsi qu'en Figures 1 et 2. Les résultats ont montré qu'à partir de la 8^{ième} semaine, les performances de croissance des crevettes en termes de poids final, gain de poids, gain moyen quotidien et taux de croissance spécifique étaient significativement supérieures par rapport au contrôle ($p < 0,05$). Les crevettes alimentées avec la poudre d'insectes avaient un meilleur taux de croissance que le contrôle (ledit contrôle présentant 25 % de farine de poisson, sans supplément de poudre d'insectes). La consommation alimentaire sur les 8 semaines n'étaient, en revanche, pas significativement différente ($p > 0,05$). Le taux

de survie sur 8 semaines d'étude n'était également pas significativement différent ($p > 0,05$). Le taux de conversion alimentaire était significativement inférieur à partir de la semaine 8 pour T2-T5 par rapport au régime contrôle ($p < 0,05$). Le ratio d'efficacité protéique n'est pas significativement différent ($p > 0,05$).

- 5 Par conséquent, la poudre d'insectes peut favoriser le taux de croissance de la crevette dans un régime alimentaire réduisant la farine de poisson jusqu'à un remplacement de 100 % (taux d'inclusion de farine de poisson 25 % dans le régime contrôle). La raison est la grande digestibilité des protéines et des lipides de poudre d'insectes.

Performances de croissance	Périodes	T1 INSM remplace 0 % de FM	T2 INSM remplace 25 % de FM	T3 INSM remplace 50 % de FM	T4 INSM remplace 75 % de FM	T5 INSM remplace 100 % de FM	Valeur- P
Production (g/aquarium)	0 semaine	24,03 ^a	22,48 ^a	24,00 ^a	24,95 ^a	21,87 ^a	0,094
	2 semaines	32,33 ^a	32,48 ^a	33,73 ^a	32,18 ^a	32,12 ^a	0,910
	4 semaines	53,28 ^a	55,10 ^a	54,75 ^a	59,62 ^a	56,13 ^a	0,493
	6 semaines	62,75 ^a	65,52 ^a	68,82 ^a	72,30 ^a	63,20 ^a	0,340
	8 semaines	63,77 ^b	72,22 ^{ab}	79,00 ^a	78,55 ^a	71,62 ^{ab}	0,025
Nombre de crevettes (par aquarium)	0 semaine	10	10	10	10	10	/
Poids final (g / individu)	0 semaine	1,60 ^a	1,50 ^a	1,60 ^a	1,66 ^a	1,46 ^a	0,098
	2 semaines	2,21 ^a	2,22 ^a	2,29 ^a	2,17 ^a	2,17 ^a	0,831
	4 semaines	3,76 ^a	3,86 ^a	3,85 ^a	4,11 ^a	3,93 ^a	0,662
	6 semaines	4,88 ^a	5,08 ^a	5,29 ^a	5,42 ^a	4,97 ^a	0,537
	8 semaines	5,54 ^b	6,43 ^a	6,87 ^a	6,65 ^a	6,23 ^{ab}	0,030

	semaines						
Gain de poids (g / individu)	2						
	semaines	0,60 ^a	0,72 ^a	0,69 ^a	0,51 ^a	0,71 ^a	0,213
	4						
	semaines	2,16 ^a	2,36 ^a	2,25 ^a	2,45 ^a	2,47 ^a	0,592
	6						
	semaines	3,28 ^a	3,58 ^a	3,69 ^a	3,76 ^a	3,51 ^a	0,665
	8						
	semaines	3,94 ^b	4,93 ^a	5,27 ^a	4,99 ^a	4,77 ^a	0,021
Gain de poids quotidien (g/individu/j)	2						
	semaines	0,04 ^a	0,05 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a	0,05 ^a	0,019
	4						
	semaines	0,08 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,628
	6						
	semaines	0,08 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,08 ^a	0,672
	8						
	semaines	0,07 ^b	0,09 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,007
Taux de croissance spécifique (%/j)	2						
	semaines	2,29 ^a	2,81 ^a	2,56 ^a	1,88 ^a	2,82 ^a	0,087
	4						
	semaines	3,05 ^a	3,38 ^a	3,12 ^a	3,24 ^a	3,52 ^a	0,254
	6						
	semaines	2,66 ^a	2,89 ^a	2,84 ^a	2,81 ^a	2,91 ^a	0,577
	8						
	semaines	2,22 ^b	2,59 ^a	2,60 ^a	2,47 ^a	2,59 ^a	0,016
Consommation alimentaire (g/individu)	2						
	semaines	0,53 ^a	0,50 ^a	0,53 ^a	0,55 ^a	0,48 ^a	0,097
	4						
	semaines	1,67 ^a	1,63 ^a	1,72 ^a	1,65 ^a	1,60 ^a	0,695
	6						
	semaines	4,04 ^a	4,04 ^a	4,07 ^a	4,15 ^a	4,14 ^a	0,977
	8						
	semaines	6,17 ^a	6,40 ^a	6,26 ^a	6,46 ^a	6,27 ^a	0,975
Consommation	2	0,04 ^a	0,04 ^a	0,04 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a	0,068

alimentaire quotidienne (g/individu/j)	semaines						
	4						
	semaines	0,06 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a	0,605
	6						
	semaines	0,10 ^a	0,10 ^a	0,10 ^a	0,10 ^a	0,10 ^a	0,946
	8						
	semaines	0,11 ^a	0,11 ^a	0,11 ^a	0,12 ^a	0,11 ^a	0,985
Performances de croissance	Périodes	T1 INSM remplace 0 % de FM	T2 INSM remplace 25 % de FM	T3 INSM remplace 50 % de FM	T4 INSM remplace 75 % de FM	T5 INSM remplace 100 % de FM	Valeur- P
Taux de conversion alimentaire	2						
	semaines	0,90 ^a	0,80 ^a	0,84 ^a	1,21 ^a	0,69 ^a	0,119
	4						
	semaines	0,78 ^a	0,71 ^a	0,78 ^a	0,68 ^a	0,66 ^a	0,270
	6						
	semaines	1,24 ^a	1,16 ^a	1,11 ^a	1,13 ^a	1,20 ^a	0,683
	8						
	semaines	1,59 ^a	1,32 ^b	1,20 ^b	1,30 ^b	1,32 ^b	0,052
Taux de survie (%)	2						
	semaines	97,78 ^a	97,78 ^a	97,78 ^a	98,89 ^a	98,89 ^a	0,924
	4						
	semaines	94,44 ^a	95,56 ^a	94,44 ^a	96,67 ^a	95,56 ^a	0,909
	6						
	semaines	85,56 ^a	86,67 ^a	86,67 ^a	88,89 ^a	84,44 ^a	0,719
	8						
	semaines	76,67 ^a	75,56 ^a	76,67 ^a	78,89 ^a	76,67 ^a	0,896
Ratio d'efficacité protéique	10						
	semaines	1,80 ^a	2,13 ^a	2,33 ^a	2,12 ^a	2,06 ^a	0,106

Remarque : Les moyennes avec les mêmes exposants au sein des lignes ne sont pas significativement différentes ($p \geq 0,05$).

Tableau 8 : Performances de croissance des crevettes blanches nourries avec un régime alimentaire comportant de la poudre d'insectes à la place de la farine de poisson et comparaison avec le contrôle (sans poudre d'insectes)

- Immunité des crevettes.

- L'immunité des crevettes dans des conditions normales a été étudiée sur 8 semaines d'expérience. Les résultats présentés dans le Tableau 9 ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative par rapport au contrôle ($p > 0,05$) sur le nombre total des hémocytes, la teneur protéique de l'hémolymph et l'activité phénol-oxydase. Par conséquent, la poudre d'insectes peut remplacer la farine de poisson jusqu'à 100 % (taux d'inclusion de 25 % de farine de poisson dans la formule alimentaire) sans aucun effet indésirable sur l'immunité des crevettes
- La condition de résistance après l'injection de *Vibrio parahaemolyticus* est étudiée pendant 6 h. L'immunité de la crevette dans le Tableau 9 montre une grande ($p < 0,05$) activité du phénol-oxydase dans le groupe des crevettes nourries avec la poudre d'insectes remplaçant 50 à 100 % de la farine de poisson (taux d'inclusion de la farine de poisson dans le régime alimentaire de 10,3 à 20,6 %). Plus particulièrement, sur la Figure 3, on constate une corrélation négative entre la présence bactérienne et l'activité de la phénol oxydase. De plus, il y a une corrélation forte et négative entre la diminution bactérienne et l'augmentation de l'inclusion de la poudre d'insecte dans le régime alimentaire ($p < 0,05$).

Immunité	Condition	T1 INSM remplace 0 % de FM	T2 INSM remplace 25 % de FM	T3 INSM remplace 50 % de FM	T4 INSM remplace 75 % de FM	T5 INSM remplace 100 % de FM	Valeur- P
Nombre total des hémocytes ($\times 10^6$ cellules / ml)	Normal	1,01 ^a	1,24 ^a	1,16 ^a	1,28 ^a	1,31 ^a	0,160
	Injection	0,89 ^a	1,16 ^a	1,03 ^a	1,16 ^a	1,10 ^a	0,299
Teneur protéique de l'hémolymph (g/dl)	Normal	4,54 ^a	5,71 ^a	4,93 ^a	6,24 ^a	6,01 ^a	0,674
	Injection	5,83 ^a	6,21 ^a	4,99 ^a	3,53 ^a	4,06 ^a	0,066
Activité phénol-	Normal	113,24 ^a	141,70 ^a	135,43 ^a	137,93 ^a	121,98 ^a	0,961

oxydase (unité/mg protéine)							
	Injection	29,29 ^c	30,24 ^c	66,29 ^b	74,32 ^{ab}	104,64 ^a	0,002
Capacité de réduction bactérienne (ou clairance) (Log UFC / ml)							
	Injection	4,33 ^a	4,25 ^{ab}	4,03 ^{bc}	3,82 ^{cd}	3,72 ^d	0,001

Remarque : Les moyennes avec les mêmes exposants au sein des lignes ne sont pas significativement différentes ($p \geq 0,05$).

Tableau 9 : Immunité des crevettes blanches nourries de poudre d'insectes de *Tenebrio molitor* en remplacement de la farine de poisson et comparaison avec le

5

- La mortalité des crevettes

La mortalité des crevettes après une exposition à *Vibrio parahaemolyticus*, $4,3 \times 10^5$ ufc/ml, a été présentée dans le Tableau 10, ainsi qu'en Figure 4. Les crevettes

10 nourries avec des régimes alimentaires dont la farine de poisson a été réduite (de 50 à 100 %) et supplémentée par de la poudre d'insectes de *Tenebrio molitor* (remplaçant la farine de poisson de 50 à 100 %) présentaient un taux de mortalité significativement plus faible ($P < 0,05$) que le régime alimentaire de contrôle avec 25 % de farine de poisson (T1) et que le groupe de crevettes nourri avec des régimes alimentaires dont

15 la farine de poisson a été réduite et supplémentée par la poudre d'insectes (25 % de farine de poisson remplacée). Ceci peut provenir de la haute digestibilité lipidique et protéique de la poudre d'insectes et d'une meilleure qualité possible des lipides par rapport à l'huile de soja permettant aux crevettes d'obtenir plus de nutriments.

Jour(s) après le l'injection du pathogène	T1 INSM remplace 0 % de FM	T2 INSM remplace 25 % de FM	T3 INSM remplace 50 % de FP	T4 INSM remplace 75 % de FM	T5 INSM remplace 100 % de FM	Valeur- P
Jour 1	0,00	0,00	0,00	0,00 ^{ab}	0,00	*
Jour 2	10,00 ^a	3,33 ^{ab}	0,00 ^b	6,67 ^{ab}	0,00 ^b	0,029
Jour 3	23,33 ^a	13,33 ^{ab}	3,33 ^b	13,33 ^{ab}	3,33 ^b	0,008

Jour 4	30,00 ^a	23,33 ^{ab}	6,67 ^b	13,33 ^{ab}	10,00 ^b	0,048
Jour 5	40,00 ^a	30,00 ^{ab}	10,00 ^b	13,33 ^{ab}	13,33 ^{ab}	0,014
Jour 6	40,00 ^a	30,00 ^{ab}	10,00 ^b	13,33 ^{ab}	13,33 ^{ab}	0,014
Jour 7	40,00 ^a	30,00 ^{ab}	10,00 ^c	16,67 ^{bc}	13,33 ^{bc}	0,017
Jour 8	40,00 ^a	30,00 ^{ab}	10,00 ^c	16,67 ^{bc}	13,33 ^{bc}	0,017
Jour 9	40,00 ^a	30,00 ^{ab}	10,00 ^c	16,67 ^{bc}	13,33 ^{bc}	0,017
Jour 10	43,33 ^a	30,00 ^{ab}	10,00 ^c	16,67 ^{bc}	13,33 ^{bc}	0,005
Taux de mortalité (%)	43,33 ^a	30,00 ^{ab}	10,00 ^c	16,67 ^{bc}	13,33 ^{bc}	0,005
Taux de survie (%)	56,67 ^c	70,00 ^{bc}	90,00 ^a	83,33 ^{ab}	86,67 ^{ab}	0,005

Remarque : Les moyennes avec les mêmes exposants au sein des lignes ne sont pas significativement différentes ($p \geq 0,05$).

* aucune analyse statistique, la valeur est la même.

Tableau 10 : Taux de mortalité cumulé après l'injection du pathogène *Vibrio parahaemolyticus* chez les crevettes blanches nourries avec des régimes alimentaires comportant de la poudre d'insectes à la place de la farine de poisson et comparaison avec le contrôle (sans poudre d'insectes)

- Histologie de l'hépatopancréas et des villosités intestinales des crevettes.

10 L'histologie hépato-pancréatique des crevettes nourries avec le régime alimentaire de contrôle et les régimes avec la poudre d'insectes ont montré des cellules B et cellules R plus grandes. Ces cellules produisent des enzymes de régulation des nutriments. Dans les régimes alimentaires T2-T5, les cellules B (sécrétrices) et R (de réserve) grandissent plus que dans le régime de contrôle T1. Cela signifie que les

15 cellules hépatocytaires ayant accumulé davantage de nutriments peuvent être des réserves de glycogène et/ou lipidiques et ceci en raison de la haute digestibilité protéique ou lipidique de la poudre d'insectes. La densité et la longueur de villosités intestinales étaient élevées dans tous les régimes alimentaires.

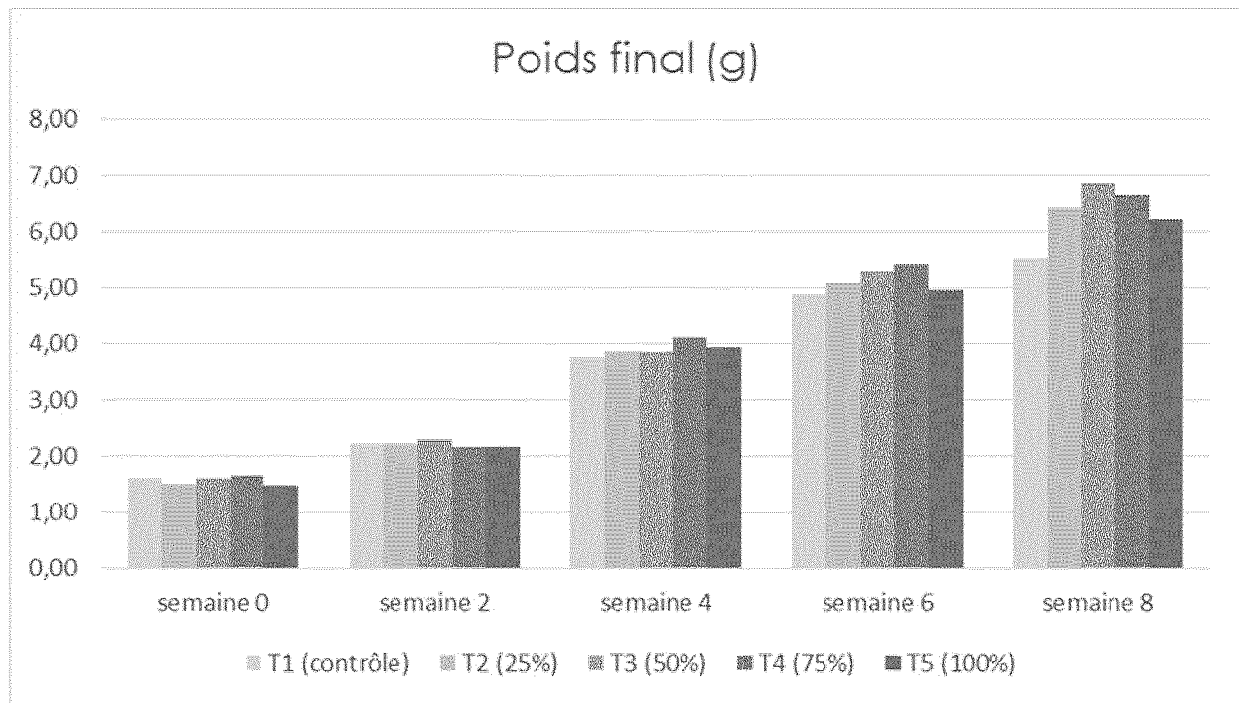
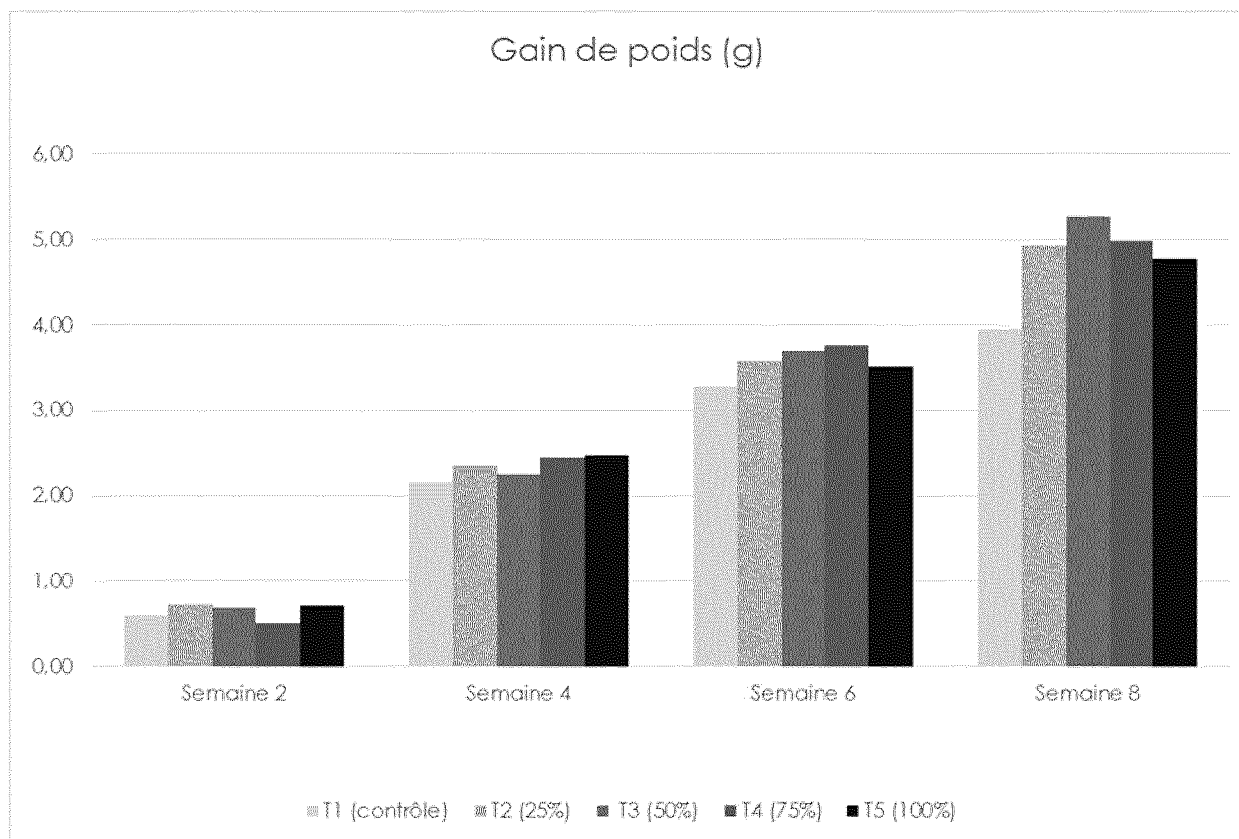
20 3. Conclusion

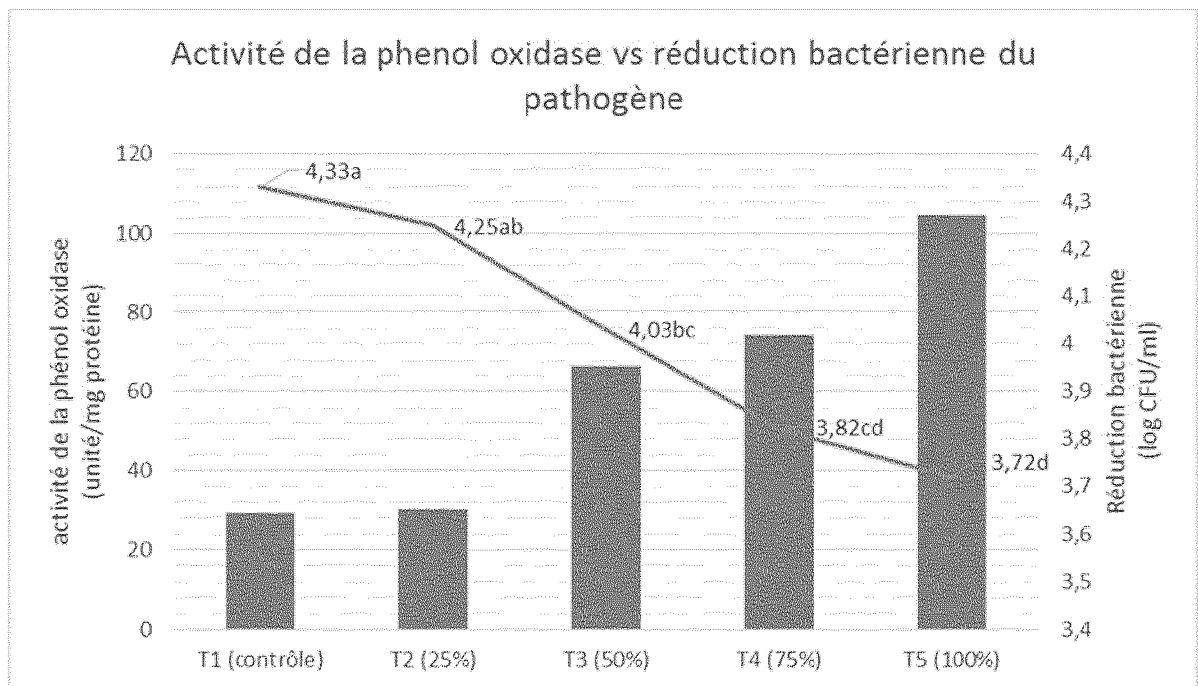
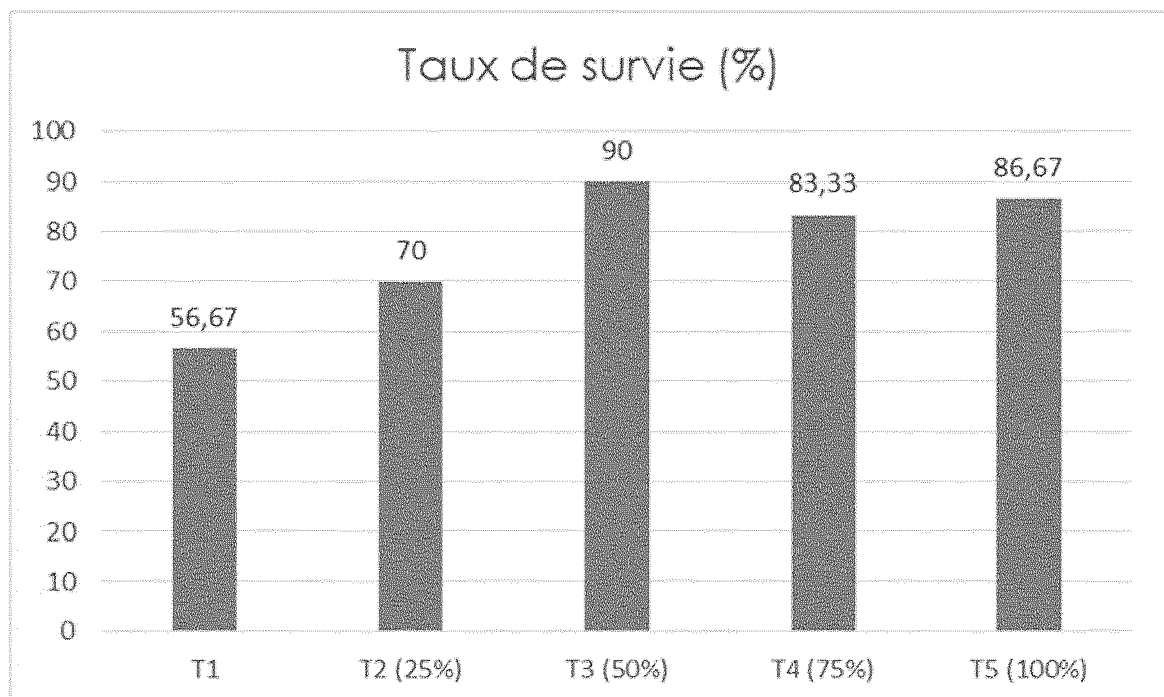
La poudre d'insectes, en particulier de *Tenebrio molitor*, peut remplacer la farine de poisson et ce jusqu'à 100 % de remplacement de la farine de poisson, sans aucun effet négatif sur les performances de croissance, la santé des crevettes et l'histologie de l'hépatopancréas et des villosités intestinales chez la crevette de petite

- taille (1-5 g) avec un profil nutritionnel équivalent entre les régimes alimentaires comprenant de la farine de poisson et/ou de la poudre d'insectes. Lorsque la poudre d'insectes remplace entre 25 et 100 % de la farine de poisson dans le régime alimentaire chez la crevette durant plus de 6 semaines, la crevette peut présenter le
- 5 meilleur taux de croissance et une digestibilité élevée. Le groupe des crevettes nourries de poudre d'insectes de *Tenebrio molitor* en remplacement de la farine de poisson à 50 ou 100 %, a montré une meilleure résistance contre le pathogène *Vibrio parahaemolyticus*.

Revendications

1. Poudre de coléoptères pour une utilisation en tant que médicament dans le traitement de la vibriose.
- 5
2. Poudre de coléoptères selon la revendication 1, pour une utilisation dans le traitement de la vibriose chez les bivalves et les décapodes.
3. Poudre de coléoptères selon la revendication 2, pour une utilisation dans le traitement de l'entérite de la crevette.
- 10
4. Poudre de coléoptères selon la revendication 3, pour une utilisation dans le traitement du syndrome de mortalité précoce de la crevette / syndrome de nécrose hépatopancréatique aiguë chez la crevette.
- 15
5. Poudre de coléoptères pour une utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comportant au moins 67% en poids de protéines et au moins 0,1% en poids de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes.
- 20
6. Poudre de coléoptères pour une utilisation selon la revendication 5, comportant au moins 67% en poids de protéines et au moins 5% en poids de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes.
- 25
7. Poudre de coléoptères pour une utilisation selon la revendication 5, comportant au moins 71% en poids de protéines et comprenant entre 0,1 et 2% en poids de chitine, les pourcentages étant donnés sur le poids total de poudre d'insectes.
- 30
8. Poudre de coléoptères pour une utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, obtenue à partir de l'espèce *Tenebrio Molitor*.

**Fig. 1****Fig. 2**

**Fig. 3****Fig. 4**

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 844449
FR 1756099

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DATABASE WPI Week 201449 Thomson Scientific, London, GB; AN 2014-N93297 XP002774497, & CN 103 815 167 A (DALIAN DETONG BIOTECHNOLOGY DEV CO LTD) 28 mai 2014 (2014-05-28) * abrégé *	1	A61K35/64 A61P31/04 A23K50/80 A23K10/20 A23L33/10
Y	-----	1-7	
Y	DATABASE WPI Week 201711 Thomson Scientific, London, GB; AN 2016-71086U XP002774495, & CN 106 071 395 A (YANG C) 9 novembre 2016 (2016-11-09) * abrégé *	1-7	
Y	-----	1-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
	DATABASE WPI Week 201617 Thomson Scientific, London, GB; AN 2015-837936 XP002774496, & CN 105 106 753 A (CHONGQING FUJIANG BIOLOGICAL TECHNOLOGY) 2 décembre 2015 (2015-12-02) * abrégé *		A61K A23K A23L A61P
A	WO 2016/108036 A1 (YNSECT [FR]) 7 juillet 2016 (2016-07-07) * page 10; revendication 1; exemples 1-4; tableaux 2,3 *	1-8	

	-/-		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 décembre 2017		Winger, Rudolf	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 844449
FR 1756099

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	GASCO LAURA ET AL: "Tenebrio molitor meal in diets for European sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) juveniles: Growth performance, whole body composition and in vivo apparent digestibility", ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 220, 7 juillet 2016 (2016-07-07), pages 34-45, XP029715749, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/J.ANIFEEDSCI.2016.07.003 * page 36 * -----	1-8	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 décembre 2017		Winger, Rudolf	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE **RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1756099 FA 844449**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
 Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **22-12-2017**
 Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 103815167 A	28-05-2014	AUCUN	
CN 106071395 A	09-11-2016	AUCUN	
CN 105106753 A	02-12-2015	AUCUN	
WO 2016108036 A1	07-07-2016	AU 2015373266 A1	03-08-2017
		CA 2970720 A1	07-07-2016
		CN 107257632 A	17-10-2017
		EA 201700336 A1	30-11-2017
		EP 3240436 A1	08-11-2017
		KR 20170103842 A	13-09-2017
		PE 10762017 A1	03-08-2017
		SG 11201705395S A	30-08-2017
		US 2017354178 A1	14-12-2017
		WO 2016108036 A1	07-07-2016