



(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 39670 B1

(51) Cl. internationale :
C08L 5/08

(43) Date de publication :
30.11.2018

(21) N° Dépôt :
39670

(22) Date de Dépôt :
30.12.2016

(71) Demandeur(s) :
**Moroccan foundation for Advanced Science Innovation and Research (MAScIR),
Rabat Design Center, Rue Mohamed Al Jazouli, Madinat Al Irfane, 10100 Rabat (MA)**

(72) Inventeur(s) :
**BOUHFID Rachid ; QAISS Abou El Kacem ; FARDIOUI Meriem ; MEKHZOUM
Mohamed El mehdi ; Meftah Kadmiri Issam**

(74) Mandataire :
AMMANI Abdelhaq

(54) Titre : **Biofilm à base de biopolymère modifié et propriétés antibactériennes et
fluorescentes.**

(57) Abrégé : La présente invention concerne la préparation de nouvelles molécules organiques dérivées de la quinoxaline, fluorescentes, ainsi que la modification d'un bio-polymère par ces molécules. La modification de ce bio-polymère par ces isomères indépendamment présente des améliorations remarquables en termes des propriétés antibactériennes et de la fluorescence.

Biofilm à base de biopolymère modifié et propriétés antibactériennes et fluorescentes

La présente invention concerne la préparation de nouvelles molécules organiques dérivées de la quinoxaline, fluorescentes, ainsi que la modification d'un bio-polymère par ces molécules. La modification de ce bio-polymère par ces isomères indépendamment présente des améliorations remarquables en termes des propriétés antibactériennes et de la fluorescence.

Biofilm à base de biopolymère modifié et propriétés antibactériennes et fluorescentes

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne la préparation de nouvelles molécules organiques dérivées de la quinoxaline, fluorescentes, ainsi que la modification d'un bio-polymère par ces molécules. La modification de ce bio-polymère par ces isomères indépendamment présente des améliorations remarquables en termes des propriétés antibactériennes et de la fluorescence.

ÉTAT DE LA TECHNIQUE

Dans les dernières décennies, les polysaccharides en raison de leur abondance, biodégradabilité, biocompatibilité ainsi que certaines spécifiques propriétés, des recherches approfondies ont été menées sur leur adaptation et leur intégration dans plusieurs champs d'application (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008, Suh, Suh, & Matthew, 2001, Spectrome, 2005, Bravin, Peressini, Sensidoni, & Meste, 2006). Le Chitosan (le dérivé désacétylé de la chitine) est l'un des bio-polymères les plus étudiés en raison de ses propriétés intrinsèques antimicrobiennes, biocompatibilité ainsi que sa capacité filmogène (Dutta, Dutta, & Tripathi, 2004, Lavorgna, Piscitelli, Mangiacapra, & Buonocore, 2010). Dans le but d'intégrer ce polymère à différentes applications, plusieurs recherches scientifiques ont été menés sur la modification chimique de ce polymère afin d'améliorer ses propriétés pour l'adapter avec le champ d'application visé (de Britto & de Assis, 2007, Rhim, Hong, Park, & Ng, 2006, Avadi et al., 2004). Dans l'application biomédicale par exemple, la modification hydrophobique de la surface des films de chitosan a été réalisée afin d'étudier l'influence des propriétés de surface des films de chitosan sur l'absorption des bio-macromolécules tel que les protéines (Crini G., 2005). Les recherches ont montré aussi que les films de chitosan contenant des agents de réticulation et des plastifiants présentent des bons résultats comme des liants des métaux dans le traitement des eaux usées (Cloirec & Mckay, 2007). La modification du chitosan a été aussi utilisé dans le but d'améliorer l'activité antibactérienne de ce bio-polymer (Huh et al., 2001, Daly, 2009).

La modification chimique d'un bio-polymère pour l'adapter à une application est basée sur le choix d'une molécule de modification convenable. Les quinoxalines constituent une classe de composés hétérocyclique utilisées dans différents domaines et, en particulier, en chimie, en

biologie et en pharmacologie, ce qui a incité les chercheurs à développer de nombreux dérivés de cette molécule afin de trouver de nouveaux domaines d'application (Patidar, Jeyakandan, Mobjiya, & Selvam, 2011, Aldana & Monge, 2005). En effet, les dérivées de la quinoxaline grâce à leur teneur en azote et à leur structure hétérocyclique, elles sont caractérisées par différentes activités pharmacologiques (par exemple ; antifongique, antituberculeuse anti-cancer et anti-inflammatoire) (Carta, Sanna, Gherardini, Usai, & Zanetti, 2001, Abu-hashem, Gouda, & Badria, 2010, Journal, Chemistry, & Technology, 2014). Le groupement $C_6H_5-CH=CH-$ est un dérivé du styrène qui s'appelle « Styryle » et les colorants qui intègrent ce groupement sont nommés colorants styryle. La condensation de ce groupement sous forme de *N,N'*-diméthyl benzaldehyde avec la quinoxaline a donné le styryl-quinoxaline. Ce dernier a été utilisé en présence du réactif de Lawesson pour la synthèse de thienoquinoxaline. En considérant l'analogie structurel (structure benzothiazole non chargée) entre ces molécules (styryl-quinoxaline et thienoquinoxaline) et le thioflavin(T), ces deux molécules sont non-fluorescent dans les solutions tampon mais ils montrent une fluorescence jaune lorsqu'ils sont liés à des fibres amyloïdes, ce qui implique que ces molécules peuvent être utilisées comme des sondes fluorescentes des fibres amyloïdes (Benzeid & Faller, 2011). Dérivés de styryl quinolinium ont été utilisées comme agents tensio-actif thermiquement stable pour modifier la montmorillonite dans le but d'utiliser cette argile modifiée comme nano-renforts des polymères thermoplastiques (Abouelkacem Qaiss, 2016).

L'objectif de ce travail est de synthétiser des nouvelles molécules dérivées de styryl-quinoxaline possédant une activité antibactérienne et fluorescentes, et de préparer des nouveaux films de chitosan modifiés par ces molécules et d'étudier l'activité antibactérienne et la fluorescence de ces films.

25 DESCRIPTION DE L'INVENTION

L'objectif de cette invention est de préparer des bio-films fluorescents à base de chitosan. Cette préparation a été divisée en deux parties : la première a été consacrée à la synthèse des molécules isomères et la deuxième pour la fonctionnalisation du chitosan ainsi que la préparation des films nano-composites.

30 1. Synthèse des molécules fluorescentes

Les dérivés de la quinoxaline ont été synthétisés en plusieurs étapes. Premièrement, la synthèse de la 3-méthylquinoxalin-2-one (1) par la condensation d'o-phénylènediamine avec le pyruvate d'éthyle. Deuxièmement, la synthèse du styryl-quinoxalines (2) à partir de la 3-méthylquinoxalin-2-one et le 1,4-Phthalaldehyde par la méthode de fusion. Troisièmement, la
5 tosylation du solketal (3) par le tosylchloride. Quatrièmement, l'alkylation du styryl-quinoxaline par le solkétal tosylé pour donner 1N-solkytal-3-styryl quinoxaline et le O-solkytal-3-styrylquinoxaline. Enfin, la séparation de ces deux isomères par colonne de silice.

a. Synthèse de 3-méthylquinoxalin-2-one

La molécule 3-méthylquinoxalin-2-one est préparée par condensation de l'o-phénylènediamine (15mmol) et le pyruvate d'éthyle (10 ml, 4N) pendant 15 min à température
10 ambiante. Après filtration du milieu réactionnel, le solide est lavé avec de l'eau jusqu'à la neutralité du filtrat.

b. Synthèse de styryl-quinoxalin-2-one

Le styryl-quinoxalin-2-one est préparé à partir de 3-méthylquinoxalin-2-one (6.25 mmol)
15 fusionnée avec 12.5 mmol du 1,4-Phthalaldehyde pendant 2 heures à la température d'ébullition de ce dernier (Figure 4). À la fin de la réaction, le solide est laissé refroidir puis il est chauffé à 100°C pendant 10 minutes dans 50 ml d'acétone. Le produit est filtré à chaud puis lavé avec de l'acétone.

c. Greffage d'unité saccharide sur la quinoxaline

20 Le solketal tosylé est préparé à partir du solketal (75.67 mmol) et le 4-methylbenzenesulfonyl chloride (tosylchlorid) (75.67 mmol) dans 100 ml du toluène/TEA 1 :1 (v/v) comme solvant de réaction (Figure 2).

Les isomères sont préparés par la réaction d'alkylation entre le solketal tosylé(17,37 mmol) et le styryl-quinoxalin-2-one (14.48 mmol), cette réaction (Schéma 3) a lieu dans le
25 diméthylformamide (DMF) en présence du bromure de tetrabutyl ammonium (TBAB) à 110 °C pendant 24h.

Après refroidissement, le mélange réactionnel est filtré et le DMF est évaporé sous pression réduite, le résidu est dissous dans le cyclohexane et le filtrat a été concentré par évaporation sous pression réduite. À la fin, une séparation des isomères et de produits de départ a été

effectué par la chromatographie sur colonne. Chacun des isomères a été récupéré et recristallisé dans l'éthanol.

2. Préparation des films de chitosan modifié par les isomères de quinoxaline

La solution de chitosan est préparée en ajoutant 1 g de poudre de chitosan dans 100 ml d'eau à
5 1% d'acide acétique en agitant vigoureusement. La solution de chitosan a été filtrée à travers
verre fritté pour éliminer les impuretés non dissoutes.

La molécule de fonctionnalisation a été dissoute dans l'éthanol avant d'être ajoutée à la
solution de chitosan sous agitation magnétique pendant 24 heures à la température ambiante.
La solution de chitosan fonctionnalisée a été directement dégazée pour éliminer les bulles d'air
10 emprisonnées dans cette solution, puis elle a été coulée sur une boîte de Pétri et laissée évaporer
à la température ambiante afin d'obtenir des films de chitosan fluorescents (Figure 1).

Activité antibactérienne

Les tests antibactériens des films de chitosan ont été effectués en utilisant la méthode de
diffusion en gélose. Les films ont été découpés sous forme de disques de 6 mm de diamètre
15 puis ils ont été placés dans des boîtes Pétri contenant le gélose Mueller-Hinton à 4% de la bactérie
à tester (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas*
Aeruginosa). Ensuite, les boîtes Pétri ont été incubées à 37°C pendant une nuit. L'observation
des zones inhibitrices entourant les films ont été effectuées et récapitulées dans le tableau (1).
Chaque essai a été fait en triple.

20 **Tableau (1) : Résultats d'activité antibactérienne des films.**

Bactérie	Films	Zone d'inhibition (mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cs (contrôle)	-
	Cs-M ₁	12
	Cs-M ₂	11

Les résultats du test antibactérien (tableau 1) montrent que la bactérie *Pseudomonas Aeruginosa* est sensible aux films du chitosan modifiés tandis qu'il n'est pas sensible au film du chitosan non-modifié, ce qui confirme que les deux isomères styryl-quinoxalin sont à l'origine d'effet d'inhibition de la *Pseudomonas Aeruginosa* autour des films de chitosan modifié.

Pour confirmer l'activité antibactérienne des deux isomères de styryl-quinoxaline, le test d'activité antibactérienne des molécules en solution (DMSO/Eau) à différentes concentrations a été effectuée de la même manière. Des disques de papier filtre stérile de diamètre 6 mm sont imprégnés avec 10 µL des concentrations de C1, C2, C3 et C4 des molécules à tester, voir tableau 2. Dans les mêmes conditions, l'antibiotique (ampicilline) qui constitue le témoin a été testé à une concentration de 150 µg/ml et le blanc (C0) pour étudier aussi l'effet de solvant.

Tableau (2) : Concentrations et solvants utilisées dans le test d'activité antibactérienne des molécules en solution.

	Concentration µg ml	Rapport Solvant DMSO/Eau
C0	0	4/6
C1	1000	4/6
C2	500	2/8
C3	250	1/9
C4	100	0.5/9.5

Tableau (3) : Résultats d'activité antibactérienne des molécules.

	Concentration (µg/ml)	Zone d'inhibition (mm) contre La <i>P. Aeruginosa</i>

M₁	1000	13
	500	10
	250	14
	100	8
M₂	1000	10
	500	12
	250	14
	100	9
Blanc (B)	0	8
Ampicilline (AB)	150	11

Les deux isomères « dérivés de styryl-quinoxaline » ont des diamètres d'inhibition convenable devant celui de l'ampicilline contre la souche *Pseudomonas Aeruginosa*. Ces produits présentent donc une activité antibactérienne considérable.

5 **Description des figures :**

Figure 1 : Schéma Synthèse du styryl-quinoxalin-2-one

Figure 2 : Schéma Synthèse du solketal tosylé

Figure 3 : Schéma Synthèse des isomers du styryl-quinoxaline (molecule 1 (IV) et molecule 2 (V))

10 **Figure 4 : Films Cs-M₁ et Cs-M₂ sous une lampe UV**

Références :

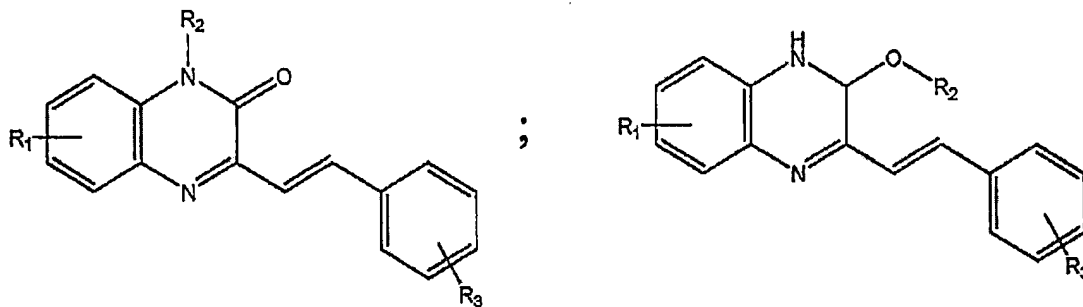
Abouelkacem Qaiss, R. B. (2016). Surfactant dérivé du quinolinium pour la modification d'argile. MA 375110 A1

- Abu-hashem, A. A., Gouda, M. A., & Badria, F. A. (2010). Synthesis of some new pyrimido[20,10:2,3]thiazolo[4,5-b]quinoxaline derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(5), 1976–1981.
- 5 Aldana, I., & Monge, A. (2005). Synthesis of New Quinoxaline-2-carboxylate 1,4-Dioxide Derivatives as Anti- Mycobacterium tuberculosis Agents. *Med. Chem*, 3, 2019–2025.
- Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Tahzibi, A., Bayati, K., Pouladzadeh, M., Zohuriaan-Mehr, M. J., & Rafiee-Tehrani, M. (2004). Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. *European Polymer Journal*, 40(7), 1355–1361.
- 10 Bravin, B., Peressini, D., Sensidoni, A., & Meste, L. (2006). Development and application of polysaccharide – lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. *Food Engineering*, 76, 2005–2007.
- Carta, A., Sanna, P., Gherardini, L., Usai, D., & Zanetti, S. (2001). Novel functionalized pyrido [2 , 3- g] quinoxalinones as antibacterial , antifungal and anticancer agents. *Elsevier*, 15 56, 933–938.
- Cloirec, P. Le, & Mckay, G. (2007). Application of Chitosan for the Removal of Metals From Wastewaters by Adsorption — Mechanisms and Models. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, (December 2016).
- Daly, W. (2009). Quaternization of N-aryl chitosan derivatives : Synthesis , characterization , and antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, 344(18), 2502–2511.
- 20 de Britto, D., & de Assis, O. B. G. (2007). Synthesis and mechanical properties of quaternary salts of chitosan-based films for food application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(2), 198–203.
- Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan : Chemistry , properties and applications. *Scientific & Industrial Research*, 63, 20–31.
- 25 Essassi, E. M., & Faller, P. (2011). A thienoquinoxaline and a styryl-quinoxaline as new fluorescent probes for amyloid- β fibrils. *Comptes Rendus Chimie*, (January). <http://doi.org/10.1016/j.crci.2011.10.009>

- Huh, Manwoo., Kang, I., Lee, Duh., Kim, Woosik., Lee, D. H. O., & Park, Lees. (2001). Surface Characterization and Antibacterial Activity of Chitosan-Grafted Poly (ethylene terephthalate) Prepared by. *Applied Polymer Science*, 81, 2769–2778.
- 5 Noolvi, M.N., H. M. Patel , V. Bhardwaj, A. Chauhan (2011). Synthesis and in-vitro anti-tumor activity of substituted quinazoline and quinoxaline derivatives: Search for anticancer agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P., & Buonocore, G. G. (2010). Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 291–298.
- 10 Patidar, A. K., Jeyakandan, M., Mobiya, A. K., & Selvam, G. (2011). Exploring Potential of Quinoxaline Moiety. *PharmTech Research*, 3(1), 386–392.
- Quignard, F., Valentin, R., & Di Renzo, F. (2008). Aerogel materials from marine polysaccharides. *New Journal of Chemistry*, 32(8), 1300.
- Rhim, J.-W., Hong, S.-I., Park, H.-M., & Ng, P. K. W. (2006). Preparation and
15 Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5814–5822.
- Crini G. (2005). Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Prog. Polym. Sci.*, 30, 38–70.
- Suh, J. F., Suh, J. F., & Matthew, H. W. T. (2001). Application of chitosan-based
20 polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials*, 21, 2589–2598.

Revendications :

1. Un matériau biocomposite à base de biopolymère **caractérisé en ce que le biopolymère est modifié par des molécules dérivées de la styryl-quinoxaline.**
2. Un matériau biocomposite selon la revendication 1 **caractérisé en ce que le biopolymère est le chitosan.**
3. Un matériau biocomposite selon la revendication 1 et 2 **caractérisé en ce que les molécules dérivées du styryl-quinoxaline sont choisies parmi :**



dont:

R1= {-H, -CH₃, -CO₂H, Cl, NO₂, ...}

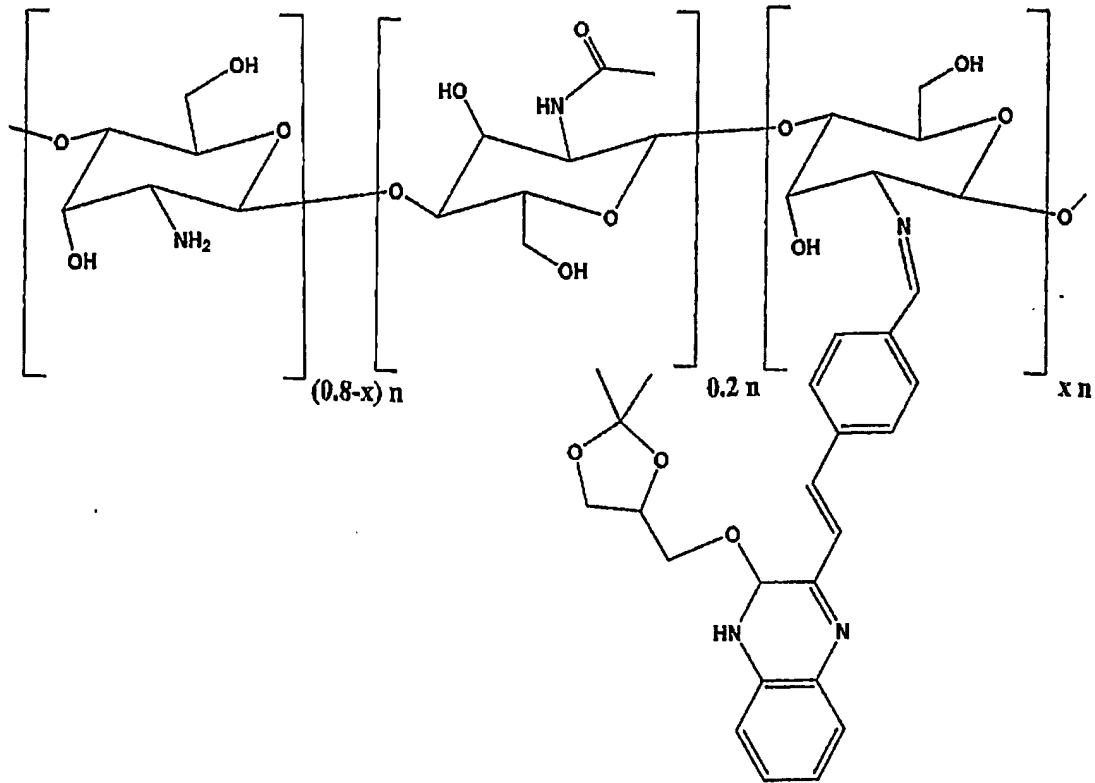
R2= {H, -CH₂(C₂H₃O₂(CH₃)₂), C_nH_{2n+1}, n=1-24...}

R3= {-CHO, -OH, NH₂...}

4. Procédé de préparation d'un matériau biocomposite à base de biopolymère modifié par des molécules dérivées de la styryl-quinoxaline **caractérisé en ce que les molécules dérivées du styryl-quinoxaline sont préparés en quatre étapes :**
 - la première étape de la préparation des molécules est la condensation de l'o-phénylènediamine avec le pyruvate d'éthyle.
 - la deuxième étape de la préparation des molécules est réalisé par la réaction de fusion entre 3-méthylquinoxalin-2-one et 1,4-Phthalaldehyde.
 - la troisième étape de la préparation des molécules est la synthèse du solketal tosylé.

- la quatrième étape de la préparation des molécules est l'alkylation du styryl de quinoxaline par le solketal.

5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que la modification chimique du chitosan est réalisée par le greffage des molécules synthétisés séparément sur le chitosan en solution (milieu acide à 1% d'acide acétique).



6. Procédé selon les revendications 4 et 5 caractérisé en ce que la préparation est réalisée par la technique dépôt-évaporation.

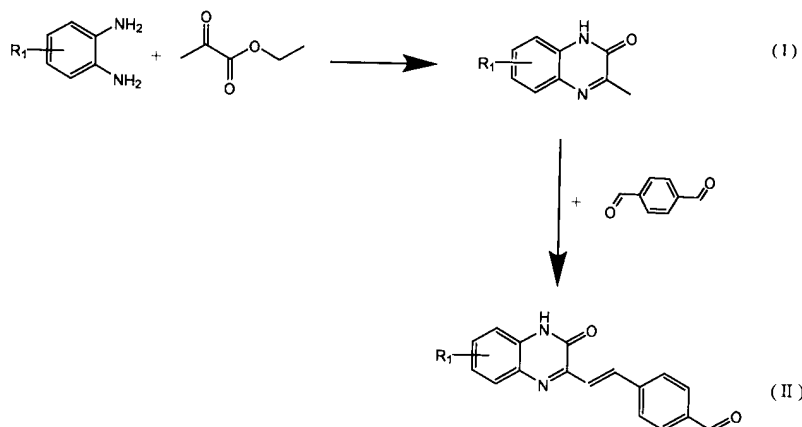


Figure 1

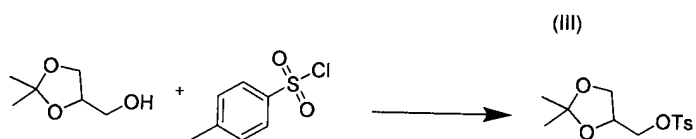


Figure 2

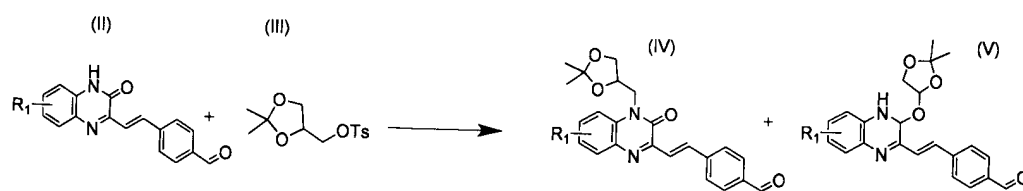


Figure 3



Figure 4



**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et
complétée par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 39670	Date de dépôt : 30/12/2016
Déposant : Moroccan foundation for Advanced Science Innovation and Research (MAScIR)	
Intitulé de l'invention : Biofilm à base de biopolymère modifié et propriétés antibactériennes et fluorescentes.	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport	
<input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée	
<input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: A EL KADIRI	Date d'établissement du rapport : 13/10/2017
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
8 Pages
- Revendications
6
- Planches de dessin
2 Pages

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : C08L5/08

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

EPOQUE, Orbit

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	US2013274892 A1, UNIV DREXEL [US] et AL, 2013-10-17	1-6

***Catégories spéciales de documents cités :**

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
 -« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
 -« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 -« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
 -« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Nouveauté (N)	Revendications 1-6 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-6 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-6 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : US2013274892 A1

1. Nouveauté (N) :

Aucun document de l'état de l'art cité D1 ne divulgue les mêmes caractéristiques techniques contenues dans les revendications 1-6.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-6 est nouveau conformément à l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 considéré comme l'état de l'art le plus proche de l'objet de la revendication 1 divulgue un biocomposite à base de biopolymère (chitosane) modifié par des acides aminés.

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce que le chitosane est modifié par des molécules dérivés de styryl-quinoline.

Le problème à résoudre par la présente invention peut être considéré comme la fourniture des composés alternatifs pour la modification du biopolymère (chitosane).

L'objet de la revendication 1 peut être considéré comme impliquant une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, étant donné que la caractéristique distinctive n'est pas divulguée dans l'état de l'art cité et l'homme de métier ne trouve aucune incitation de D1 pour remplacer les acides aminés par la styryl-quinoline pour modifier la chitosane sans faire preuve d'esprit inventif.

Le même raisonnement s'applique à l'objet de la revendication procédé 4 en tenant dûment compte de sa catégorie.

L'objet des revendications dépendantes 2-3 & 5-6 des revendications 1 & 4 respectivement, implique lui aussi une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

MA 39870B1
L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.