

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
**INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
—  
COURBEVOIE  
—

①① N° de publication : **3 088 070**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **18 60222**

⑤① Int Cl<sup>8</sup> : **C 08 J 11/10** (2020.12), C 12 P 7/44, B 29 B 17/04

①②

## BREVET D'INVENTION

**B1**

⑤④ PROCÉDE DE DEGRADATION ENZYMATIQUE DE POLYETHYLENE TEREPHTALATE.

②② Date de dépôt : 06.11.18.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public  
de la demande : 08.05.20 Bulletin 20/19.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 26.11.21 Bulletin 21/47.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *CARBIOS Société anonyme* — FR.

⑦② Inventeur(s) : MARTY ALAIN.

⑦③ Titulaire(s) : *CARBIOS Société anonyme*.

⑦④ Mandataire(s) : *Cabinet Becker & Associés*.

**FR 3 088 070 - B1**



## PROCEDE DE DEGRADATION ENZYMATIQUE DE POLYETHYLENE TEREHPHTALATE

### DOMAINE TECHNIQUE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un procédé de dépolymérisation par voie enzymatique de polyéthylène téréphtalate (PET), notamment contenu dans un matériau plastique. Le procédé selon l'invention peut notamment être mis en œuvre à l'échelle industrielle ou semi-industrielle.

### ARRIERE PLAN TECHNOLOGIQUE

Les produits plastiques sont des matériaux durables et peu chers qui peuvent être utilisés pour la fabrication d'une grande variété de produits pour des applications diverses (emballages alimentaires, textiles d'habillement, etc.). En conséquence, la production de plastiques a drastiquement augmenté depuis les dernières décennies. La plupart d'entre eux sont utilisés pour des applications de courte durée, ce qui a pour effet d'entraîner une accumulation de déchets plastiques et une nécessité de traitement de ces derniers. Parmi les différents polymères constituant ces-dits plastiques, on retrouve notamment le polyéthylène téréphtalate (PET), un polyester aromatique produit à partir d'acide téréphtalique et d'éthylène glycol et qui est utilisé dans de nombreuses applications telles que les emballages alimentaires (bouteilles, flacons, pots, barquettes, poches), mais également dans la production de textiles pour l'habillement, la décoration (moquette), le linge de maison, etc.

Afin de répondre aux problématiques environnementales et économiques d'accumulation des déchets, des technologies de recyclage ou de valorisation énergétique ont été développées. Le procédé de recyclage mécanique reste aujourd'hui le plus utilisé, mais ce dernier présente de nombreux inconvénients. Sa mise en œuvre nécessite en effet de procéder à un tri sophistiqué et coûteux et conduit à la production de plastiques recyclés de qualité diminuée destinés à des applications de moindre valeur (baisse de masse moléculaire, présence incontrôlée d'additifs). En outre, ces plastiques recyclés ne sont pas compétitifs par rapport aux plastiques vierges issus du pétrole.

Récemment, des procédés innovants de recyclage enzymatique de produits plastiques ont été développés et notamment décrits dans les demandes de brevets WO 2014/079844, WO

2015/097104, WO 2015/173265 et WO 2017/198786. Contrairement aux procédés traditionnels de recyclage mécanique, ces procédés enzymatiques permettent, par dépolymérisation enzymatique du polymère contenu dans le plastique, de revenir aux principaux constituants (monomères) du polymère. Les monomères obtenus peuvent ensuite être purifiés et utilisés pour repolymériser de nouveaux polymères. Ces procédés enzymatiques permettent, via la spécificité des enzymes, d'éviter un tri coûteux des plastiques, mais également de proposer un recyclage à l'infini conduisant à des polymères recyclés de qualité équivalente aux polymères issus du pétrole. Ces procédés permettent notamment, à partir de PET, de produire de l'acide téréphtalique et de l'éthylène glycol.

## 10 RESUME DE L'INVENTION

En travaillant sur les procédés de dépolymérisation enzymatique du PET, les Demandeurs sont parvenus à mettre au point un procédé optimisé permettant de dépolymériser par voie enzymatique des plastiques contenant du PET à une température proche de la Tg de ce PET, afin de rendre les chaînes dudit polymère plus facilement accessible à l'enzyme de dépolymérisation et ainsi augmenter le taux de dépolymérisation.

Pour parvenir à un tel procédé, les inventeurs ont dû répondre à des problèmes antinomiques. En effet, les enzymes aptes à dépolymériser les polymères sont majoritairement plus actives sur les polymères amorphes que sur les polymères semi-cristallins. Or, bien qu'un procédé de dépolymérisation à une température proche de la Tg d'un polymère puisse théoriquement permettre d'améliorer l'accessibilité de l'enzyme aux chaînes dudit polymère à dépolymériser, via une augmentation de la mobilité des chaînes de ce polymère, lorsqu'un polymère est soumis à une température proche ou au-dessus de sa Tg ce dernier tend à recristalliser plus rapidement, rendant ainsi le polymère plus difficilement dépolymérisable pour l'enzyme.

Les inventeurs ont ainsi mis en évidence qu'il est possible de réaliser un procédé de dépolymérisation du PET à une température proche ou au-dessus de la Tg dudit PET, en s'assurant d'une part que le taux de cristallinité du PET est suffisamment bas préalablement à l'étape de dépolymérisation et d'autre part en sélectionnant une enzyme apte à dépolymériser ce PET dans un temps de dépolymérisation inférieur au temps nécessaire audit PET pour atteindre un taux de cristallinité incompatible avec une dépolymérisation enzymatique. Le procédé développé par les inventeurs permet de maintenir des vitesses de dépolymérisation au

sein d'un réacteur compatibles avec une mise en œuvre à l'échelle industrielle. A titre d'exemple, les inventeurs sont parvenus à dépolymériser plus de 90% d'un PET en moins de 10h à une température de 72°C. De manière avantageuse, le procédé de l'invention peut être mis en œuvre pour la dépolymérisation et/ou le recyclage de plastiques contenant du PET.

5 L'invention a donc pour objet un procédé de dépolymérisation enzymatique de polyéthylène téréphtalate (PET) par mise en contact dudit PET avec une enzyme apte à dépolymériser ledit PET, caractérisé en ce que le PET présente un degré de cristallinité initial d'au plus 25%, l'étape de dépolymérisation est conduite à une température T égale à la Tg +/- 10°C dudit PET, et l'enzyme est sélectionnée de manière à ce qu'un temps de dépolymérisation (tD) du PET par  
10 ladite enzyme soit strictement inférieur à un temps de cristallisation (tR) dudit PET, dans lequel le temps tD représente le temps nécessaire à ladite enzyme pour dépolymériser au moins 80% dudit PET à ladite température T, et le temps tR représente le temps nécessaire audit PET pour atteindre un taux de cristallinité de 35% à ladite température T.

L'étape de dépolymérisation est préférentiellement conduite à une température T comprise  
15 entre 66°C et 80°C, préférentiellement entre 68°C et 73°C, le temps tD étant inférieur ou égal à 20h, préférentiellement inférieur à 16h.

#### DESCRIPTION DE LA FIGURE

Figure 1 : Cinétique de recristallisation d'un PET contenu dans un matériau plastique lors de l'incubation dudit matériau à différentes températures.

#### 20 DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

##### *Définitions*

Dans le contexte de l'invention l'expression « matériau plastique » désigne les produits plastiques (tels que des feuilles, barquettes, films, tubes, blocs, fibres, tissus, etc.) et les compositions plastiques utilisées pour réaliser les produits plastiques. De manière  
25 préférentielle, le matériau plastique est composé de polymères amorphes et/ou semi-cristallins. Le matériau plastique peut contenir en plus du ou des polymères, des substances additionnelles ou des additifs, tels que des plastifiants, des charges minérales ou organiques, des colorants, etc. Ainsi, dans le contexte de l'invention, le matériau plastique fait référence à tout produit

plastique et/ou composition plastique comprenant au moins un polymère sous forme semi-cristalline et/ou amorphe et plus particulièrement au moins un PET.

Les produits plastiques désignent notamment les produits plastiques manufacturés, tels que les emballages rigides ou souples (films, bouteilles, barquettes), films agricoles, sacs, objets  
5 jetables, textiles, tissus, revêtements de sols, les déchets plastiques ou déchets fibres, etc.

Le terme « polymère » fait référence à un composé chimique dont la structure est constituée de multiples unités répétées (i.e. « monomères ») liées par des liaisons covalentes chimiques. Dans le contexte de l'invention, le terme « polymère » fait plus précisément référence à de tels composés chimiques entrant dans la composition de matériaux plastiques.

10 Le terme « polyester » fait référence à un polymère qui contient un groupe fonctionnel ester dans la chaîne principale de sa structure. Le groupe fonctionnel ester est caractérisé par une liaison entre un carbone et trois autres atomes : une liaison unique avec un autre atome de carbone, une double liaison avec un oxygène et une liaison simple avec un autre atome  
15 d'oxygène. L'oxygène lié au carbone par une liaison simple est lui-même lié à un autre carbone par une liaison simple. Les polyesters peuvent être constitués d'un seul type de monomères (i.e. homopolymère) ou d'au moins deux monomères différents (i.e. copolymère). Les polyesters peuvent être aromatiques, aliphatiques ou semi-aromatiques. A titre d'exemple, le polyéthylène téréphtalate est un copolymère semi-aromatique composé de deux monomères, l'acide téréphtalique et l'éthylène glycol.

20 Dans le contexte de l'invention, le terme « polymères semi-cristallins » fait référence à des polymères partiellement cristallins, dans lesquels des régions cristallines et amorphes coexistent. Le degré de cristallinité d'un polymère semi-cristallin peut être estimé par diverses méthodes analytiques, et est généralement compris entre 10% et 90%. Un polymère avec un degré de cristallinité inférieur à 10% peut être considéré comme amorphe.

25 Un « procédé de dépolymérisation » en relation avec un polymère ou matériau plastique fait référence à un procédé par lequel un polymère ou au moins un polymère d'un matériau plastique est dégradé en molécules plus petites, telles que des monomères et/ou oligomères. Dans le cas de la présente invention, un procédé de dépolymérisation de PET ou d'un matériau plastique contenant du PET fait référence à un procédé dans lequel le PET est dégradé en monomères

tels que l'acide téréphtalique et/ou l'éthylène glycol et/ou en oligomères tels que le diméthyle téréphtalate (DMT), le méthyl-2-hydroxyethyl téréphtalate (MHET), bis(2-hydroxyethyl) téréphtalate (BHET).

#### *Sélection du PET*

- 5 Le procédé de dépolymérisation selon l'invention repose sur une dépolymérisation enzymatique d'un PET, par mise en contact dudit PET avec au moins une enzyme apte à le dépolymériser. Plus particulièrement, les inventeurs ont mis au point un procédé de dépolymérisation enzymatique de PET comprenant une étape de dépolymérisation conduite à une température T comprise entre la  $T_g - 10^\circ\text{C}$  et la  $T_g + 10^\circ\text{C}$  dudit PET, à partir d'un PET  
10 présentant un degré de cristallinité initial d'au plus 25%.

Selon l'invention, le PET soumis à l'étape de dépolymérisation est un PET amorphe et/ou semi-cristallin au début de l'étape de dépolymérisation, dont le degré de cristallinité initial est inférieur ou égal à 25%. On entend par « degré de cristallinité initial », le degré de cristallinité du PET au début de l'étape de dépolymérisation, c'est-à-dire avant la mise en contact dudit PET  
15 avec une enzyme de dépolymérisation.

Le degré de cristallinité d'un polymère semi-cristallin peut être estimé par diverses méthodes analytiques, et est généralement compris entre 10% et 90%. Par exemple, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ou la diffraction des rayons X peuvent être utilisées pour déterminer le degré de cristallinité des polymères. D'autres techniques conviennent également  
20 à la détermination de la cristallinité des polymères, mais avec une fiabilité moindre, comme la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et la spectroscopie infrarouge. Dans la présente demande, la cristallinité est mesurée par l'analyse calorimétrique différentielle (DSC). Plus particulièrement, les expériences de DSC ont été conduites en utilisant le protocole suivant : une petite quantité de matériau plastique (plusieurs mg) est chauffée à une vitesse de chauffe  
25 constante, à partir de la température ambiante ou d'une température inférieure à la température ambiante jusqu'à une température supérieure à la température de fusion ( $T_f$ ) du polymère. Les données de flux de chaleur sont collectées et tracées en fonction de la température. Le degré de cristallinité ( $X_c$ ) exprimé en pourcentage (%) est calculé selon la formule suivante :

$$X_c(\%) = \frac{(\Delta H_f - \Delta H_{cc})}{wt * \Delta H_f 100\%} \times 100\%$$

Etant entendu que :

- $\Delta H_f$  correspond à l'enthalpie de fusion qui peut être déterminée en intégrant le pic de fusion endothermique,
- 5 -  $\Delta H_{cc}$  correspond à l'enthalpie de cristallisation froide et déterminée en intégrant le pic de cristallisation froide exothermique,
- wt représente la fraction pondérale de polyester dans le plastique, et
- $\Delta H_f 100\%$  correspond à l'enthalpie de fusion pour un polymère entièrement cristallin et peut être trouvée dans la littérature. Par exemple,  $\Delta H_f 100\%$  du PET correspond dans la
- 10 littérature à 125,5 J / g (Polymer Data Handbook, deuxième édition, édité par James E. Mark, OXFORD, 2009).

La marge d'erreur de mesure du degré de cristallinité est d'environ 10%. Ainsi un degré de cristallinité évalué à 25% correspond à un degré de cristallinité compris entre 22,5% et 27,5%.

15 Dans un mode préféré, le PET a un degré de cristallinité initial inférieur à 20%. Dans un autre cas préféré, le PET soumis à l'étape de dépolymérisation est un PET amorphe, c'est-à-dire présentant un degré de cristallinité inférieur à 10%.

Selon l'invention, il est possible de procéder à une étape d'amorphisation du PET en amont de l'étape de dépolymérisation, par tout moyen connu de l'homme de l'art, de manière à atteindre un degré de cristallinité initial inférieur ou égal à 25%. Une telle étape d'amorphisation est

20 notamment décrite dans la demande WO 2017/198786.

Dans un mode de réalisation particulier, le procédé de dépolymérisation selon l'invention est mis en œuvre avec un matériau plastique comprenant au moins du PET. Dans un mode préféré, le PET représente au moins 80% en poids dudit matériau plastique, préférentiellement au moins 85%, 90%, 95%. Dans un mode de mise en œuvre particulier, le matériau plastique comprend

25 un mélange de PET et d'acide polylactique (PLA), un mélange de PET et polyéthylène (PE), un mélange de PET et polytriméthylène téréphtalate (PTT), un mélange de PET et de polyamide (PA), ou un mélange de PET et de coton. Avantagusement, les matériaux plastiques engagés

dans le réacteur sont des déchets plastiques ou déchets fibres. Ces déchets peuvent être issus des filières de collecte destinées au recyclage, mais également être des déchets de la filière de production ou de la filière de recyclage, et peuvent ainsi contenir d'autres composés que les déchets plastiques. Cela implique que le PET peut être engagé dans le réacteur en combinaison  
5 d'autres éléments présents dans ces flux (tel que papier, carton, aluminium, colle etc...). Dans un mode de mise en œuvre particulier, le réacteur dans lequel est mis en œuvre l'étape de dépolymérisation est chargé en plusieurs matériaux plastiques contenant au moins du PET, préférentiellement contenant au moins 80% en poids de PET, par rapport au poids total en matériaux plastiques.

10 Selon l'invention, le PET est caractérisé par sa température de transition vitreuse ( $T_g$ ) initiale, c'est-à-dire avant la mise en contact dudit PET avec une enzyme de dépolymérisation. Cette température peut être estimée par différentes méthodes analytiques. Par exemple, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ou l'analyse thermique différentielle (DTA)  
15 peuvent être utilisées pour déterminer la  $T_g$  d'un polymère. Dans la présente description, la  $T_g$  correspond à la température de transition vitreuse mesurée par DSC lors du premier balayage en température comme indiqué dans les exemples.

Dans un mode particulier de l'invention, la  $T_g$  initiale du PET est comprise entre 60°C et 90°C, préférentiellement entre 60°C et 85°C. Dans un autre mode particulier, la  $T_g$  initiale du PET est comprise entre 65°C $\pm$ 1°C et 80°C $\pm$ 1°C.

20 Selon l'invention, il est possible de procéder à une étape de pré-traitement du PET en amont de l'étape de dépolymérisation, et notamment à une étape de broyage du PET, ou du matériau plastique contenant le PET avant l'étape de dépolymérisation du polyester. Dans un mode préféré, le PET ou le matériau plastique contenant le PET est réduit sous forme de poudre par  
25 tout moyen approprié connu de l'homme de l'art. Dans ce cas particulier, le PET, ou le matériau plastique contenant le PET, est avantageusement micronisé de manière à être transformé sous forme de poudre.

Dans un mode de mise en œuvre particulier, le PET ou le matériau plastique contenant le PET engagé dans le réacteur est sous forme de poudre de granulométrie moyenne ( $d_{50}$ ) inférieure à 2 mm, préférentiellement de granulométrie inférieure à 1 mm. Dans un autre mode de

réalisation le PET ou le matériau plastique contenant le PET engagé dans le réacteur est sous forme de poudre de granulométrie moyenne (d50) inférieure à 500 $\mu$ m.

Dans un mode de réalisation particulier, le procédé de dépolymérisation comprend une étape d'amorphisation du PET, suivie d'une étape de broyage et/ou de micronisation du PET ou du  
5 matériau plastique contenant le PET avant l'étape de dépolymérisation du PET.

### *Sélection de l'enzyme*

Selon l'invention, le procédé de dépolymérisation est mis en œuvre avec une enzyme apte à dépolymériser le PET. Plus particulièrement, l'enzyme est sélectionnée de manière à ce qu'un temps de dépolymérisation (tD) du PET par ladite enzyme soit strictement inférieur à un temps  
10 de cristallisation (tR) dudit PET.

Selon l'invention, on définit par temps de cristallisation « (tR) » du PET, le temps nécessaire audit PET d'une cristallinité initiale  $X_c$  pour atteindre un taux de cristallinité de 35% à une température T. Ce temps est dépendant de la nature du polymère (i.e. la présence d'additifs et/ou de co-monomères), de son poids moléculaire, de sa Tg et également de son histoire  
15 thermique (traitements antérieurs ayant impliqués un refroidissement et/ou un chauffage, comme une amorphisation ou une micronisation). Ce temps est mesuré dans des conditions où la température T est régulée, et n'est pas impactée par l'agitation et/ou le pH pendant la mesure. Selon l'invention, il est possible de mesurer le temps de cristallisation (tR) du PET à une température T par incubation du matériau plastique contenant le PET à cette température T, et  
20 par mesure régulière du taux de cristallinité (par DSC) d'échantillons prélevés à différents intervalles de temps.

Selon l'invention, le temps de dépolymérisation « (tD) » représente le temps nécessaire à l'enzyme dégradant le polymère pour dépolymériser au moins 80% dudit polymère à une température T. Dans un mode particulier, ce temps est déterminé au pH optimal de l'enzyme et  
25 à une concentration saturante en enzyme, i.e. une concentration au-delà de laquelle la vitesse de réaction n'est pas améliorée par l'ajout d'enzyme. Ainsi, le temps tD correspond au temps nécessaire à l'enzyme pour libérer 80% des monomères présents dans le polymère. Dans le cas particulier de l'invention, le temps tD correspond au temps nécessaire pour obtenir après mise en contact de l'enzyme et du PET, 80% d'équivalent acide téréphtalique (AT) présents dans le

PET, l'équivalent AT correspondant à l'AT libre et l'AT présent dans les oligomères de BHET et MHET.

Selon l'invention, l'enzyme est avantageusement sélectionnée parmi les enzymes ayant une température de fusion ( $T_m$ ) strictement supérieure à la température  $T$  à laquelle est conduite l'étape de dépolymérisation.

Dans le contexte de l'invention, la température  $T_m$  correspond plus particulièrement à la température à laquelle la moitié de la quantité de l'enzyme considérée est dépliée ou mal repliée, de sorte qu'elle perd tout ou partie de son activité par rapport à l'activité de l'enzyme convenablement repliée. La  $T_m$  permet notamment d'estimer la thermostabilité de l'enzyme considérée. La  $T_m$  peut être mesurée par tout moyen connu de l'homme de l'art, notamment la DSF (analyse fluorimétrique différentielle). De manière alternative, la  $T_m$  peut être évaluée par analyse du repliement de la protéine en utilisant la méthode du dichroïsme circulaire. De préférence, la  $T_m$  est mesurée en utilisant la DSF telle qu'exposé dans la partie expérimentale.

Dans un mode préféré, l'enzyme est sélectionnée parmi les enzymes ayant une  $T_m$  supérieure ou égale à la température  $T+10^\circ\text{C}$ , préférentiellement supérieure ou égale à la température  $T+15^\circ\text{C}$ , plus préférentiellement supérieure ou égale à la température  $T+20^\circ$ .

L'activité de dépolymérisation d'une enzyme sur un polymère peut être évaluée par tous moyens connus de l'homme de l'art. Par exemple, elle peut être évaluée par la perte de masse du polymère ou la mesure du taux de dépolymérisation du polymère, i.e. la quantité de monomères et/ou oligomères produits sur une période de temps. Ainsi dans le contexte de l'invention, l'activité de dépolymérisation d'une enzyme dégradant le PET peut être évaluée en mesurant les quantités d'oligomères (BHET et/ou MHET) et/ou de monomères (acide téréphtalique et/ou éthylène glycol et/ou DMT) relarguées dans des conditions particulières de température et de pH et en mettant en contact le PET ou le matériau plastique contenant le PET avec ladite enzyme. L'activité de dépolymérisation peut également être évaluée par le suivi de l'ajout de base au cours de la réaction de dépolymérisation. Une addition de base est en effet réalisée de manière à neutraliser l'acide téréphtalique produit par la dépolymérisation et ainsi réguler le pH. Aussi la quantité de base ajoutée au cours de la réaction permet de mesurer la quantité d'acide téréphtalique produit lors de la réaction.

Avantageusement, ladite enzyme est sélectionnée parmi les cutinases, les lipases et les estérases dégradant ledit PET.

Par exemple, l'enzyme peut être sélectionnée parmi les cutinases issues de *Thermobifida cellulosityca*, *Thermobifida halotolerans*, *Thermobifida fusca*, *Thermobifida alba*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium solani pisi*, *Humicola insolens* (telle que celle référencée A0A075B5G4 dans la base Uniprot), *Sirococcus conigenus*, *Pseudomonas mendocina* et *Thielavia terrestris* ou un variant de celles-ci.

Dans un autre cas, la cutinase est sélectionnée parmi les cutinases issues de banques métagénomiques telle que la LC-Cutinase décrite dans Sulaiman *et al.*, 2012 ou des variants de cette dernière.

Dans un autre cas, l'enzyme est une lipase, préférablement issue de *Ideonella sakaiensis*. De manière alternative, l'enzyme peut être sélectionnée parmi les enzymes commerciales telle que Novozym 51032 ou des variants de ces enzymes.

Il est bien entendu possible de charger le réacteur avec plusieurs enzymes, et notamment au moins deux enzymes parmi celles évoquées ci-dessus.

Dans un cas particulier, l'enzyme (ou les enzymes) est sélectionnée parmi les enzymes ayant une séquence en acides aminés présentant au moins 75% d'identité avec SEQ ID N°1 et/ou avec SEQ ID N°2 et/ou avec SEQ ID N°3 et/ou avec SEQ ID N°4 et/ou SEQ ID N°5, et ayant une activité de dépolymérisation du PET. Dans un cas particulier, l'enzyme est sélectionnée parmi les enzymes ayant une séquence en acides aminés présentant au moins 75% d'identité avec SEQ ID N°1, et une activité de dépolymérisation du PET.

Dans un mode particulier l'enzyme est apte à dépolymériser le polymère jusqu'aux oligomères, dans ce cas-là elle est avantageusement associée à une enzyme apte à dépolymériser lesdits oligomères en monomères. Dans un exemple particulier, les deux enzymes sont alors sélectionnées parmi les enzymes ayant une séquence en acides aminés présentant au moins 75% d'identité avec SEQ ID N°4 et/ou SEQ ID N°5.

Les inventeurs ont identifié que le procédé de l'invention était particulièrement adapté dans le cas particulier où l'enzyme sélectionnée a une séquence en acides aminés présentant au moins 90% d'identité avec SEQ ID N°1 et comprenant au moins une combinaison de mutations sélectionnée parmi F208I + D203C + S248C + Y92G, F208W + D203C + S248C + Y92G ou F208I + D203C + S248C + V170I Y92G + Y92127G par rapport à la SEQ ID N°1.

Avantageusement, le temps tD est inférieur ou égal à 20h, préférentiellement inférieur ou égal à 18h, 16h, 14h, 12h, 10h. Dans un mode de mise en œuvre, le temps tD est compris entre 1h et 16h, préférentiellement entre 1h et 10h. Inversement, le temps de cristallisation tR est préférentiellement supérieur ou égal à 20h, préférentiellement inférieur ou égal à 18h, 16h, 14h, 12h, 10h.

Dans un mode de mise en œuvre particulier, le temps tR correspond au temps nécessaire pour que ledit PET, présentant une cristallinité initiale inférieure ou égale à 25%, atteigne une cristallinité de 30% à ladite température T.

Ainsi, dans un mode de mise en œuvre particulier, le procédé de dépolymérisation enzymatique de polyéthylène téréphtalate (PET) selon l'invention est caractérisé en ce que

- le PET présente un degré de cristallinité initial d'au plus 25% ;

- l'étape de dépolymérisation est conduite à une température T égale à la Tg +/- 10°C dudit PET, et

- l'enzyme est sélectionnée de manière à ce qu'un temps de dépolymérisation (tD) du PET par ladite enzyme soit strictement inférieur à un temps de cristallisation (tR) dudit PET, dans lequel le temps tD représente le temps nécessaire à l'enzyme sélectionnée pour dépolymériser au moins 80% dudit PET à ladite température T, et le temps tR représente le temps nécessaire audit PET pour atteindre un taux de cristallinité de 30% à ladite température T.

Dans un mode préféré, le temps tD correspond au temps nécessaire à ladite enzyme pour dépolymériser au moins 85% dudit PET à ladite température T, préférentiellement au moins 90%.

Ainsi, dans un mode de mise en œuvre préféré, le procédé de dépolymérisation enzymatique de polyéthylène téréphtalate (PET) selon l'invention est caractérisé en ce que

- le PET présente un degré de cristallinité initial d'au plus 25% ;

- l'étape de dépolymérisation est conduite à une température T égale à la Tg +/- 10°C dudit PET, et

- l'enzyme est sélectionnée de manière à ce qu'un temps de dépolymérisation ( $t_D$ ) du PET par ladite enzyme soit strictement inférieur à un temps de cristallisation ( $t_R$ ) dudit PET, dans lequel le temps  $t_D$  représente le temps nécessaire à l'enzyme sélectionnée pour dépolymériser au moins 85% dudit PET à ladite température T, préférentiellement au moins 90%, et le temps  $t_R$  représente le temps nécessaire audit PET pour atteindre un taux de cristallinité de 35%, préférentiellement 30% à ladite température T.

#### *Etape de dépolymérisation*

L'étape de dépolymérisation selon l'invention est avantageusement mise en œuvre dans un réacteur dont le volume est supérieur à 500 millilitres (mL), supérieur à 1 litre (L), préférentiellement supérieur à 2 L, 5 L, 10 L. Dans un mode de réalisation particulier, le procédé de l'invention peut être mis en œuvre à l'échelle industrielle et/ou semi-industrielle. Il est ainsi possible d'utiliser un réacteur dont le volume est supérieur à 100L, 150L, 1000L, 10 000 L, 100 000 L, 400 000 L.

Selon l'invention, il est possible de charger le réacteur destiné à la réalisation de l'étape de dépolymérisation directement en PET, ou en matériaux plastiques contenant au moins le PET.

Selon l'invention, la quantité d'enzyme engagée pendant l'étape de dépolymérisation est avantageusement suffisante pour permettre une dépolymérisation totale ou quasi-totale dudit PET (i.e., à hauteur au moins de 80% en poids par rapport au poids dudit PET engagé) dans des temps de réaction compatibles avec une mise en œuvre à l'échelle industrielle.

Dans un mode de réalisation, le ratio en poids quantité d'enzyme engagée sur quantité de PET engagée est compris entre 0,01/1000 et 3/1000. Préférentiellement le ratio quantité d'enzyme engagée sur quantité de PET engagée est compris entre 0,5/1000 et 2,5/1000, plus préférentiellement entre 1/1000 et 2/1000. Dans un cas particulier, la quantité d'enzyme engagée est supérieure ou égale à la quantité d'enzyme nécessaire pour atteindre une concentration saturante en enzyme. Dans un cas particulier, l'enzyme peut être engagée sous la forme d'une composition comprenant en plus de l'enzyme des excipients, pouvant être sélectionnés parmi les tampons communément utilisés en biochimie, des conservateurs, et/ou des agents stabilisants. La quantité d'enzyme désigne alors avantageusement la quantité d'enzyme exempte de tout excipient.

Selon l'invention, l'étape de dépolymérisation du PET est conduite à une température T égale à la Tg +/- 10°C dudit PET, la Tg étant celle dudit PET avant l'étape de dépolymérisation. De manière avantageuse, la température est maintenue en-dessous de la température d'inactivation de l'enzyme. Dans un mode particulier, l'étape de dépolymérisation du PET est conduite à une température T comprise entre la Tg- 10°C et la Tg +5°C du PET. Dans un autre mode particulier, l'étape de dépolymérisation est conduite à une température T comprise entre la Tg- 8°C et la Tg +2°C du PET.

Dans un mode particulier, le PET a une Tg de 78°C+/-2°C et l'étape de dépolymérisation est réalisée à une température T égale à 70°C +/-2°C. Dans un autre mode particulier, le PET a une Tg de 78°C+/-2°C et l'étape de dépolymérisation est réalisée à une température T égale à 72°C +/-2°C.

Dans un mode particulier, l'étape de dépolymérisation est réalisée à une température T comprise entre 66°C et 80°C, préférentiellement entre 68°C et 73°C. Dans un mode particulier, l'étape de dépolymérisation est réalisée à une température T de 72°C+/- 1°C. Dans un autre mode particulier, l'étape de dépolymérisation est réalisée à une température T de 70°C+/- 1°C.

Ainsi, dans un mode de mise en œuvre particulier, le procédé de dépolymérisation enzymatique de polyéthylène téréphtalate (PET) selon l'invention est caractérisé en ce que

- le PET présente un degré de cristallinité initial d'au plus 25% et une Tg comprise entre 65°C+/-1°C et 80°C+/-1°C ;
- l'étape de dépolymérisation est conduite à une température T comprise entre 66°C et 80°C, préférentiellement entre 68°C et 73°C, et
- l'enzyme est sélectionnée de manière à ce qu'un temps de dépolymérisation (tD) du PET par ladite enzyme soit strictement inférieur à un temps de cristallisation (tR) dudit PET, dans lequel le temps tD représente le temps nécessaire à l'enzyme sélectionnée pour dépolymériser au moins 80% dudit PET à ladite température T, et le temps tR représente le temps nécessaire audit PET pour atteindre un taux de cristallinité de 35% à ladite température T.

Dans un autre mode de mise en œuvre particulier, le procédé de dépolymérisation enzymatique de polyéthylène téréphtalate (PET) selon l'invention est caractérisé en ce que

- le PET présente un degré de cristallinité initial d'au plus 25% et une Tg comprise entre 65°C+/-1°C et 80°C+/-1°C;

- l'étape de dépolymérisation est conduite à une température T de 72°C+/- 1°C, et

5 - l'enzyme est sélectionnée de manière à ce qu'un temps de dépolymérisation (tD) du PET par ladite enzyme soit strictement inférieur à un temps de cristallisation (tR) dudit PET, dans lequel le temps tD représente le temps nécessaire à l'enzyme sélectionnée pour dépolymériser au moins 80%, préférentiellement au moins 85%, plus préférentiellement au moins 90% dudit PET à ladite température T, et le temps tR représente le temps nécessaire audit PET pour atteindre un taux de cristallinité de 35% à ladite température T.

10 Dans un autre mode de mise en œuvre particulier, le procédé de dépolymérisation enzymatique de polyéthylène téréphtalate (PET) selon l'invention est caractérisé en ce que

- le PET présente un degré de cristallinité initial d'au plus 25% et une Tg comprise entre 65°C+/-1°C et 80°C+/-1°C;

- l'étape de dépolymérisation est conduite à une température T de 70°C+/- 1°C, et

15 - l'enzyme est sélectionnée de manière à ce qu'un temps de dépolymérisation (tD) du PET par ladite enzyme soit strictement inférieur à un temps de cristallisation (tR) dudit PET, dans lequel le temps tD représente le temps nécessaire à l'enzyme sélectionnée pour dépolymériser au moins 80%, préférentiellement au moins 85%, plus préférentiellement au moins 90% dudit PET à ladite température T, et le temps tR représente le temps nécessaire audit PET pour atteindre  
20 un taux de cristallinité de 35% à ladite température T.

Dans un mode particulier, le temps de cristallisation (tR) du PET est mesuré préalablement à l'étape de dépolymérisation, sur un échantillon dudit PET.

Selon l'invention, l'enzyme est sélectionnée de manière à ce que le temps de dépolymérisation (tD) du PET par ladite enzyme soit strictement inférieur au temps de cristallisation (tR) dudit  
25 PET. Préférentiellement, l'enzyme est sélectionnée de manière à ce que le temps tD corresponde au temps nécessaire à ladite enzyme pour dépolymériser au moins 90% dudit PET à ladite température T, et pour que le temps tR corresponde au temps nécessaire audit PET pour

atteindre un taux de cristallinité de 30% à ladite température T. Dans un mode particulier, le temps tD est inférieur à 20h, préférentiellement inférieur à 18h, 16h, 14h, 12h, 10h. Dans un autre mode particulier, le temps tD est compris entre 1h et 16h, préférentiellement entre 1h et 10h.

- 5 Selon l'invention, l'étape de dépolymérisation du PET est réalisée par une mise en contact dudit PET et de ladite enzyme sélectionnée à une température T.

De manière avantageuse, le pH est régulé afin d'optimiser le rendement du procédé de dépolymérisation en fonction de la solubilité des monomères / oligomères. Dans un mode de réalisation particulier, le pH est régulé pour être maintenu au pH optimal de l'enzyme +/- 1.

- 10 Particulièrement, le pH est ainsi régulé pour être maintenu entre 6,5 et 9. Dans un mode de mise en œuvre particulier, le pH est régulé entre 6,5 et 8,5 pendant l'étape de dépolymérisation, préférentiellement entre 7 et 8. Dans un autre cas particulier, le pH est régulé entre 7,5 et 8,5.

- 15 Selon l'invention, le contenu du réacteur est maintenu sous agitation pendant l'étape de dépolymérisation. La vitesse de l'agitation est régulée par l'homme de l'art de manière à être suffisante pour permettre une suspension du matériau plastique/polyester engagé dans le réacteur, une homogénéité de la température et une précision de la régulation du pH. Par exemple, la vitesse de l'agitation est maintenue entre 50 rpm et 500 rpm, notamment à 80 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm, 250 rpm, 300 rpm, 350 rpm, 350 rpm, 400 rpm, 450 rpm, 500 rpm.

## EXEMPLES

- 20 Exemple 1 : Mesure du temps de cristallisation (tR) du PET

### 1.1 Amorphisation du PET du matériau plastique

- 25 Le procédé de dépolymérisation est réalisé à partir de paillettes plastiques colorées et lavées issues de la filière de recyclage de déchets plastiques en PET. Ces matériaux plastiques, composés à 98% m/m (en poids) de PET avec un taux de cristallinité moyen de 34%, ont subi une étape d'extrusion, suivie d'un refroidissement rapide permettant l'amorphisation du PET contenu dans les déchets. L'extrudeuse utilisée pour l'amorphisation était une extrudeuse double vis KMB ZE 60A équipée d'une pompe à engrenage, d'un changeur de filtre, d'une filière et d'un système de coupe en tête sous eau. La température réglée était à 265°C dans les zones

de l'extrudeuse, à 280°C dans la pompe à engrenage, à 280°C dans les zones de changeur de filtre et à 360 °C dans la filière. L'eau utilisée dans le système de granulation a été réglée à une température de 80°C. Le jonc arrivant en tête d'extrudeuse est ensuite immédiatement immergé dans un bain à 10°C. Pour introduire les paillettes, un système de dosage gravimétrique commercialisé par Brabender a été utilisé. Un débit de 150 kg / h a été utilisé. Pour la granulation, une filière comportant 120 trous de 0,8 mm de diamètre a été utilisée. La vitesse de coupe était de 4500 tr / min. L'amorphisation a permis d'obtenir des granulés de taille inférieure à 1 mm dont le degré de cristallinité a été mesuré à 16% (par DSC). Les granulés ont ensuite subi une étape de réduction en poudre à l'aide d'un pulvérisateur à disques. La poudre a été soumise à un tamis de 400µm pour ne récupérer que les poudres de taille inférieure. Le taux de cristallinité de cette poudre a été déterminé à 16% conformément à l'exemple 1.2 ci-dessous.

### 1.2 Mesure de la Tg et du degré de cristallinité du PET

Pour l'analyse DSC, un appareil Mettler Toledo DSC 3 a été utilisé avec un flux d'air sec. Seul le premier balayage en température a été réalisé pour déterminer les caractéristiques thermiques de la poudre de PET, à partir d'un échantillon de poudre issue de l'Exemple 1.1, en particulier la température de transition vitreuse (Tg) et le niveau de cristallinité initial. La montée en température a été effectuée de 25°C à 280 ° C avec une vitesse de chauffe de 10 ° C / min avec environ 10 mg d'échantillon en utilisant un creuset en aluminium de 40 µL.

La Tg a été déterminée, à l'aide du logiciel STARE Mettler Toledo, au milieu de la transition vitreuse représentée sur le thermogramme de l'échantillon, et le degré de cristallinité initial conformément à l'équation détaillée dans la description.

La Tg de la poudre de PET produite dans l'Exemple 1.1 a été évaluée à 78,4°C.

### 1.3 Mesure de la cinétique de cristallisation du PET du matériau plastique

5 g de poudre issue de l'Exemple 1.1 (matériaux plastiques contenant du PET) et 20 ml d'eau ont été mélangés dans un flacon de 40 ml. Le flacon fermé a ensuite été immergé dans un bain-marie réglé à la température T voulue d'incubation. Des prélèvements à différents intervalles de temps ont été effectués. La poudre prélevée a été déposée sur un papier absorbant pour un

séchage à l'air ambiant pendant au moins 12h. Une analyse DSC a ensuite été effectuée sur environ 10 mg d'échantillon pour évaluer le taux de cristallinité comme indiqué dans l'exemple 1.2.

La Figure 1 montre l'évolution de la cristallinité du PET en fonction du temps, à différentes températures : 65°C, 70°C, 72°C, 75°C.

A 65°C la cristallinité du PET dans la poudre de l'exemple 1.1 évolue très peu et, après 72h à 65°C, la cristallinité reste en dessous de 20% (données non montrées). Ce sera ainsi également le cas pour les températures inférieures à 65°C.

A 70°C, 72°C et 75°C, le PET atteint 35% de cristallinité au bout de respectivement 17,5h ; 11,5h et 5h. A 70°C, 72°C et 75°C, le PET atteint 30% de cristallinité au bout de respectivement 16h ; 10h et 4,3 h.

## Exemple 2 : Evaluation des températures de fusion (T<sub>m</sub>) des enzymes

### 2.1 Production des enzymes

Les gènes ont été exprimés dans des cellules compétentes de *E. coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs, Ipswich, MA) par culture dans un milieu auto-inductible ZYM (Studier et al., 2005 - Prot. Exp. Pur. 41, 207-234) pendant 23 heures à 21°C. Les cellules de *E. coli* ont été récoltées par centrifugation (6 000 x g, 10 min à 4°C) et mises en suspension dans du tampon de lyse (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 300 mM). Les cellules ont été cassées par sonication sur glace et le lysat a été clarifié par centrifugation (10 000 x g, 30 min à 4°C). La fraction soluble a été soumise à une résine à affinité métallique TALON (Clontech, CA). Après lavage des protéines non liées avec le tampon de lyse additionné d'imidazole 10 mM, les protéines liées ont été éluées avec un tampon d'éluion (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 300 mM, imidazole 100 mM). Le tampon a finalement été échangé pour un tampon de stockage (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 300 mM) par dialyse. La concentration en protéines purifiées a été déterminée sur la base du coefficient d'extinction molaire calculé à 280 nm.

### 2.2 Evaluation de la T<sub>m</sub>

La DSF a été utilisée pour évaluer les températures de fusion (T<sub>m</sub>) des enzymes utilisées.

Des échantillons de protéines ont été préparés à une concentration de 14  $\mu\text{M}$  (0,4 mg/mL) et conservés dans un tampon constitué de Tris HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM. La solution mère SYPRO Orange Dye 5000x DMSO a d'abord été diluée 250 fois dans de l'eau. Les échantillons de protéines ont été chargés sur une plaque PCR 96 puits (Lifescience Bio-Rad, France, cat# HSP9601), chaque puits contenant un volume final de 25  $\mu\text{L}$ . La concentration finale de protéine et de colorant SYPRO Orange dans chaque puits était respectivement de 5  $\mu\text{M}$  (0,14 mg/ml) et 10 x. Les volumes chargés par puits étaient les suivants : 15  $\mu\text{L}$  de tampon, 9  $\mu\text{L}$  de la solution protéique à 0,4 mg/mL et 1  $\mu\text{L}$  de la solution diluée 250 x SYPRO Orange. Les plaques PCR ont ensuite été scellées avec une bande adhésive de qualité optique et centrifugées à 2000 tour/min pendant 1 min à température ambiante. Des expériences DSF ont ensuite été effectuées en utilisant un système PCR en temps réel Bio-Rad CFX96 réglé sur le canal FRET pour utiliser les filtres d'excitation 450/490 et d'émission 560/580. Les échantillons ont été chauffés de 25 à 100°C à une vitesse de 1°C/min. Une mesure de fluorescence a été effectuée tous les 0,3°C. La température de fusion a été déterminée à partir du (des) pic (s) des premières dérivées de la courbe de fusion en utilisant le logiciel Bio-Rad CFX Manager. Les valeurs de  $T_m$  correspondent à la moyenne de 3 mesures.

Tableau 1 : Température de fusion en fonction des enzymes

<b>Enzymes dégradant le PET</b>	<b><math>T_m</math></b>
E1 : SEQ ID N°1	84,7°C
E2 : SEQ ID N°1 + F208I + D203C + S248C + Y92G	94,0°C
E3 : SEQ ID N°1 + F208W + D203C + S248C + Y92G	98,0°C
E4 : SEQ ID N°1 + F208I + D203C + S248C + V170I + Y92G	94,6°C

### Exemple 3 : Procédé de dépolymérisation en réacteur

Le procédé a été réalisé dans un bioréacteur de 500 ml Minibio (Applikon Biotechnology, Delft, Pays-Bas). 0,69  $\mu\text{mol}$  à 1,10  $\mu\text{mol}$  de protéine purifiée (produite conformément à l'Exemple 2.1.) préparée dans 80 ml de tampon phosphate de potassium 100 mM, pH 8, ont été combinés à 20 g de la poudre contenant le PET préparée selon l'Exemple 1 ( $X_c = 16\%$ ,  $T_g = 78,4^\circ\text{C}$ ). La régulation de la température a été effectuée par immersion dans un bain d'eau et une seule

turbine marine a été utilisée pour maintenir une agitation constante à 250 tour/min. Le pH a été régulé à 8 avec du NaOH 6 N et assuré par le système de contrôle my-Control bio (Applikon Biotechnology, Delft, Pays-Bas), et la consommation de base a été enregistrée pendant la durée du procédé.

- 5 La caractérisation du taux de dépolymérisation du PET a été réalisée via le prélèvement régulier d'échantillons soumis à une analyse par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (UHPLC) pour mesure de la quantité d'équivalent acide téréphtalique produit selon la méthode décrite ci-dessous. La quantité d'acide téréphtalique produite peut également être estimée via la quantité de base rajoutée dans le milieu au cours de la réaction.
  
- 10 La concentration en équivalent AT a été déterminée par chromatographie (UHPLC). Si nécessaire (en présence d'AT insoluble), les échantillons ont été dilués dans du tampon phosphate de potassium 100 mM, pH 8. 150  $\mu$ L de méthanol et 6,5  $\mu$ L de HCl 6 N ont été ajoutés à 150  $\mu$ L d'échantillon ou de dilution. Après homogénéisation et filtration à travers un filtre à seringue de 0,45  $\mu$ m, 20  $\mu$ L d'échantillon ont été injectés dans l'UHPLC, système  
15 Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) comprenant un module de pompe, un échantillonneur automatique, un four à colonne thermostaté à 25°C et un détecteur UV à 240 nm. L'acide téréphtalique (AT) et les molécules produites (MHET et BHET) ont été séparés en utilisant un gradient de méthanol (30% à 90%) dans du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mM à 1 m/min à travers une colonne HPLC Discovery HS C18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) équipée d'un  
20 précolonne (Supelco, Bellefonte, PA). Le AT, le MHET et le BHET ont été mesurés selon des courbes standard préparées à partir du AT et du BHET du commerce et du MHET synthétisé en interne. L'équivalent AT correspond à la somme du AT mesuré et du AT contenu dans les MHET et BHET mesurés.

- Les enzymes de l'exemple 2 ont été testées à différentes températures (70°C +/- 1°C et 72°C  
25 +/-1 °C) afin d'évaluer lesquelles pouvaient être sélectionnées pour mettre en œuvre le procédé de l'invention à ces différentes températures. Les enzymes ont ainsi été testées à une concentration saturante. Des tests à une température de 60°C ont également été réalisés, la température de 60°C correspondant à la température traditionnellement utilisée dans les procédés de dépolymérisation de l'art antérieur (contrôle négatif).

Pour rappel, les temps de cristallisation  $t_R$  du PET issu de l'exemple 1.1 pour atteindre 30% et 35% de cristallinité sont respectivement de 16h et 17,5h à 70°C, et 10h et 11,5h à 72°C.

Les tableaux 2, 3, 4 et 5 ci-dessous indiquent respectivement la mesure des temps  $t_D$  des enzymes E1, E2, E3, et E4 à différentes températures.

		60°C		72°C	
Enzymes	T <sub>m</sub>	t <sub>D</sub> (80%)	t <sub>D</sub> (90%)	t <sub>D</sub> (80%)	t <sub>D</sub> (90%)
E1	84,7°C	28 h	36 h	Jamais atteint	Jamais atteint

5 Tableau 2 : Mesure des temps  $t_D$  de E1 à 60°C (contrôle) et 72°.

Pour E1,  $t_D$  est ainsi supérieur à  $t_R$  à 72°C. L'enzyme ne peut donc pas être sélectionnée pour la mise en œuvre du procédé de l'invention. Une des raisons est qu'elle n'est pas suffisamment stable et/ou active pour atteindre 80% de conversion avant que le PET n'ait atteint un taux de cristallinité supérieur à 30%.

		60°C		72°C	
Enzymes	T <sub>m</sub>	t <sub>D</sub> (80%)	t <sub>D</sub> (90%)	t <sub>D</sub> (80%)	t <sub>D</sub> (90%)
E2	94,0°C	18 h	21 h	6 h	9 h

10 Tableau 3 : Mesure des temps  $t_D$  de E2 à 60°C (contrôle) et 72°C.

L'enzyme E2 peut être sélectionnée pour mettre en œuvre le procédé de l'invention à 72°C permettant une amélioration significative du rendement par rapport à un procédé à 60°C (diminution par 2,3 du temps pour atteindre 90% de dépolymérisation). E2 a à la fois une T<sub>m</sub> suffisamment élevée (> T + 20°C) et un  $t_D$  suffisamment bas pour atteindre 80% de dépolymérisation avant que le PET n'ait atteint une cristallinité trop élevée ( $t_R$  pour atteindre 30% de cristallinité = 10h) à 72°C.

		72°C	
Enzymes	T <sub>m</sub>	t <sub>D</sub> (80%)	t <sub>D</sub> (90%)
E3	98,0°C	7 h	10 h

Tableau 4 : Mesure des temps  $t_D$  de E3 à 72°C.

De manière équivalente à E2, E3 peut être sélectionnée pour mettre en œuvre le procédé de l'invention à 72°C.

		<b>60°C</b>		<b>70°C</b>	<b>72°C</b>	
<b>Enzymes</b>	<b>Tm</b>	<b>tD (80%)</b>	<b>tD (90%)</b>	<b>tD (80%)</b>	<b>tD (80%)</b>	<b>tD (90%)</b>
E4	94,6°C	17 h	20 h	12 h	7 h	10 h

Tableau 5 : Mesure des temps tD de E4 à 60°C (contrôle), 70°C et 72°C.

De manière équivalente à E2 et E3, E4 peut également être sélectionnée pour mettre en œuvre le procédé de l'invention à 70°C et à 72°C, permettant une amélioration significative du rendement par rapport à un procédé à 60°C.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de dépolymérisation enzymatique de polyéthylène téréphtalate (PET) par mise en contact dudit PET avec une enzyme apte à dépolymériser ledit PET, caractérisé en ce que

5 - le PET présente un degré de cristallinité initial d'au plus 25% ;

- l'étape de dépolymérisation est conduite à une température T égale à la Tg +/- 10°C dudit PET, et

10 - l'enzyme est sélectionnée de manière à ce qu'un temps de dépolymérisation (tD) du PET par ladite enzyme soit strictement inférieur à un temps de cristallisation (tR) dudit PET, dans lequel le temps tD représente le temps nécessaire à ladite enzyme pour dépolymériser au moins 80% dudit PET à ladite température T, et le temps tR représente le temps nécessaire audit PET pour atteindre un taux de cristallinité de 35% à ladite température T.

2. Procédé de dépolymérisation selon la revendication 1, caractérisé en ce que la température T est comprise entre la Tg- 10°C et la Tg +5°C du PET.

15 3. Procédé de dépolymérisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la température T est comprise entre 66°C et 80°C, préférentiellement entre 68°C et 73°C.

20 4. Procédé de dépolymérisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le temps de cristallisation du PET est mesuré préalablement à l'étape de dépolymérisation, sur un échantillon dudit PET.

5. Procédé de dépolymérisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'enzyme sélectionnée présente un temps tD inférieur ou égal à 20h.

25 6. Procédé de dépolymérisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'enzyme est sélectionnée parmi les enzymes ayant une température de fusion (Tm) strictement supérieure à la température T.

7. Procédé de dépolymérisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'enzyme est sélectionnée parmi les enzymes ayant une  $T_m$  supérieure ou égale à la température  $T+10^\circ\text{C}$ , préférentiellement supérieure ou égale à la température  $T+15^\circ\text{C}$ , plus préférentiellement supérieure ou égale à  $T+20^\circ\text{C}$ .

5 8. Procédé de dépolymérisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le taux de cristallinité initial du PET est inférieur à 20%.

9. Procédé de dépolymérisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le temps de dépolymérisation ( $t_D$ ) est compris entre 1h et 16h, préférentiellement entre 1h et 10h.

10

10. Procédé de dépolymérisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le PET est soumis à une étape d'amorphisation préalablement à l'étape de dépolymérisation.

15

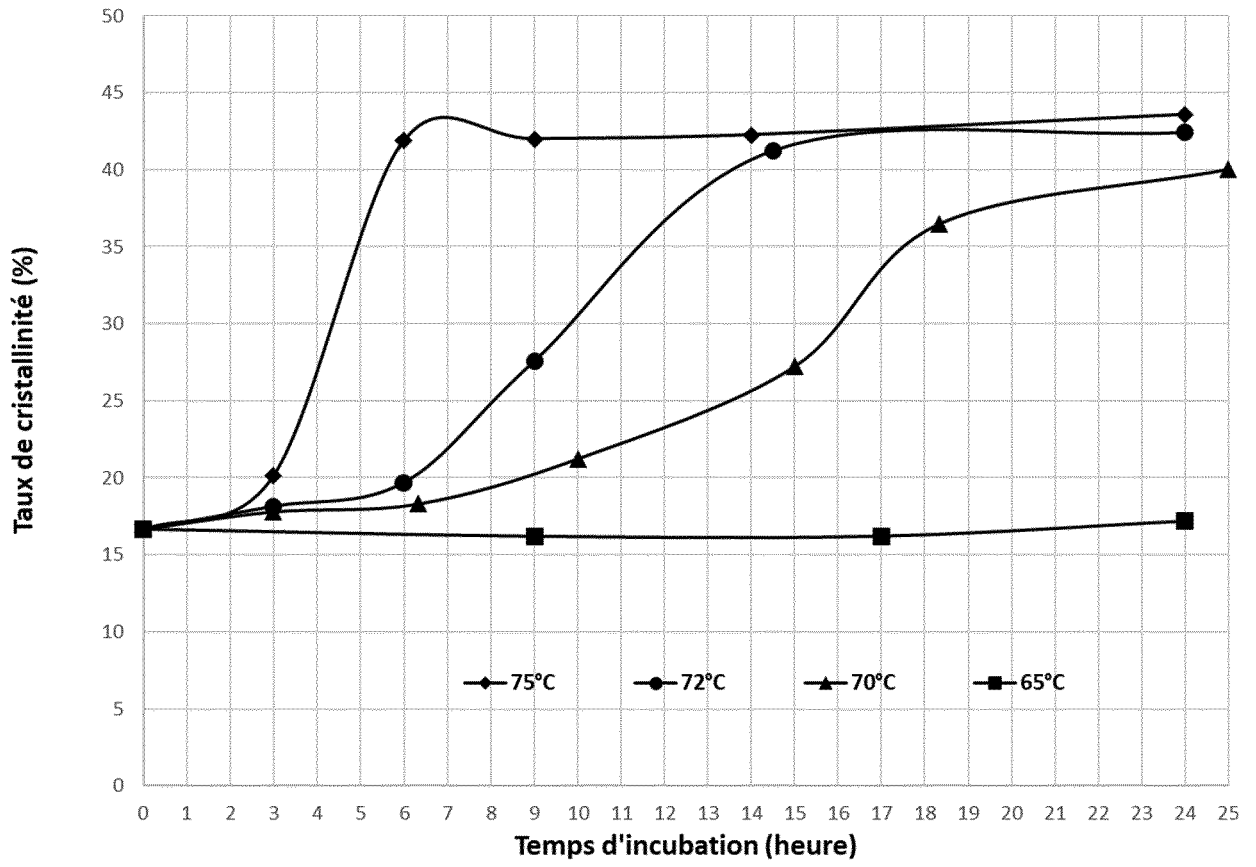


FIGURE 1

Untitled\_ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> CARBIOS  
<120> PROCEDE DE DEGRADATION ENZYMATIQUE DE POLYETHYLENE TEREPHTALATE  
<130> B2874FR00  
<160> 5  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 258  
<212> PRT  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> LC-Cutinase  
<400> 1

Ser Asn Pro Tyr Gln Arg Gly Pro Asn Pro Thr Arg Ser Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Ala Asp Gly Pro Phe Ser Val Ala Thr Tyr Thr Val Ser Arg Leu Ser  
20 25 30

Val ser Gly Phe Gly Gly Gly Val Ile Tyr Tyr Pro Thr Gly Thr Ser  
35 40 45

Leu Thr Phe Gly Gly Ile Ala Met Ser Pro Gly Tyr Thr Ala Asp Ala  
50 55 60

Ser Ser Leu Ala Trp Leu Gly Arg Arg Leu Ala Ser His Gly Phe Val  
65 70 75 80

Val Leu Val Ile Asn Thr Asn Ser Arg Phe Asp Tyr Pro Asp Ser Arg  
85 90 95

Ala Ser Gln Leu Ser Ala Ala Leu Asn Tyr Leu Arg Thr Ser Ser Pro  
100 105 110

Ser Ala Val Arg Ala Arg Leu Asp Ala Asn Arg Leu Ala Val Ala Gly  
115 120 125

His Ser Met Gly Gly Gly Gly Thr Leu Arg Ile Ala Glu Gln Asn Pro  
130 135 140

Ser Leu Lys Ala Ala Val Pro Leu Thr Pro Trp His Thr Asp Lys Thr  
145 150 155 160

Phe Asn Thr Ser Val Pro Val Leu Ile Val Gly Ala Glu Ala Asp Thr  
165 170 175

Val Ala Pro Val Ser Gln His Ala Ile Pro Phe Tyr Gln Asn Leu Pro  
180 185 190

Untitled\_ST25.txt

Ser Thr Thr Pro Lys Val Tyr Val Glu Leu Asp Asn Ala Ser His Phe  
195 200 205

Ala Pro Asn Ser Asn Asn Ala Ala Ile Ser Val Tyr Thr Ile Ser Trp  
210 215 220

Met Lys Leu Trp Val Asp Asn Asp Thr Arg Tyr Arg Gln Phe Leu Cys  
225 230 235 240

Asn Val Asn Asp Pro Ala Leu Ser Asp Phe Arg Thr Asn Asn Arg His  
245 250 255

Cys Gln

<210> 2  
<211> 258  
<212> PRT  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> poly(ethylene terephthalate) hydrolase [bacterium HR29]

<400> 2

Ser Asn Pro Tyr Gln Arg Gly Pro Asn Pro Thr Arg Ser Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Thr Asp Gly Pro Phe Ser Val Ala Thr Tyr Ser Val Ser Arg Leu Ser  
20 25 30

Val Ser Gly Phe Gly Gly Gly Val Ile Tyr Tyr Pro Thr Gly Thr Thr  
35 40 45

Leu Thr Phe Gly Gly Ile Ala Met Ser Pro Gly Tyr Thr Ala Asp Ala  
50 55 60

Ser Ser Leu Ala Trp Leu Gly Arg Arg Leu Ala Ser His Gly Phe Val  
65 70 75 80

Val Ile Val Ile Asn Thr Asn Ser Arg Leu Asp Phe Pro Asp Ser Arg  
85 90 95

Ala Ser Gln Leu Ser Ala Ala Leu Asn Tyr Leu Arg Thr Ser Ser Pro  
100 105 110

Ser Ala Val Arg Ala Arg Leu Asp Ala Asn Arg Leu Ala Val Ala Gly  
115 120 125

His Ser Met Gly Gly Gly Ala Thr Leu Arg Ile Ser Glu Gln Ile Pro  
130 135 140

Untitled\_ST25.txt

Thr Leu Lys Ala Gly Val Pro Leu Thr Pro Trp His Thr Asp Lys Thr  
 145 150 155 160

Phe Asn Thr Pro Val Pro Gln Leu Ile Val Gly Ala Glu Ala Asp Thr  
 165 170 175

Val Ala Pro Val Ser Gln His Ala Ile Pro Phe Tyr Gln Asn Leu Pro  
 180 185 190

Ser Thr Thr Pro Lys Val Tyr Val Glu Leu Asp Asn Ala Thr His Phe  
 195 200 205

Ala Pro Asn Ser Pro Asn Ala Ala Ile Ser Val Tyr Thr Ile Ser Trp  
 210 215 220

Met Lys Leu Trp Val Asp Asn Asp Thr Arg Tyr Arg Gln Phe Leu Cys  
 225 230 235 240

Asn Val Asn Asp Pro Ala Leu Ser Asp Phe Arg Ser Asn Asn Arg His  
 245 250 255

Cys Gln

<210> 3  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> enzyme

<400> 3

Met Ala Asn Pro Tyr Glu Arg Gly Pro Asp Pro Thr Glu Ser Ser Ile  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Gly Pro Phe Ala Val Ala Gln Thr Thr Val Ser Arg  
 20 25 30

Leu Gln Ala Asp Gly Phe Gly Gly Gly Thr Ile Tyr Tyr Pro Thr Asp  
 35 40 45

Thr Ser Gln Gly Thr Phe Gly Ala Val Ala Ile Ser Pro Gly Phe Thr  
 50 55 60

Ala Gly Gln Glu Ser Ile Ala Trp Leu Gly Pro Arg Ile Ala Ser Gln  
 65 70 75 80

Gly Phe Val Val Ile Thr Ile Asp Thr Ile Thr Arg Leu Asp Gln Pro  
 85 90 95

Asp Ser Arg Gly Arg Gln Leu Gln Ala Ala Leu Asp His Leu Arg Thr  
 100 105 110

Untitled\_ST25.txt

Asn Ser Val Val Arg Asn Arg Ile Asp Pro Asn Arg Met Ala Val Met  
115 120 125

Gly His Ser Met Gly Gly Gly Gly Ala Leu Ser Ala Ala Ala Asn Asn  
130 135 140

Thr Ser Leu Glu Ala Ala Ile Pro Leu Gln Gly Trp His Thr Arg Lys  
145 150 155 160

Asn Trp Ser Ser Val Arg Thr Pro Thr Leu Val Val Gly Ala Gln Leu  
165 170 175

Asp Thr Ile Ala Pro Val Ser Ser His Ser Glu Ala Phe Tyr Asn Ser  
180 185 190

Leu Pro Ser Asp Leu Asp Lys Ala Tyr Met Glu Leu Arg Gly Ala Ser  
195 200 205

His Leu Val Ser Asn Thr Pro Asp Thr Thr Thr Ala Lys Tyr Ser Ile  
210 215 220

Ala Trp Leu Lys Arg Phe Val Asp Asp Asp Leu Arg Tyr Glu Gln Phe  
225 230 235 240

Leu Cys Pro Ala Pro Asp Asp Phe Ala Ile Ser Glu Tyr Arg Ser Thr  
245 250 255

Cys Pro Phe

<210> 4  
<211> 263  
<212> PRT  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> enzyme Ideonella sp.

<400> 4

Gln Thr Asn Pro Tyr Ala Arg Gly Pro Asn Pro Thr Ala Ala Ser Leu  
1 5 10 15

Glu Ala Ser Ala Gly Pro Phe Thr Val Arg Ser Phe Thr Val Ser Arg  
20 25 30

Pro Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Thr Val Tyr Tyr Pro Thr Asn Ala Gly  
35 40 45

Gly Thr Val Gly Ala Ile Ala Ile Val Pro Gly Tyr Thr Ala Arg Gln  
50 55 60

Untitled\_ST25.txt

Ser Ser Ile Lys Trp Trp Gly Pro Arg Leu Ala Ser His Gly Phe Val  
65 70 75 80

Val Ile Thr Ile Asp Thr Asn Ser Thr Leu Asp Gln Pro Ser Ser Arg  
85 90 95

Ser Ser Gln Gln Met Ala Ala Leu Arg Gln Val Ala Ser Leu Asn Gly  
100 105 110

Thr Ser Ser Ser Pro Ile Tyr Gly Lys Val Asp Thr Ala Arg Met Gly  
115 120 125

Val Met Gly Trp Ser Met Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ile Ser Ala Ala  
130 135 140

Asn Asn Pro Ser Leu Lys Ala Ala Ala Pro Gln Ala Pro Trp Asp Ser  
145 150 155 160

Ser Thr Asn Phe Ser Ser Val Thr Val Pro Thr Leu Ile Phe Ala Cys  
165 170 175

Glu Asn Asp Ser Ile Ala Pro Val Asn Ser Ser Ala Leu Pro Ile Tyr  
180 185 190

Asp Ser Met Ser Arg Asn Ala Lys Gln Phe Leu Glu Ile Asn Gly Gly  
195 200 205

Ser His Ser Cys Ala Asn Ser Gly Asn Ser Asn Gln Ala Leu Ile Gly  
210 215 220

Lys Lys Gly Val Ala Trp Met Lys Arg Phe Met Asp Asn Asp Thr Arg  
225 230 235 240

Tyr Ser Thr Phe Ala Cys Glu Asn Pro Asn Ser Thr Arg Val Ser Asp  
245 250 255

Phe Arg Thr Ala Asn Cys Ser  
260

<210> 5  
<211> 603  
<212> PRT  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> MHET hydrolase Ideonella sp.

<400> 5

Met Gln Thr Thr Val Thr Thr Met Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Cys Ala Gly Gly Gly Ser Thr Pro Leu Pro Leu Pro Gln Gln Gln  
20 25 30

Untitled\_ST25.txt

Pro Pro Gln Gln Glu Pro Pro Pro Pro Pro Val Pro Leu Ala Ser Arg  
35 40 45

Ala Ala Cys Glu Ala Leu Lys Asp Gly Asn Gly Asp Met Val Trp Pro  
50 55 60

Asn Ala Ala Thr Val Val Glu Val Ala Ala Trp Arg Asp Ala Ala Pro  
65 70 75 80

Ala Thr Ala Ser Ala Ala Ala Leu Pro Glu His Cys Glu Val Ser Gly  
85 90 95

Ala Ile Ala Lys Arg Thr Gly Ile Asp Gly Tyr Pro Tyr Glu Ile Lys  
100 105 110

Phe Arg Leu Arg Met Pro Ala Glu Trp Asn Gly Arg Phe Phe Met Glu  
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Thr Asn Gly Ser Leu Ser Ala Ala Thr Gly Ser Ile  
130 135 140

Gly Gly Gly Gln Ile Ala Ser Ala Leu Ser Arg Asn Phe Ala Thr Ile  
145 150 155 160

Ala Thr Asp Gly Gly His Asp Asn Ala Val Asn Asp Asn Pro Asp Ala  
165 170 175

Leu Gly Thr Val Ala Phe Gly Leu Asp Pro Gln Ala Arg Leu Asp Met  
180 185 190

Gly Tyr Asn Ser Tyr Asp Gln Val Thr Gln Ala Gly Lys Ala Ala Val  
195 200 205

Ala Arg Phe Tyr Gly Arg Ala Ala Asp Lys Ser Tyr Phe Ile Gly Cys  
210 215 220

Ser Glu Gly Gly Arg Glu Gly Met Met Leu Ser Gln Arg Phe Pro Ser  
225 230 235 240

His Tyr Asp Gly Ile Val Ala Gly Ala Pro Gly Tyr Gln Leu Pro Lys  
245 250 255

Ala Gly Ile Ser Gly Ala Trp Thr Thr Gln Ser Leu Ala Pro Ala Ala  
260 265 270

Val Gly Leu Asp Ala Gln Gly Val Pro Leu Ile Asn Lys Ser Phe Ser  
275 280 285

Asp Ala Asp Leu His Leu Leu Ser Gln Ala Ile Leu Gly Thr Cys Asp  
290 295 300

Untitled\_ST25.txt

Ala Leu Asp Gly Leu Ala Asp Gly Ile Val Asp Asn Tyr Arg Ala Cys  
 305 310 315 320

Gln Ala Ala Phe Asp Pro Ala Thr Ala Ala Asn Pro Ala Asn Gly Gln  
 325 330 335

Ala Leu Gln Cys Val Gly Ala Lys Thr Ala Asp Cys Leu Ser Pro Val  
 340 345 350

Gln Val Thr Ala Ile Lys Arg Ala Met Ala Gly Pro Val Asn Ser Ala  
 355 360 365

Gly Thr Pro Leu Tyr Asn Arg Trp Ala Trp Asp Ala Gly Met Ser Gly  
 370 375 380

Leu Ser Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Gly Trp Arg Ser Trp Trp Leu Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Asn Ser Ser Ala Asn Asn Ala Gln Arg Val Ser Gly Phe Ser  
 405 410 415

Ala Arg Ser Trp Leu Val Asp Phe Ala Thr Pro Pro Glu Pro Met Pro  
 420 425 430

Met Thr Gln Val Ala Ala Arg Met Met Lys Phe Asp Phe Asp Ile Asp  
 435 440 445

Pro Leu Lys Ile Trp Ala Thr Ser Gly Gln Phe Thr Gln Ser Ser Met  
 450 455 460

Asp Trp His Gly Ala Thr Ser Thr Asp Leu Ala Ala Phe Arg Asp Arg  
 465 470 475 480

Gly Gly Lys Met Ile Leu Tyr His Gly Met Ser Asp Ala Ala Phe Ser  
 485 490 495

Ala Leu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Glu Arg Leu Gly Ala Ala Met Pro  
 500 505 510

Gly Ala Ala Gly Phe Ala Arg Leu Phe Leu Val Pro Gly Met Asn His  
 515 520 525

Cys Ser Gly Gly Pro Gly Thr Asp Arg Phe Asp Met Leu Thr Pro Leu  
 530 535 540

Val Ala Trp Val Glu Arg Gly Glu Ala Pro Asp Gln Ile Ser Ala Trp  
 545 550 555 560

Ser Gly Thr Pro Gly Tyr Phe Gly Val Ala Ala Arg Thr Arg Pro Leu  
 565 570 575

Untitled\_ST25.txt

Cys Pro Tyr Pro Gln Ile Ala Arg Tyr Lys Gly Ser Gly Asp Ile Asn  
580 585 590

Thr Glu Ala Asn Phe Ala Cys Ala Ala Pro Pro  
595 600

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

---

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN  
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

WO 2017/198786 A1 (CARBIOS [FR])  
23 novembre 2017 (2017-11-23)

WO 2018/011284 A1 (CARBIOS [FR])  
18 janvier 2018 (2018-01-18)

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN  
TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND  
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT