

Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-927



Méthode d'analyse des protéases de type subtilisine et évaluation des concentrations de l'air ambiant de cinq centres hospitaliers

*Geneviève Marchand
Yves Cloutier
Annie Castonguay
Carole Pépin*

*Rym Barafane
Jacques Lavoie
Nicolas Doucet
François Lépine*



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES *travaillent pour vous !*

Mission

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par l'Institut et la CNESST. Abonnement : <https://abonnement.lacsst.com/prevention>

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec
2016
ISBN : 978-2-89631-886-5 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
et de la valorisation de la recherche
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
Juin 2016

Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-927

Méthode d'analyse des protéases de type subtilisine et évaluation des concentrations de l'air ambiant de cinq centres hospitaliers

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

*Geneviève Marchand¹, Yves Cloutier¹,
Annie Castonguay², Carole Pépin¹,
Rym Barafane³, Jacques Lavoie¹,
Nicolas Doucet², François Lépine²*

¹IRSST

²INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec

³Département de santé environnementale et de santé au travail
Université de Montréal



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site Web de l'IRSST.

ÉVALUATION PAR DES PAIRS

Conformément aux politiques de l'IRSST, les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

REMERCIEMENTS

L'équipe de recherche tient à remercier les responsables de la santé et de la sécurité du travail des hôpitaux participants. Ceux-ci ont grandement facilité la réalisation du projet en permettant les échantillonnages en milieu de travail. Un merci particulier est adressé au personnel des unités de stérilisation des centres hospitaliers pour leur collaboration ainsi que pour leur patience lors de nos visites.

Merci à M. Étienne Dubé, dont l'intérêt envers la problématique d'exposition aux enzymes a favorisé la collaboration entre l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) et l'Institut Armand-Frappier (IAF). M. Dubé a spontanément partagé ses connaissances avec l'équipe de recherche et l'a soutenue lors de la préparation des savons pour les analyses protéomiques. Nous exprimons aussi notre reconnaissance à Carol-Anne Villeneuve qui a aidé aux analyses lors de son stage dans le laboratoire du D^r Nicolas Doucet.

Naturellement, il faut remercier M. Yves Beaudet de l'IRSST pour son soutien lors des échantillonnages ainsi que Mme Lucie Madden pour la révision linguistique du rapport de recherche.

SOMMAIRE

La subtilisine est une enzyme protéolytique présente dans une multitude d'utilisations industrielles; elle agit notamment comme dégraissant dans les biofontaines et comme agent de stérilisation en centres hospitaliers. Des réactions allergiques pulmonaires liées à l'exposition aux enzymes protéolytiques que l'on retrouve dans les produits nettoyants ont été rapportées. Il est reconnu que l'exposition aux enzymes en milieu de travail cause des sensibilisations chez les travailleurs et peut induire de l'asthme. Le potentiel allergique de la subtilisine serait identique à celui des autres enzymes telles les amylases, les cellulases et les lipases. Sa valeur d'exposition plafond est très faible (60 ng/m^3) et la recirculation de l'air dans la pièce où elle est utilisée est prohibée. Pourtant, malgré l'existence d'une valeur plafond, il n'existe encore aucune méthode de mesure standardisée et spécifique permettant d'évaluer les risques liés à la présence de subtilisine dans les milieux de travail.

L'objectif principal de cette étude était de développer et d'implanter une méthode d'analyse spécifique de la subtilisine applicable aux concentrations rencontrées en milieu de travail. Bien que non spécifique, une méthode de dosage enzymatique des protéases a été développée. Cette méthode permet d'analyser rapidement les concentrations de toutes protéases (de type subtilisine) dans l'air ambiant des milieux de travail. Elle peut également servir à quantifier les concentrations de protéases contenues dans les savons, ce qui permettait de limiter les campagnes de prélèvements d'échantillons de l'air ambiant dans les hôpitaux qui utilisaient des détergents contenant de la subtilisine. L'analyse des produits utilisés peut ainsi constituer une première étape d'évaluation de l'exposition en milieu de travail. Dans les hôpitaux participants, les prélèvements d'air ambiant ont permis d'établir que l'étape du lavage manuel des instruments et des endoscopes constitue la source principale d'exposition des travailleurs aux aérosols pouvant contenir de la subtilisine. Les laveurs automatiques ne se sont pas avérés être une source d'exposition.

Un objectif secondaire de l'étude consistait à explorer la possibilité de caractériser, par protéomique, les protéines, particulièrement la subtilisine, présentes dans les savons utilisés dans les hôpitaux participants. Les analyses protéomiques ont permis de caractériser les protéines présentes dans les savons et ont confirmé non seulement la présence de subtilisine, mais également celle d'autres enzymes telles que les alpha-amylases. L'analyse protéomique, dans un contexte de santé et de sécurité du travail (SST), présente un potentiel d'utilisation réel pour effectuer la caractérisation des enzymes présentes dans les milieux de travail et doit être explorée.

Le recours à la substitution comme moyen de prévention est certainement une avenue intéressante à envisager puisque les produits sans subtilisine émergent graduellement, mais la substitution doit se réaliser avec prudence. Comme démontré par ce travail de recherche sur l'analyse protéomique, la présence d'autres enzymes sensibilisantes dans les savons est possible et doit être considérée et vérifiée.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES PHOTOS.....	XI
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 L'historique des biotechnologies	1
1.2 Les enzymes	1
1.3 La subtilisine et son utilisation.....	2
1.4 Les effets sur la santé.....	3
1.5 Les normes d'exposition	4
1.6 L'expologie.....	4
1.6.1 Méthodes analytiques.....	5
1.7 Objectif de l'étude.....	7
1.7.1 Hypothèse de travail	8
2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	9
2.1 Dosage enzymatique (protéase)	9
2.1.1 Validation de la méthode analytique.....	9
2.1.2 Analyse des savons	10
2.1.3 Échantillonnage de l'air	10
2.2 Échantillonnage en milieu de travail.....	12
2.3 Méthode d'analyse protéomique (identification subtilisine).....	12
2.3.1 Concentration des protéines	13
2.3.2 Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide	13

2.3.3	Préparation des bandes et extraction des protéines.....	13
2.3.4	Séquençage et identification des protéines	14
3.	RÉSULTATS.....	15
3.1	Méthode de dosage enzymatique.....	15
3.1.1	Validation de la méthode analytique.....	15
3.1.2	Analyse des savons	17
3.2	Échantillonnage de l'air	18
3.2.1	Débits de fonctionnement du Coriolis®µ	18
3.2.2	Efficacité de captation des échantillonneurs.....	19
3.2.3	Comparaison des appareils de prélèvement dans l'enceinte d'exposition.....	19
3.3	Échantillonnage en milieu de travail.....	20
3.4	Méthode d'analyse protéomique (identification subtilisine).....	23
3.4.1	Standard de subtilisine	23
3.4.2	Analyse des savons	23
4.	DISCUSSION.....	25
4.1	Méthode de dosage enzymatique.....	25
4.1.1	Validation de la méthode analytique.....	25
4.1.2	Analyse des savons	26
4.2	Échantillonnage de l'air	27
4.3	Échantillonnage en milieu de travail.....	28
4.4	Méthode d'analyse protéomique (identification subtilisine).....	28
4.4.1	Analyse des savons	28
4.5	Moyens de contrôle	29
4.6	Les portées	30
4.7	Les limites	30
4.8	Applicabilité des résultats	31
5.	CONCLUSION.....	33
	BIBLIOGRAPHIE.....	35

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concentration de protéases de « type subtilisine » dosée dans les savons fournis par les hôpitaux participants.	18
Tableau 2 : Concentration de protéases de « type subtilisine » mesurée dans l'air ambiant de cinq hôpitaux. Échantillonnages réalisés avec un porte-filtre IOM et des filtres en fibre de verre ou un appareil Coriolis®µ.....	22
Tableau 3 : Résultats de l'analyse protéomique pour le contrôle positif.....	23
Tableau 4 : Résultats du dépistage des protéines présentes dans les bandes isolées du gel SDS-PAGE, analysées par LC-MS-MS et identifiées à l'aide de la base de données MASCOT.....	24

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure tertiaire de la subtilisine Carlsberg. Le site actif est représenté par la triade catalytique : acide aspartique (rose), histidine (mauve) et sérine (orange) ⁽⁹⁾	2
Figure 2 : Principe de la méthode enzymatique pour le dosage des protéases.	5
Figure 3 : Principe de la méthode immunologique ELISA pour le dosage de la subtilisine.	6
Figure 4 : Schématisation des étapes nécessaires pour l'identification d'une protéine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS).	7
Figure 5 : Photo (a) et schéma (b) de l'enceinte d'exposition utilisée lors des essais de comparaison des systèmes de captation.	11
Figure 6 : Pourcentage de la variation de fluorescence en fonction de la période d'incubation du substrat et de la subtilisine calculé pour des concentrations d'enzymes variant entre 0,0015 et 50 ng/ml.	16
Figure 7 : Courbe représentant la fluorescence relative mesurée en fonction des concentrations de subtilisine.	16
Figure 8 : Courbe représentant la fluorescence relative mesurée en fonction des concentrations de subtilisine (0,02 à 1,5 ng/ml).	17
Figure 9 : Comparaison des concentrations de subtilisine mesurées dans la suspension du cône de prélèvement du Coriolis®µ ainsi que sur une cassette placée à sa sortie d'air.	19
Figure 10 : Comparaison des concentrations de subtilisine mesurées avec l'appareil Coriolis®µ et le porte-filtre IOM en utilisant l'enceinte d'exposition pour produire l'environnement contrôlé.	20
Figure 11 : Identification par analyse protéomique de la subtilisine pour le contrôle positif, concentration de 37 mg/ml, après un traitement à la trypsine. Deux bandes bien distinctes apparaissent sur le gel SDS-PAGE.	23
Figure 12 : Gel SDS-PAGE montrant les résultats de la migration des cinq concentrés de savon. Des bandes sont observables pour trois savons. Identification des bandes isolées pour l'analyse par spectrométrie. Standard de poids moléculaire (M). Savons analysés : SO, EC, PR, EM, PO.	24
Figure 13 : Représentation schématique de la salle étudiée à l'hôpital 1 : a) Grande salle de stérilisation, prélèvements du côté souillé; b) Petite salle de stérilisation, prélèvements du côté souillé.	41
Figure 14 : Représentation schématique de la salle étudiée à l'hôpital 2.	42
Figure 15 : Représentations schématiques des salles étudiées et des postes de prélèvements effectués à l'hôpital 3 : a) Salle de retraitement des endoscopes; b) Salle de stérilisation, prélèvements côté souillé.	43
Figure 16 : Représentations schématiques des salles étudiées et des postes de prélèvements effectués à l'hôpital 4 : a) Salle de stérilisation, prélèvements côté souillé; b) Salle de prélavage.	44

Figure 17 : Représentation schématique des salles étudiées et des postes de prélèvements effectués à l'hôpital 5 : Salle de stérilisation (côté souillé en bas et propre en haut).45

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Captation à la source utilisée au-dessus des éviers lors des premières étapes de décontamination. La flèche indique l'emplacement du capteur d'air.	21
Photo 2 : Emplacement des pompes de prélèvement près des laveurs automatiques.	47
Photo 3 : Emplacement des pompes de prélèvements près des éviers dans les salles de décontaminations et de retraitement des endoscopes (prénettoyage manuel).	48
Photo 4: Instruments provenant de la chirurgie qui sont lavés en salle de décontamination (prélavage).	49
Photo 5 : Exemple d'affiche de recommandation pour la protection individuelle requise.	50
Photo 6 : Le port d'équipement de protection dans certaines unités.	51
Photo 7 : Espaces de rangement et système d'alimentation automatique pour les savons.	52

1. INTRODUCTION

1.1 L'historique des biotechnologies

Science clé du XXI^e siècle, la biotechnologie a connu ses développements les plus importants au courant du dernier siècle, principalement à la suite de la découverte de l'ADN et de l'ARN, bien qu'elle soit née avec l'agriculture et l'élevage des animaux, il y a des milliers d'années. En effet, par l'utilisation empirique de la génétique pour améliorer les espèces végétales et animales, et dès lors les capacités de production des êtres humains ⁽¹⁾, les premiers agriculteurs l'utilisaient sans le savoir. Cette science dite moderne exploite l'aptitude des microorganismes à la fermentation et ouvre l'ère de la fabrication des antibiotiques, des vaccins et de plusieurs autres produits. La biotechnologie utilise maintenant des techniques avancées de biologie moléculaire et de génie génétique pour la production de plusieurs centaines de produits. Elle joue un rôle important dans les secteurs de la santé, de l'environnement, de l'agriculture, de l'agroalimentaire, ainsi que lors de la mise au point de processus industriels. La protéomique, la génomique, la transgénèse, la bio-informatique et les nanobiotechnologies sont des domaines qui font tous partie de cette nouvelle science. Selon *Le Petit Larousse illustré*, la biotechnologie inclut toutes techniques utilisant des êtres vivants (microorganismes, animaux, végétaux), généralement après modification de leurs caractéristiques génétiques, pour la fabrication industrielle de composés biologiques ou chimiques (médicaments, matières premières industrielles) ou pour l'amélioration de la production agricole (plantes et animaux transgéniques ou O.G.M. [organismes génétiquement modifiés]) ⁽²⁾.

Dans le domaine des détergents, la production des enzymes a été mise à profit par ces biotechnologies. C'est un chimiste allemand, du nom de Otto Röhm, qui en 1907, a isolé la première enzyme pour son utilisation dans l'industrie des détergents ⁽³⁾. L'enzyme produite était une protéase qui permettait la dégradation des souillures d'origine biologique résistantes aux détergents de l'époque. En biologie, les enzymes favorisent la dégradation des macromolécules pour leur métabolisme éventuel par les cellules ou l'organisme. Röhm a utilisé cette capacité de dégradation non spécifique qu'ont les protéases pour augmenter le pouvoir nettoyant des détergents. Au départ, ce sont les protéases qui ont été employées dans les détergents, mais par la suite, on y a aussi ajouté de l'amylase, des cellulases et des lipases afin d'améliorer sensiblement leur efficacité.

1.2 Les enzymes

Les enzymes sont des macromolécules d'origine protéique qui agissent à titre de catalyseurs biologiques. Elles sont utilisées par les cellules dans le but d'accélérer les réactions métaboliques essentielles à leur fonctionnement. Résultantes d'une production intracellulaire, plusieurs enzymes sont excrétées hors de la cellule afin de transformer des macromolécules en sous-produits utilisables par l'organisme ou la cellule. Comme toutes les protéines, les enzymes sont formées à partir de l'information codée dans l'ADN et l'ARN. Elles sont composées d'acides aminés placés les uns après les autres pour former une chaîne de dimension variable. La chaîne d'acides aminés produite se replie des millions de fois sur elle-même pour former une structure en trois dimensions, conférant ainsi le caractère unique et spécifique de chaque enzyme. Dans sa structure tridimensionnelle, seule une petite section de l'enzyme est accessible et permet de

convertir le substrat. Cet emplacement se nomme le site actif de l'enzyme. Chaque enzyme est spécifique à un substrat. Le site actif et le substrat sont comme deux pièces d'un casse-tête; seuls les substrats ayant la bonne configuration pourront atteindre le site actif d'une enzyme et être transformés.

En plus d'être essentielles à la survie de tous les organismes, les enzymes jouent maintenant un rôle important dans notre vie de tous les jours grâce aux biotechnologies. On les utilise dans la fabrication du fromage (présure, une protéase), dans la production d'aliments pour les animaux, dans la foresterie (xylase), dans les détergents (protéase, amylase, lipase), dans la farine (amylase) et dans le traitement des déchets^(3,4). Il existe des milliers d'enzymes. Environ 200 sont utilisées commercialement et uniquement une vingtaine sont produites à l'échelle industrielle⁽⁵⁾. Les enzymes hydrolytiques représentent 75 % de la production mondiale. Les carboxylases, les protéases et les lipases occupent plus de 70 % de cette production⁽⁵⁾.

1.3 La subtilisine et son utilisation

Produite par plusieurs organismes, principalement par des bactéries du genre *Bacillus*, la subtilisine est une sérine-peptidase appartenant à la famille des protéases. Elle hydrolyse les macromolécules dans le but de produire des peptides de plus petites dimensions afin qu'ils soient accessibles et utilisables par les cellules. La subtilisine est une exoprotéine sécrétée dans le milieu par les bactéries. Elle a un poids moléculaire d'environ 27 000 daltons et est formée d'une chaîne de 274 acides aminés⁽⁶⁾. Sa structure tertiaire est constituée de feuillets bêta et de plusieurs hélices alpha. Le site actif de la subtilisine est formé d'une triade catalytique incluant trois acides aminés, soit l'acide aspartique, l'histidine et la sérine. Bien que distants dans la structure primaire, ces trois acides aminés se regroupent dans la structure tertiaire pour créer le site actif (Figure 1).

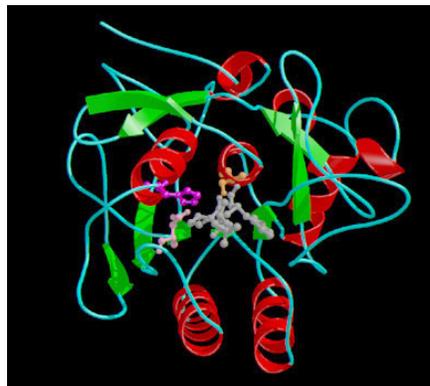


Figure 1 : Structure tertiaire de la subtilisine Carlsberg. Le site actif est représenté par la triade catalytique : acide aspartique (rose), histidine (mauve) et sérine (orange)⁽⁷⁾.

La nomenclature des enzymes est réglementée par l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire. Chaque enzyme possède un numéro distinctif formé de quatre chiffres dont la combinaison est unique. Ils définissent l'activité enzymatique. D'après ce code, la subtilisine porte le numéro EC 3.4.21.-62. Elle constitue une enzyme qui scinde les liaisons peptiques

(peptidase-4), peu importe leurs emplacements au sein de la chaîne d'acides aminés (endopeptidases -21), et utilise la sérine à titre de donneur d'électrons et une molécule d'eau (hydrolase-3) pour exécuter la réaction catalytique. Les peptidases (protéases ou enzymes protéolytiques) sont un vaste groupe d'enzymes. La base de données MEROPS se consacre exclusivement aux peptidases et regroupe plus de 4 000 d'entre elles⁽⁷⁾. Pour chaque protéase, on observe de nombreux synonymes. Voici ceux attribués à la subtilisine : alcalose, alcalose 0.6 L, alcalose 2.5 L, ALK-enzyme, bacillopeptidase A, bacillopeptidase B, *Bacillus subtilis* alcaline protéinase biopraxe; biopraxe AL 15, biopraxe APL 30, colistinase, subtilisine J, subtilisine S41, subtilisine Sendai, subtilisine GX, subtilisine E, subtilisine BL, genenase I, esperase, maxatase, alcalose, thermoase PC 10, protéase XXVII, thermoase, superase, subtilisine DY, subtilopectidase, SP 266, savinase 8.0 L, savinase 4.0 T, kazusase, protéase VIII, opticlean, *Bacillus subtilis* alkaline proteinase, protin A 3 L, savinase, savinase 16.0 L, savinase 32.0 L, orientase 10 B, protéase S. Étonnamment, la liste des synonymes et noms commerciaux retrouvée dans le document Human and Environmental Risk Assessment (HERA) diffère à plusieurs égards de la base de données MEROPS : Subtilisin Carlsberg, Subtilisin A, Subtilopectidase A, Subtilisin BPN, Subtilisin B, Subtilopectidase B, Subtilopectidase C, Subtilisin E, Subtilisin 309, Subtilisin 147, Nagarse, Alcalase^{mc}, Savinase^{mc}, Maxatase^{mc}, Esperase^{mc}, Milezyme^{mc}, Opticlean^{mc}, Optimase^{mc}, BLAP, Durazyme^{mc}, Purafect^{mc}, Purafect OxP^{mc}, Kannase^{mc}, BLAP S, KAP^{mc}, Properase^{mc(8)}. Cela démontre que l'appellation subtilisine est très variée et qu'il peut être difficile d'établir sa présence dans un produit à partir des fiches signalétiques. Le numéro CAS de la subtilisine est le 9014-01-1, mais il est possible qu'on lui accole les numéros 1395-21-7, 9073-77-2, 9001-92-7, 79986-26-8, 95979-76-3, 68909-17-1⁽⁸⁾.

En 2006, l'industrie des détergents utilisait plus de 80 millions de kg de subtilisine. La valeur de la production globale des enzymes était de 1,7 milliard d'euros en 2005 et atteignait 2,7 milliards d'euros en 2010⁽³⁾. Dans les milieux de travail, on retrouve la subtilisine sous forme de poudre ou de préparation liquide. Elle est utilisée comme dégraisseur dans les lessives, dans l'industrie de la tannerie, pour les conserves de l'industrie alimentaire, pour la désinfection des lentilles de contact, dans les fontaines biologiques reliées au dégraissage des métaux et enfin comme agent de stérilisation dans les hôpitaux.

1.4 Les effets sur la santé

Bacillus subtilis, une des bactéries produisant de la subtilisine, fait partie du groupe de risque 1. Il s'agit d'un agent biologique non susceptible de provoquer des infections chez les individus ou les animaux en bonne santé^(9,10). Cette classification ne considère que les risques infectieux reliés à la bactérie et ne tient aucunement compte des autres effets possibles sur la santé. Cela explique que son utilisation se soit ainsi répandue dans les produits de nettoyage « verts » ou biologiques. Les effets sur la santé attribuables aux effets non infectieux que représentent les enzymes présentes dans ces savons ne sont pas considérés dans l'évaluation du risque.

Pourtant, des réactions allergiques pulmonaires reliées à une exposition aux enzymes protéolytiques présentes dans les produits nettoyants ont été rapportées pour la première fois en 1969^(11,12). Il est maintenant largement reconnu que l'exposition aux enzymes dans le milieu de travail cause des sensibilisations chez les travailleurs et peut induire de l'asthme^(8,13-17). Le potentiel allergique de la subtilisine serait identique à celui d'autres enzymes telles les amylases,

les cellulases et les lipases. Cette protéase, comme toutes les autres, peut également causer des problèmes de dermatite⁽¹⁴⁾.

Selon la Confédération européenne des syndicats⁽¹⁸⁾, la subtilisine fait partie des 334 substances chimiques extrêmement préoccupantes^(18,19). Elle a des propriétés irritantes et sensibilisantes pouvant entraîner des symptômes respiratoires et de l'asthme^(11,20-23). Des études d'exposition simple chez les animaux indiquent qu'elle est toxique par inhalation^(8,24). Elle cause des effets directs sur les poumons tels que des hémorragies, de la congestion et de l'œdème, probablement reliées à son activité protéolytique⁽²⁴⁾. L'œdème pulmonaire a été observé chez l'animal⁽²⁴⁾. Selon Rosenberg⁽²⁵⁾, le délai de sensibilisation est d'autant plus court que l'exposition est forte.

Depuis 1977, les enzymes dans les détergents solides sont encapsulées dans le but de minimiser l'effet sur la santé des utilisateurs. Selon Sarlo, il n'y aurait plus de sensibilisation chez les utilisateurs de produits en poudre⁽²⁶⁾. Il est important de noter que d'autres études sont beaucoup moins catégoriques à ce sujet^(25,27-30). Quelques études de cas rapportent une relation entre l'exposition à différentes enzymes utilisées dans les nettoyeurs et des symptômes d'allergie ou d'asthme chez les travailleurs exposés soit durant la production ou lors de l'utilisation en milieu hospitalier⁽³¹⁻³³⁾. D^{re} Lemièrre, chercheuse en pneumologie à l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, a rapporté un cas d'asthme professionnel chez un travailleur du Québec utilisant un nettoyeur liquide à base de subtilisine lors des premières étapes de nettoyage des endoscopes (bronchoscopes, endoscopes digestifs, etc.)⁽³⁴⁾. Une recherche, menée par Van Rooy, confirme que les travailleurs utilisant la forme liquide des détergents sont à risque de développer une sensibilisation et des allergies respiratoires⁽³⁵⁾.

1.5 Les normes d'exposition

Pour la subtilisine sous sa forme pure cristalline, le Règlement sur la santé et la sécurité du travail (RSST) utilise une valeur plafond de 60 ng/m³ à ne jamais dépasser alors que le Health and Safety Executive (HSE) du Royaume-Uni utilise, depuis 2002, une WEL (*workplace exposure limit*) de 40 ng/m³ d'air^(22,36,37). L'étiquette « verte » de la subtilisine favorise son utilisation et la variété croissante de ses usages industriels renforce les inquiétudes à son endroit. Le RSST impose des valeurs limites d'exposition très basses et prohibe la recirculation d'air⁽³⁷⁾. Selon l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), cette valeur limite devrait réduire le nombre de cas potentiels de sensibilisation et d'irritations respiratoire et cutanée chez les travailleurs⁽³⁸⁾.

1.6 L'expologie

Les concentrations ambiantes de subtilisine dans les environnements de travail sont peu documentées étant donné qu'aucune méthode spécifique, standardisée et reconnue n'a été publiée pour faire l'analyse des concentrations présentes dans l'air des milieux de travail. L'Occupational Safety and Health Administration (OSHA) des États-Unis recommande toujours sur son site web (novembre 2015) de faire l'analyse à partir d'un échantillon en vrac du produit⁽³⁹⁾. La mise au point d'une méthode d'analyse sensible et robuste est néanmoins indispensable pour déterminer et documenter les niveaux d'exposition des travailleurs du Québec. De même, le HSE déplore non seulement le peu de données existantes sur les

expositions professionnelles à la subtilisine sous forme d'aérosol liquide, mais aussi la non-disponibilité d'une méthode spécifique et standardisée⁽²²⁾.

Seulement quelques études d'expologie ont été publiées à ce jour en ce qui a trait à la subtilisine^(14,35). Le HSE a publié un rapport sur une évaluation pilote de cette exposition pour des travailleurs affectés au nettoyage des bronchoscopes⁽¹⁴⁾. Dans son étude, le dosage de l'activité protéolytique a été réalisé par une méthode enzymatique non spécifique; les résultats du dosage des protéases sont rapportés en équivalent à la subtilisine.

1.6.1 Méthodes analytiques

Différentes méthodes analytiques peuvent permettre le dosage des protéases et de la subtilisine. En revanche, la littérature scientifique traitant de la problématique d'exposition aux enzymes de type subtilisine en milieu de travail ne rapporte aucune méthode standard. Des organismes phares comme le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) et l'OSHA n'ont toujours pas publié de méthode standardisée à cet effet. Certaines publications reconnaissent clairement cette lacune comme étant responsable de l'incapacité d'évaluer l'exposition des travailleurs. Toutefois, des méthodes utilisant un dosage enzymatique ou immunologique sont rapportées dans certaines études relatives à cette problématique de santé au travail, mais jamais de façon détaillée.

1.6.1.1 Dosage enzymatique des protéases

Les enzymes sont des activateurs de réactions chimiques. Plusieurs méthodes utilisent cette propriété pour effectuer des dosages de produits en exploitant la réaction enzymatique. On a recours à cette approche dans toutes sortes de domaines et d'applications pour permettre la quantification de plusieurs composés. En santé au travail, le dosage des endotoxines en est un exemple concret.

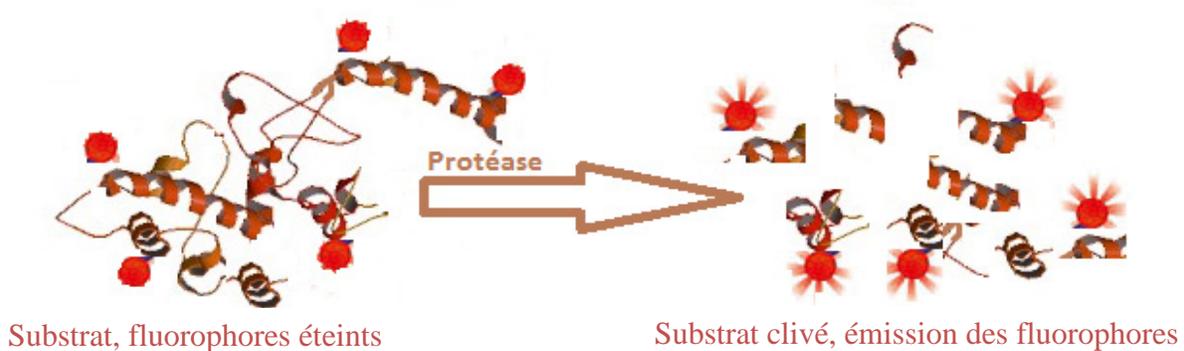


Figure 2 : Principe de la méthode enzymatique pour le dosage des protéases.

Certaines compagnies produisent des trousse commerciales de dosage des protéases. Bien qu'il ne soit pas actuellement possible d'effectuer un dosage spécifique à la subtilisine à l'aide de ces trousse, cette démarche a l'avantage d'être suffisamment documentée, simple d'exécution et facile à mettre au point dans un laboratoire. Son inconvénient principal demeure cependant son

manque de spécificité. Toutes enzymes présentes capables de dégrader le substrat pourront participer à la réaction de dégradation et ainsi être dosées (Figure 2). Le nombre de molécules de substrat dégradé dépend du nombre de molécules d'enzyme dans la solution, ce qui en permet le dosage.

1.6.1.2 Analyse immunologique ELISA de la subtilisine

La subtilisine est aussi une protéine qui induit la production d'anticorps chez l'hôte exposé. Ces anticorps peuvent être utilisés pour faire le dosage selon une approche immunologique. La méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou en français dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) est un test immunologique destiné à détecter et à doser une protéine. Elle peut donc être utilisée pour la subtilisine.



Figure 3 : Principe de la méthode immunologique ELISA pour le dosage de la subtilisine.

Dans sa forme la plus simple, c'est-à-dire dans la technique du sandwich, les puits d'une microplaque sont tapissés avec un anticorps de capture qui peut attacher l'antigène que l'on veut doser. L'anticorps de capture assure la spécificité du test. Si l'antigène recherché est présent dans l'échantillon, il se lie spécifiquement à l'anticorps de capture. Par la suite, un deuxième anticorps est ajouté, soit l'anticorps traceur, qui est en mesure lui aussi de se lier à l'antigène recherché. L'anticorps traceur est ainsi couplé à un produit colorant qui rend possible la quantification par colorimétrie puisque le nombre de molécules d'anticorps traceurs fixées dépend du nombre de molécules d'antigènes immobilisées (Figure 3).

1.6.1.3 Analyses qualitative et quantitative des protéines par spectrométrie de masse

Le terme protéomique est utilisé depuis peu de temps. Il a été employé par Peter James pour la première fois en 1997⁽⁴⁰⁾. La protéomique est un domaine de la science qui étudie les protéomes dans une approche pluridisciplinaire. Le protéome définit l'ensemble des protéines présentes dans une unité du vivant à un moment donné et sous des conditions données. La protéomique étudie les protéines dans un contexte bien souvent dynamique, évolutif, en changement continu. Les techniques de la protéomique permettent de purifier, de caractériser et de quantifier les protéines à l'aide de méthodes spécialisées de chromatographie, de spectrométrie de masse et de bio-informatique. La protéomique a connu un essor important au cours des dernières années.

La chromatographie sur gels de polyacrylamide dénaturants permet la séparation et la purification des protéines. La dénaturation de la protéine défait sa structure tridimensionnelle et la linéarise. Sous cette forme, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire. Les

bandes protéiques séparées sont retirées, traitées puis analysées par spectrométrie de masse. Les premières étapes de préparation des protéines pour l'analyse par spectrométrie de masse sont l'alkylation et la réduction. La digestion à l'aide de la trypsine permet de produire les peptides tryptiques, point névralgique de cette analyse. La trypsine brise les protéines spécifiquement pour produire plusieurs peptides. La caractérisation des protéines se fait par la reconnaissance d'un ou de plusieurs des peptides tryptiques qui lui sont associés. Le schéma de la Figure 4 représente les étapes de caractérisation protéique par spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

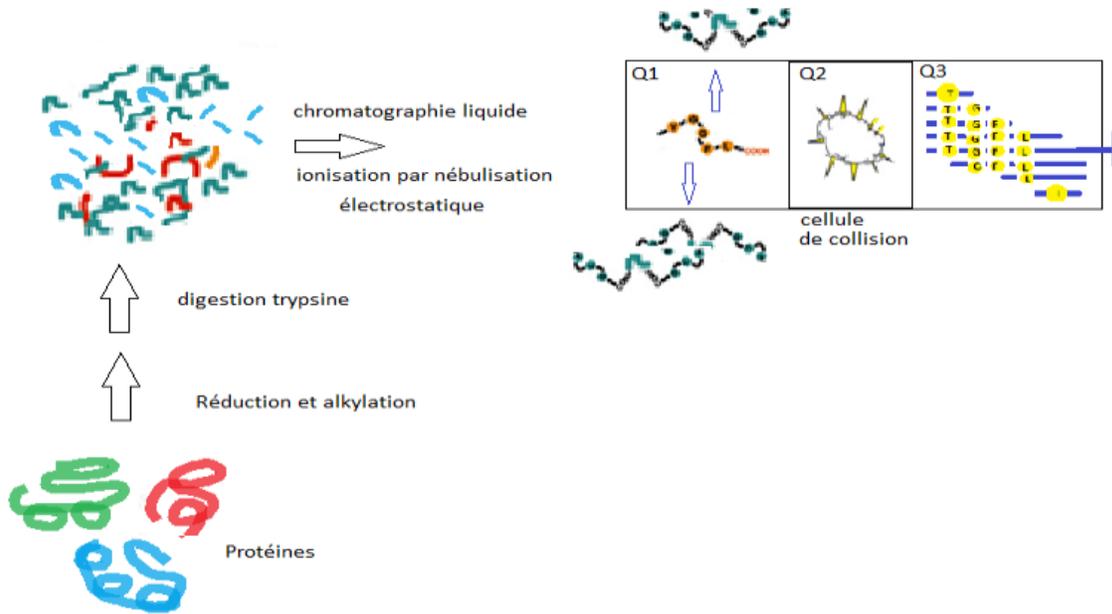


Figure 4 : Schématisation des étapes nécessaires pour l'identification d'une protéine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

Les spectromètres de masse séparent les molécules ionisées selon leur rapport masse/charge (m/z). Pour reconnaître un peptide tryptique, l'ion précurseur correspondant à ce peptide est sélectionné dans le premier quadripôle de l'instrument (Q1), ion correspondant à un certain rapport de m/z . Cet ion est ensuite fragmenté dans le second quadripôle (Q2) par collision avec un gaz. Enfin, les fragments générés sont analysés par le troisième quadripôle (Q3). Le spectre MS/MS produit représente la séquence d'acides aminés du peptide. La bio-informatique permet par la suite d'interroger des bases de données peptides/protéines à l'aide de logiciels spécialisés. La séquence de la protéine est reproduite en effectuant la comparaison de la fragmentation des séquences de peptides contenus dans la base de données avec celle produite expérimentalement.

1.7 Objectif de l'étude

Cette étude avait comme objectif principal de développer et de mettre au point une méthode analytique spécifique permettant la quantification de la subtilisine présente dans l'air ambiant d'un milieu de travail.

Les objectifs spécifiques étaient de :

- évaluer et valider la méthode enzymatique de dosage des protéases de type subtilisine (précision, exactitude, limite de détection, robustesse, coût, etc.) afin qu'elle puisse être implantée dans les laboratoires de l'IRSST;
- sélectionner et valider un système de prélèvements à utiliser en milieu de travail;
- mesurer les concentrations de subtilisine dans l'air ambiant dans cinq centres hospitaliers et, advenant le cas de concentrations élevées, fournir un soutien et formuler des recommandations.

Par ailleurs, un objectif secondaire visait à :

- explorer la possibilité de caractériser, par protéomique, les protéines, particulièrement la subtilisine, présentes dans les savons utilisés dans les hôpitaux.

1.7.1 Hypothèse de travail

La méthode par dosage enzymatique des protéases devrait être suffisamment précise, robuste et à coût raisonnable pour être implantée dans les laboratoires de l'IRSST.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Dosage enzymatique (protéase)

2.1.1 Validation de la méthode analytique

Les dosages enzymatiques ont été réalisés à l'aide de la trousse EnzChek^{MD} Protease Assay Kits de la compagnie Molecular Probes (Invitrogen detection technologies, Eugene, OR, É.U.) en respectant le protocole du manufacturier. Cette trousse permet le dosage des sérines-protéases en utilisant de la caséine marquée à l'aide d'un fluorophore, soit la fluoescéine dans cette étude. L'intensité du signal émis par la fluoescéine à 513 nm est mesurée à l'aide d'un filtre vert ayant un maximum de transmittance à une longueur d'onde de 510 nm⁽⁴¹⁾. L'intensité de la fluorescence émise par la dégradation de la caséine est proportionnelle à la concentration de protéases présentes dans l'essai. L'analyse par spectro-fluorométrie a été exécutée avec des plaques 96 puits Thermo Scientific^{mc} Immuno Plate Black (Thermo Fisher Scientific, Inc., Ontario, Canada) à l'aide du lecteur de plaque Synergie H1 multimode-reader^{mc} (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, É.U.). La lecture en fin de réaction a été utilisée pour tous les essais, car l'illumination répétée nécessaire aux essais cinétiques crée une réduction substantielle de la fluorescence produite. De plus, les dosages ont été réalisés dans un environnement sombre pour réduire l'excitation non spécifique des fluorophores par la lumière du laboratoire. L'utilisation du TRF (Time Resolve Fluorescence) a été évaluée pour la détermination des paramètres optimaux de lecture. Le TRF permet d'établir un délai entre l'émission produite et la lecture de celle-ci. Il présente l'avantage de réduire les risques d'interférence au moment de la lecture. Plusieurs essais ont été effectués afin d'optimiser les paramètres d'excitation-émission-lecture. Le gain de l'appareil ainsi que la variation de lecture à l'intérieur d'une même plaque ont été évalués à l'aide d'une suspension standard de subtilisine à 10 ng/ml.

L'utilisation de l'approche avec la lecture en fin de réaction (end point) nécessite une optimisation de la période d'incubation afin que la lecture soit réalisée lors du maximum d'émission sans perte de temps et de façon reproductible. Les temps d'incubation évalués ont varié entre 1 et 18 heures.

La linéarité de la réaction a été évaluée par une dilution sériée du standard de subtilisine. On a eu recours à la protéase de *Bacillus licheniformis* enzyme commission no : EC 3.4.21.62 (Sigma-Aldrich Canada Co., Ontario, Canada). Les dilutions de la subtilisine ont été préparées directement dans la plaque noire de 96 puits à l'aide d'un tampon phosphate (PBS 10X) dilué à une concentration finale 1X (Ambion, Life technologies, Ontario, Canada). Les concentrations finales testées ont varié entre 50 et 0,0015 ng/ml. Tous les essais ont été réalisés en incluant une courbe standard à la plaque. La courbe avait une étendue de 50 à 0,0015 ng/ml pour la validation initiale et une de 10 à 0,3125 ng/ml pour les essais sur le terrain. Le PBS sert de contrôle négatif alors que le standard de subtilisine à une concentration de 2 ng/ml sert de contrôle positif de la plaque. Des ajouts dosés ont été utilisés afin de déterminer la présence d'inhibiteur de la réaction enzymatique. Une récupération entre 50 et 150 % de l'ajout dosé était jugée acceptable. La répétabilité est calculée à partir du coefficient de variation obtenu de six lectures réalisées sur quatre suspensions de concentrations différentes, soit 40, 20, 10 et 5 ng/ml. La limite de détection (LD) correspond à trois fois l'écart-type calculé à partir des résultats de dix solutions

préparées séparément, à des concentrations variant de 1 à 0,1 ng/ml. La limite de quantification (LQ) correspond à dix fois cet écart-type. L'exactitude a été obtenue par l'analyse de 10 solutions de subtilisine (15 ng/ml) préparées individuellement.

2.1.2 Analyse des savons

Les savons analysés ont été fournis par cinq hôpitaux de la région de Montréal qui en faisaient usage. L'ensemble des savons a été analysé dans le but de déterminer la présence de protéases. Au total, 15 savons ont été testés. Ils ont été dilués entre 10 et 100 000 fois, selon les besoins analytiques. L'interférence lors de l'analyse a été évaluée pour l'ensemble des analyses par un ajout dosé. Les ajouts dosés ont été effectués à l'aide d'une solution de subtilisine à une concentration finale de 10 ng/ml. Seuls les hôpitaux utilisant les savons à base de protéases ont fait l'objet de campagnes d'échantillonnage d'air.

2.1.3 Échantillonnage de l'air

2.1.3.1 Échantillonneurs utilisés

Deux systèmes de captation ont été évalués et comparés, soit le Coriolis[®] μ (Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) et l'échantillonneur IOM⁽⁴²⁾ muni d'un filtre Whatman^{mc} de 25 mm en fibre de verre (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). Le débit de fonctionnement de l'appareil Coriolis[®] μ a été utilisé entre 100 et 300 l/min, selon les essais. Le volume de tampon PBS utilisé dans les cônes de prélèvement a été de 15 ml. Les prélèvements avec le porte-filtre IOM et le filtre en fibre de verre ont été réalisés à un débit de prélèvement de 2 l/min.

2.1.3.2 Extraction des échantillons prélevés sur les filtres en fibre de verre

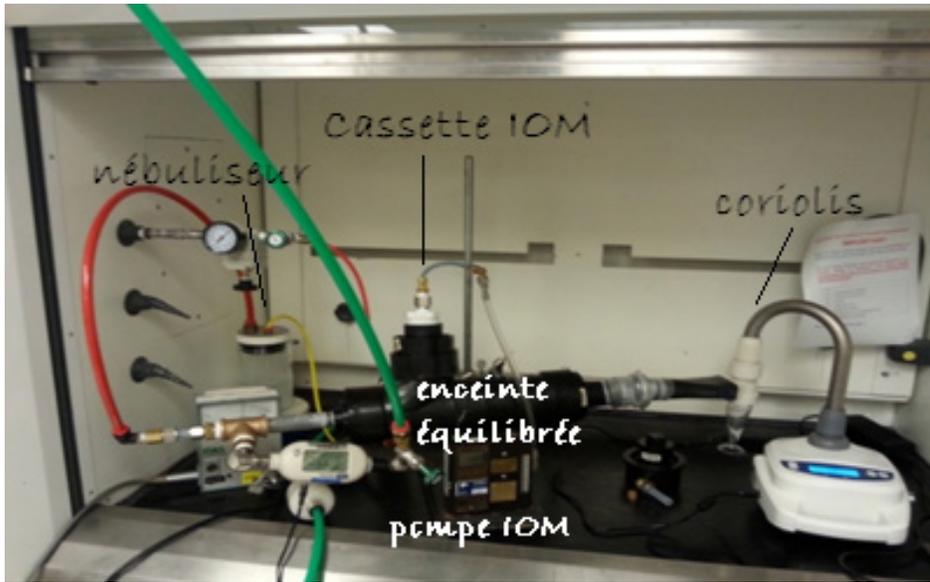
Les échantillons prélevés sur des filtres en fibre de verre ont été placés dans des microtubes stériles de 5 ml (Axygene scientific[®], CA, É.U.) contenant 3 ml de tampon PBS 1X. Par la suite, les microtubes ont été placés dans la multi vortexer DVW 2500 (VWR^{MD}, Ontario, Canada) pour une agitation orbitale durant 15 minutes, à une vitesse de 2500 rpm. Afin de retirer de l'extrait les fibres qui auraient pu se détacher des filtres, une centrifugation de 1 min à 4000 rpm ou de 10 min à 2500 rpm a suivi l'agitation. Cette solution a été utilisée pour l'analyse par l'EnzChek^{MD} Protease Assay.

2.1.3.3 Essais en enceinte

Une enceinte d'exposition a été assemblée afin de générer, à l'intérieur d'un environnement contrôlé, des aérosols de subtilisine ou de savons (Figure 5). Un nébuliseur TSI^{MD} 9302, single jet atomiser (TSI, Shoreview, MN, É.U.) avec agitateur magnétique a servi à produire les aérosols. De l'air a été utilisé pour diluer les aérosols produits par le générateur et pour alimenter l'enceinte d'exposition avec une quantité d'air suffisante au fonctionnement simultané des deux capteurs. Aux fins de sécurité, une faible pression négative a été maintenue dans l'enceinte de façon permanente et celle-ci a été confinée dans une hotte. La pression à l'intérieur de l'enceinte

était indiquée en continu par un manomètre Magnehelic^{MD} (Dwyer^{MD} Instruments International, Michigan City, IN, É.U.). Deux ports de captation distincts étaient disponibles sur l'enceinte pour les échantillons de subtilisine.

a)



b)

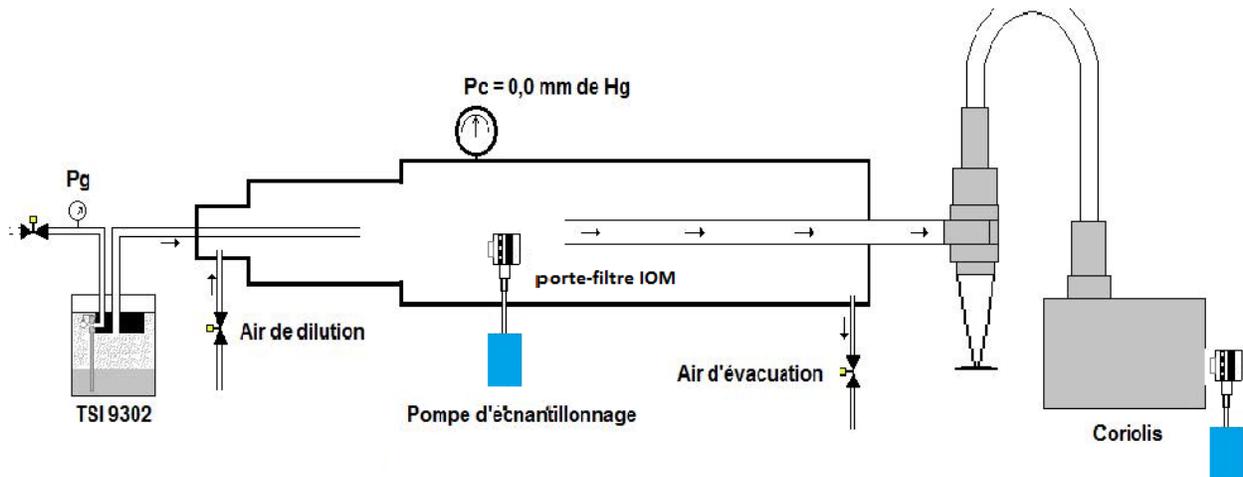


Figure 5 : Photo (a) et schéma (b) de l'enceinte d'exposition utilisée lors des essais de comparaison des systèmes de captation.

À l'aide de cette enceinte, la performance de captation de la subtilisine des deux systèmes a été comparée. La granulométrie des aérosols générés n'a pas été effectuée puisque le but était de comparer les deux systèmes d'échantillonnage pour la subtilisine, et non pas l'efficacité selon la

dimension des particules. Les deux orifices de captation ont été centrés dans l'enceinte afin que les prélèvements puissent être comparés. Un adaptateur fourni par le fabricant pour effectuer des prélèvements distants a été utilisé pour relier le Coriolis® μ à la chambre. La durée de prélèvement a varié entre 10 et 30 minutes selon les essais. La capacité de captation de la subtilisine par les deux systèmes a été évaluée dans l'enceinte d'exposition, et ce, en nébulisant deux savons différents selon les essais, soit les savons EM et PO, tous deux contenant de la subtilisine. Pour effectuer l'évaluation de la capacité de captation des particules par le Coriolis® μ , une cassette de trois pièces SureSeal^{mc} (SKC Inc., Eighty Four, PA, É.U.) munie d'un filtre Whatman^{mc} de 37 mm en fibre de verre (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) a été installée de façon étanche à la sortie d'air de l'appareil. Si de la subtilisine est recueillie sur le filtre, cela signifie que celle-ci n'aura pas été retenue dans le cône de collecte. Pour la cassette IOM, un deuxième filtre a été placé après le premier filtre dans le porte-filtre.

2.2 Échantillonnage en milieu de travail

Pour faire suite au dosage des enzymes de type subtilisine dans les savons fournis par les hôpitaux, des campagnes de prélèvements d'air ont été effectuées dans les hôpitaux participants. Le Coriolis® μ a été utilisé lors de trois campagnes alors que la méthode de prélèvement avec porte-filtre IOM et le filtre en fibre de verre a été effectuée dans les cinq hôpitaux. Lors de l'échantillonnage en milieu de travail, le débit du Coriolis® μ a été ajusté à 100 l/min alors que le débit utilisé pour les échantillonneurs IOM a varié de 2 à 10 l/min et le temps de prélèvement entre 10 et 60 minutes selon les échantillons. Les pompes Leland Legacy^{MD} (SKC Inc., Eighty Four, PA, É.U.) ont été choisies pour faire les prélèvements sur filtres en fibre de verre avec le porte-filtre IOM. Les échantillonneurs ont toujours été positionnés le plus près possible des sources d'aérosols d'enzyme sans nuire au travail des employés. Tous les prélèvements ont été effectués en poste fixe. Les Photo 2 et Photo 3, présentées à l'Annexe B, montrent certains de ces postes d'échantillonnage. Le nombre de prélèvements par poste a varié de 1 à 3 selon le milieu évalué. Aucun échantillonnage personnel n'a été réalisé dans cette étude.

2.3 Méthode d'analyse protéomique (identification subtilisine)

L'analyse exploratoire par protéomique des savons voulait faire une première appréciation d'une utilisation potentielle de cette approche en santé et en sécurité du travail (SST). Des difficultés logistiques ont empêché de travailler à l'interne sur la méthode par GC-MS. Une collaboration a donc été amorcée avec l'Institut Armand-Frappier en cours de projet afin de faire une évaluation préliminaire des analyses par protéomique pour les savons.

Parmi les 15 savons fournis par les hôpitaux participants, cinq ont été analysés par spectrométrie de masse (protéomique). Les savons testés ont tous préalablement produit un dosage positif lors des essais avec la méthode enzymatique. Les cinq savons sont EC, EM, PO, PR et SO (voir Tableau 1).

2.3.1 Concentration des protéines

L'équipe de recherche a eu recours à deux techniques pour effectuer la concentration des protéines lors de cette activité. La première technique met à profit la méthode de purification par dialyse. Pour ce faire, une cassette Slide-A-Lyser™ de 3,5 kDa (Thermo Scientific, IL, É.U.) a été chargée de 4 ml de savon par injection. Elle a ensuite été déposée dans un bécher rempli de 4 litres d'eau et le tout agité pendant une nuit. Cette étape a permis de diluer le savon dans l'eau à travers la membrane du filtre de dialyse et d'enlever les éléments interférents pouvant nuire aux analyses. La solution de savon a alors été prélevée à l'aide d'une seringue et centrifugée afin de concentrer les protéines sans les éléments interférents.

La seconde technique consiste en une filtration/centrifugation dans un tube spécifique disponible commercialement. Pour cette approche, un filtre à centrifuger Amicon Ultra -15 3 kDa de 50 ml (Millipore, Ontario, Canada) a été utilisé pour l'obtention du concentré de savon. Le protocole en deux étapes permet de concentrer 10 fois le savon. La première étape consiste à l'incorporation de 10 ml de savon sur un filtre à centrifuger Amicon. La centrifugation est alors effectuée à 4 000 G dans une centrifugeuse Sorvall ST 40R (Thermo Scientific, IL, É.U.) jusqu'à l'obtention d'un volume final de savon concentré de 1 ml. Lors de la seconde étape, 5 ml d'eau milli-Q sont ajoutés au savon préconcentré et une deuxième centrifugation est effectuée jusqu'à l'obtention du volume de 1 ml du concentré. Le concentré du savon est ensuite transféré dans un micro-tube de 1,5 ml avec l'embout de la pipette.

Les concentrés d'échantillon produits par les deux techniques ont été conservés à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse.

2.3.2 Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide

Les concentrés de savons ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Pour effectuer l'électrophorèse, 50 µl du concentré de savon, 15 µl d'eau milli-Q, 10 µl de dithiothreitol (DTT, 1M) et 25 µl de tampon de chargement ont été combinés dans un tube de 1,5 ml. Les solutions avec le concentré de savon ont ensuite été chauffées à 70 °C durant 10 minutes, puis 20 µl de chaque solution de concentré ont été chargés dans un puits du gel en prenant soin de laisser un espace vide entre chaque échantillon. En plus des échantillons de savon, une solution contenant de la subtilisine Carlsberg (protéase de *Bacillus licheniformis* de type VIII [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, É.U.]) a également été traitée à titre de contrôle positif. Les échantillons ont migré sur le gel à 150 V pendant 45 minutes dans un tampon TRIS-SDS 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, É.U.). Après migration, le gel a été transféré dans une solution de bleu de Comassie et agité durant une heure. Enfin, le gel a été transféré dans une solution de décoloration pour un trempage de plusieurs heures.

2.3.3 Préparation des bandes et extraction des protéines

Toutes les bandes obtenues sur gel ont été individuellement coupées et transférées à l'intérieur de tubes de 1,5 ml préalablement identifiés selon le produit et la masse correspondante. Une bande de gel ne contenant pas de protéine également a été retenue comme contrôle négatif. Dans une

première étape, les bandes ont été nettoyées à l'aide de NH_4HCO_3 à 100 mM et d'acétonitrile 100 % puis asséchées dans un évaporateur rotatif. Par la suite, les bandes de gel ont été traitées au dithiothréitol (DTT) et à la d'iodo-acétamine pour faire la réduction et l'alkylation des protéines présentes dans chaque bande. Les différentes bandes ont à nouveau été asséchées avant d'être incubées avec de la trypsine (20 μl d'une solution 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Trypsin, pH 8,5, 25 mM NH_4HCO_3) (Promega Corporation, Madison, WI, É.U.) pour la production des peptides tryptiques obtenus par digestion enzymatique directement dans le gel. Les protéines ont ensuite été éluées du gel à l'aide d'acétonitrile additionnée de 0,1% d'acide tri-fluoro-acétique.

2.3.4 Séquençage et identification des protéines

Les peptides tryptiques extraits ont été séparés par chromatographie liquide à haute performance. Toutes les analyses ont été réalisées par un système NanoLC série 1100 (débit 0,1-1 $\mu\text{l}/\text{min}$, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, É.-U.). La séparation a été réalisée en utilisant un gradient d'eau et d'acétonitrile (tous deux comprenant 0,1% d'acide formique) à l'aide de deux colonnes chromatographiques à phase inversée, ZORBAX 300 SB-C18 (5 x 0,3 mm, particules de 5 μm) et ZORBAX 300 SB-C18 (150 mm x 753 μm , particules de 3,5 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, É.-U.). Tous les spectres de masse ont été enregistrés à partir d'un spectromètre muni d'une source d'ionisation de type électro-nébulisation, et d'un analyseur de type triple quadripôle comprenant une trappe d'ions linéaire (Q-Trap, AB Applied Biosystems/MDS SCIEX Instruments, Californie, É.U.). L'accumulation des données MS-MS a été effectuée par le logiciel Analyst, version 1.4 (AB Applied Biosystems/MDS SCIEX Instruments, Californie, É.U.). L'identification des protéines a été accomplie à l'aide du moteur de recherche/base de données MASCOT (Matrix Sciences, Boston, MA, É.U.).

3. RÉSULTATS

3.1 Méthode de dosage enzymatique

L'appareil Synergy H1^{mc} (Biotek, VT, É.U.) offre différents paramètres de réglage du gain. Lors des essais en laboratoire, il a été observé qu'une variation du gain produisait un changement de la sensibilité au moment de la lecture. Cette modification, qui affecte les unités relatives de fluorescence (RFU), peut avoir une incidence sur les résultats et l'analyse. Un gain automatique peut alors être programmé. Dans ce cas, l'appareil ajuste automatiquement le gain pour chaque analyse à partir de la fluorescence d'un puits présélectionné. Le gain varie donc à chaque fois. Il peut aussi être fixé à une valeur prédéterminée qui restera la même pour l'ensemble des expériences.

3.1.1 Validation de la méthode analytique

3.1.1.1 Optimisation de la mesure de fluorescence et variation de lecture

Les différents essais ont démontré une variation importante des lectures en RFU lorsque le gain est choisi automatiquement par l'appareil. En mode automatique, le puits présélectionné doit toujours contenir la même concentration de subtilisine afin de limiter les différences entre les expériences. Puisque ces exigences ont été jugées trop contraignantes, un gain fixé à 55 a été jugé optimal pour la lecture des analyses de subtilisine à partir d'une courbe standard débutant à 10 ng/ml. Fixer le gain permet également de réduire les variations entre les dosages et de pouvoir procéder aux comparaisons des résultats entre les différentes plaques. Les essais sur le gain ont aussi démontré que s'il est fixé à 55, les mesures de fluorescence sont réalisables jusqu'à une concentration maximale de 40 ng/ml. Par contre, si la lecture de la subtilisine à des niveaux supérieurs à 40 ng/ml devenait nécessaire, le gain à appliquer devrait être réévalué.

La variabilité totale de la plaque a été évaluée à 3 % pour des suspensions de 5 et 10 ng/ml. Les coefficients de variation calculés entre les colonnes et les lignes ont fluctué entre 2 et 3 % pour la plaque de 5 ng/ml et entre 1 et 4 % pour la plaque de 10 ng/ml.

3.1.1.2 Période d'incubation précédant la lecture au fluorimètre

L'augmentation de la période d'incubation affectait peu la dégradation de la caséine par la subtilisine pour de faibles concentrations. En effet, selon la Figure 6 pour des niveaux inférieurs à 0,391 ng/ml, l'augmentation de la fluorescence n'est pas appréciable, même après une période de quatre heures. Une période prolongée d'incubation est une approche utilisée dans le développement analytique des méthodes enzymatiques et permet parfois d'améliorer la limite de détection. Ceci n'est pas démontré ici.

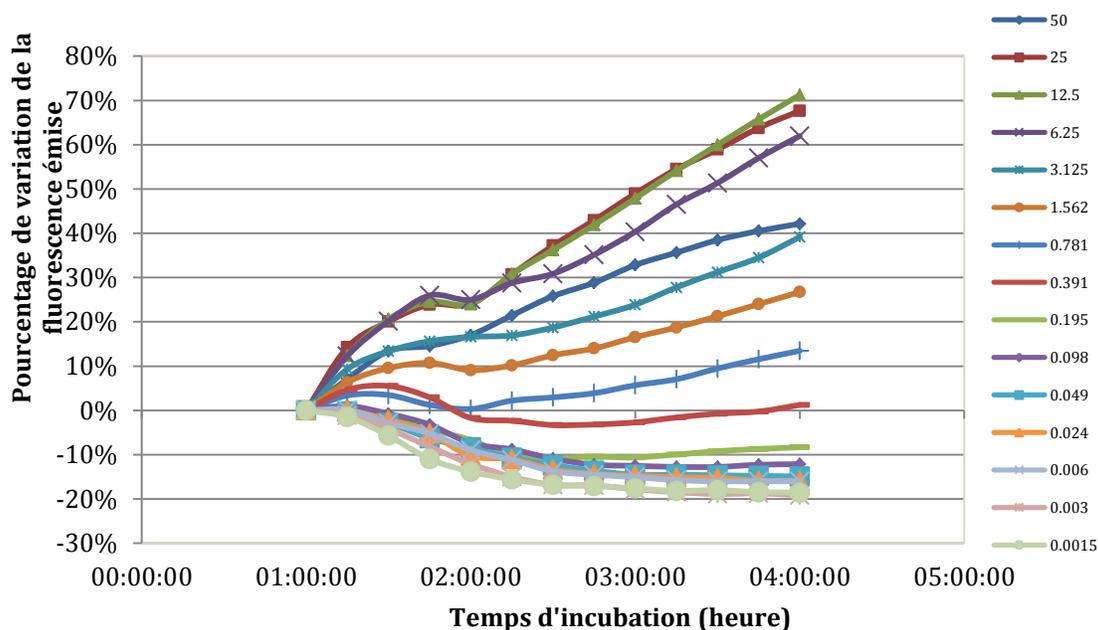


Figure 6 : Pourcentage de la variation de fluorescence en fonction de la période d'incubation du substrat et de la subtilisine calculé pour des concentrations d'enzymes variant entre 0,0015 et 50 ng/ml.

3.1.1.3 Linéarité de la courbe

Les dilutions sériées effectuées dans le but d'étudier la relation existant entre les concentrations de subtilisine et la fluorescence ont permis de démontrer l'apparition d'un plateau aux plus faibles niveaux de subtilisine. En raison de l'étendue importante des concentrations en subtilisine évaluées lors de cette expérience, et afin de bien figurer la relation, le graphique a été produit en format Log-Log (Figure 7).

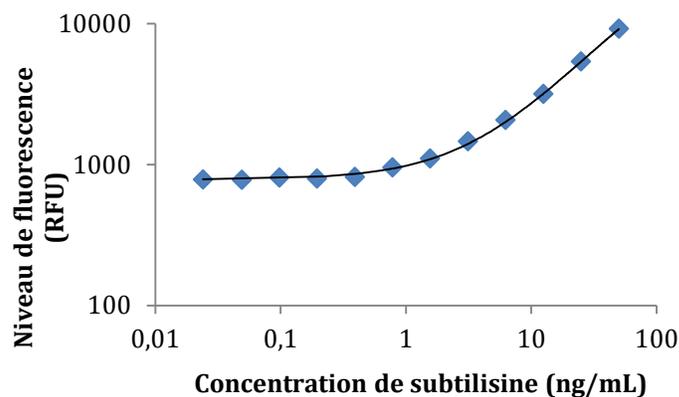


Figure 7 : Courbe représentant la fluorescence relative mesurée en fonction des concentrations de subtilisine.

La présence d'un plateau impose un point minimum à la courbe standard. La concentration la plus faible de la droite doit se retrouver à l'extérieur du plateau. Pour l'établir, un graphique des résultats obtenus à partir des niveaux les plus faibles a été tracé. Un pourcentage d'erreur de 5 % a été ajouté. La Figure 8 permet de déterminer que 0,78 ng/ml est près de la limite inférieure de la courbe. Il n'est pas possible dans les conditions actuelles d'effectuer des analyses à des doses inférieures puisqu'un plateau est observable au niveau de la fluorescence.

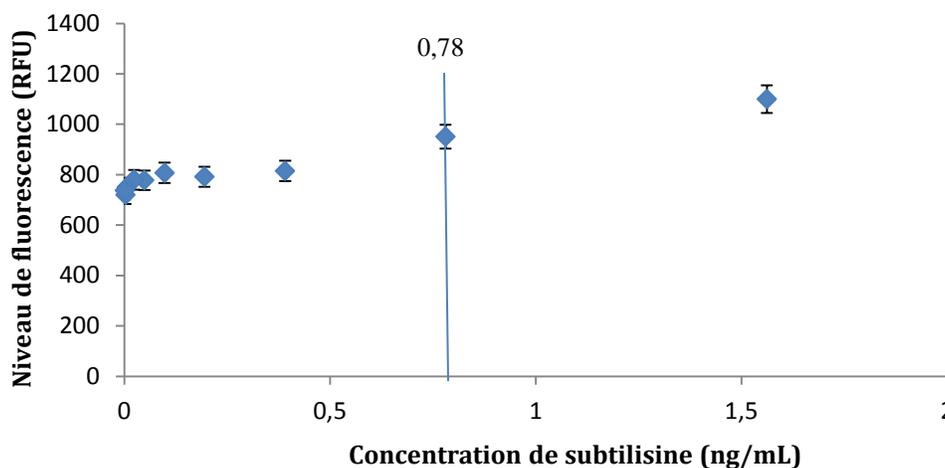


Figure 8 : Courbe représentant la fluorescence relative mesurée en fonction des concentrations de subtilisine (0,02 à 1,5 ng/ml).

3.1.1.4 Répétabilité, limite de détection et exactitude

La répétabilité déterminée à l'aide de quatre suspensions différentes de subtilisine (40, 20, 10 et 5 ng/ml) est de 4,3 %. La limite de détection (LD) a été calculée à partir de dix lectures d'une solution. Une solution à 0,05 ng/ml a été utilisée pour l'évaluation de la LD puisqu'elle se rapproche de la limite de 0,78 ng/ml obtenue par dilution à l'épuisement. La limite de détection est de 0,6 ng/ml. La limite de quantification (LQ) est de 1,2 ng/ml. L'exactitude, évaluée en effectuant dix lectures d'une suspension préparée à une concentration de 15 ng/ml, est de 90 %.

3.1.2 Analyse des savons

L'ensemble des hôpitaux ayant accepté de participer à cette étude ont fourni 17 détergents différents. Certains des nettoyants sont utilisés dans plusieurs sites. Le Tableau 1 présente les concentrations de protéases de type subtilisine obtenues pour tous les produits. Une dissimilitude en ce qui concerne la limite de détection rapportée est observable. En effet, pour certains savons, en raison d'interférences démontrées, des dilutions ont dû être effectuées. L'interférence est évaluée à l'aide d'ajouts dosés lors de chaque analyse. Afin que celle-ci soit acceptée, la récupération doit se situer entre 50 et 200 %.

La plupart des nettoyants, qui ne contiennent pas de subtilisine selon leur fabricant, n'ont pas produit de résultat positif aux protéases. Cependant, trois savons (PO, EP et SO) pour lesquels

aucune présence n'était révélée dans leur fiche signalétique ont produit des résultats positifs. Les doses d'enzyme de type subtilisine mesurées dans ces détergents ont varié entre 10^4 et 10^7 ng/ml. Cela équivaut à des dosages poids/volume entre 0,001 et 1 %. Les nettoyeurs pour lesquels une concentration entre 0,1 et 1 % est rapportée dans la fiche signalétique ont obtenu des niveaux variant entre 0,2 à 3 % (poids/volume). Le seul nettoyeur dont la fiche signalait un dosage entre 1 et 5 % de subtilisine a produit un résultat de 2,5 % poids/volume.

Tableau 1 : Concentration de protéases de « type subtilisine » dosée dans les savons fournis par les hôpitaux participants.

Nom commercial du savon (détergent)	Concentration de subtilisine ou protéases selon la FDS	Numéro de l'hôpital où le savon est utilisé	Concentration mesurée	Concentration en % poids/volume
			ng/ml	g/100 ml
PO	-	1 et 6	$12 * 10^3$	0,0012
EP	-	3	$5,5 * 10^3$	0,5500
SO	-	2 et 6	$1,0 * 10^7$	1,0000
AL	-	1	<0,15	
NK	-	1	< 0,075	
LJD	-	1 et 3	<0,3	
NW	-	6	<0,007	
TW	-	6	<0,007	
MD	-	1	<7,5	
EC	inconnu	1	$4,5 * 10^6$	0,4500
AA	0,1-1 %	1, 2 et 3	$2,0 * 10^6$	0,2000
VEC	0,1-1 %	1, 3 et 6	$3,4 * 10^6$	0,3400
K	0,1-1 %	6	$7,8 * 10^6$	0,7840
EM	0,1-1 %	1	$3,0 * 10^7$	3,0000
PR	1-5 %	1, 2, 3, 4 et 5	$2,5 * 10^7$	2,5000

3.2 Échantillonnage de l'air

3.2.1 Débits de fonctionnement du Coriolis®µ

Dans un premier temps, les modifications de débit de fonctionnement de l'appareil Coriolis®µ ont été évaluées. Après avoir nébulisé un savon directement dans l'orifice de captation du Coriolis®µ sans enceinte d'exposition, les différents débits utilisés n'ont pas produit de différence notable entre les concentrations de subtilisine mesurées par m^3 d'air à partir de la solution du cône. Ces essais ont, par contre, permis d'observer une perte importante du liquide dans ce cône.

Le volume résiduel de la suspension de prélèvement diminue considérablement dans le cône lorsque le débit augmente. Afin de limiter la perte d'une quantité importante de la suspension, un débit de 100 litres/minute a été retenu pour la majorité des essais.

3.2.2 Efficacité de captation des échantillonneurs

La Figure 9 présente les concentrations en subtilisine obtenues de la solution du cône de prélèvement et celles prélevées sur les filtres placés à la sortie d'air de l'appareil Coriolis®μ. Il est démontré, et ce, pour quatre essais différents, que les concentrations de subtilisine mesurées sur les filtres en fibre de verre sont considérablement supérieures à celles récupérées dans la suspension du cône de prélèvement. Ces essais démontrent que la subtilisine n'est pas conservée dans le cône et sa présence détectée à la sortie d'air prouve qu'elle est éliminée en évacuant l'appareil.

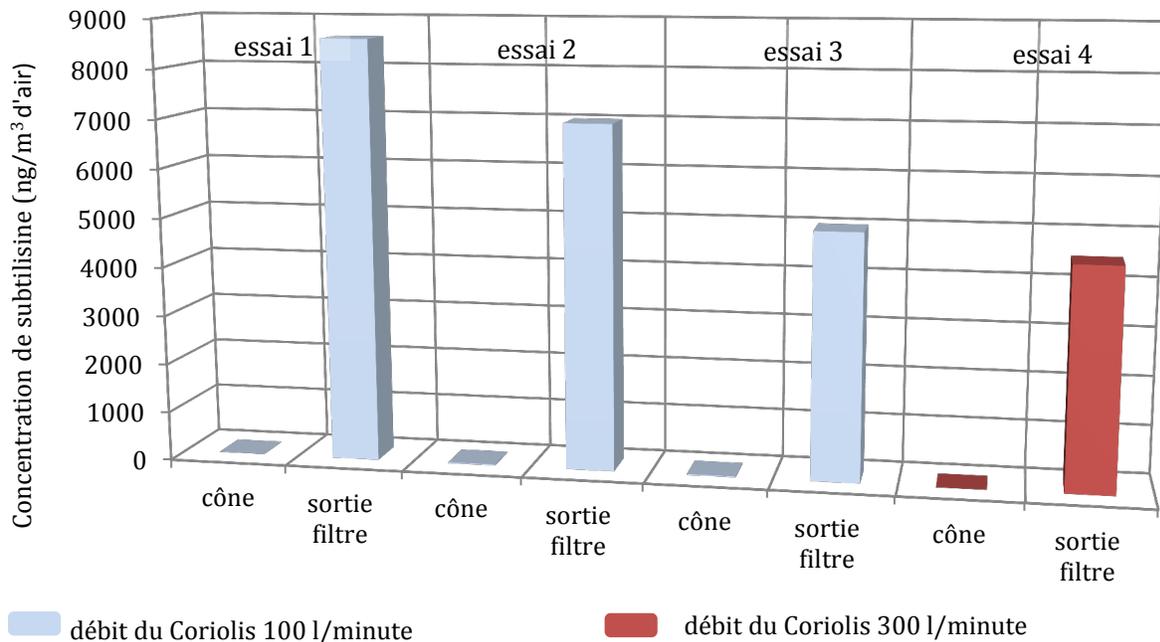


Figure 9 : Comparaison des concentrations de subtilisine mesurées dans la suspension du cône de prélèvement du Coriolis®μ ainsi que sur une cassette placée à sa sortie d'air.

Pour le système de prélèvement IOM avec les filtres en fibre de verre, les résultats démontrent que la subtilisine est bien captée. En effet, les concentrations de subtilisine mesurées sur le filtre de premier niveau étaient de 2000, 2400, 7300 et 9300 ng/m³, alors que celles sur le second étaient toutes inférieures à la limite de détection.

3.2.3 Comparaison des appareils de prélèvement dans l'enceinte d'exposition

La comparaison des concentrations de subtilisine mesurées dans l'air par les deux systèmes évalués permet de confirmer les difficultés de captation de l'appareil Coriolis®μ. Des essais ont

été effectués également à l'aide de l'enceinte d'exposition avec les conditions contrôlées. Les résultats présentés à la Figure 10 démontrent que les concentrations mesurées dans la suspension des cônes de prélèvement sont presque nulles alors que celles sur les filtres en fibre de verre des porte-filtres IOM se situent dans l'ordre de 10 000 ng/m³ d'air. Il faut noter que les prélèvements ont été réalisés simultanément.

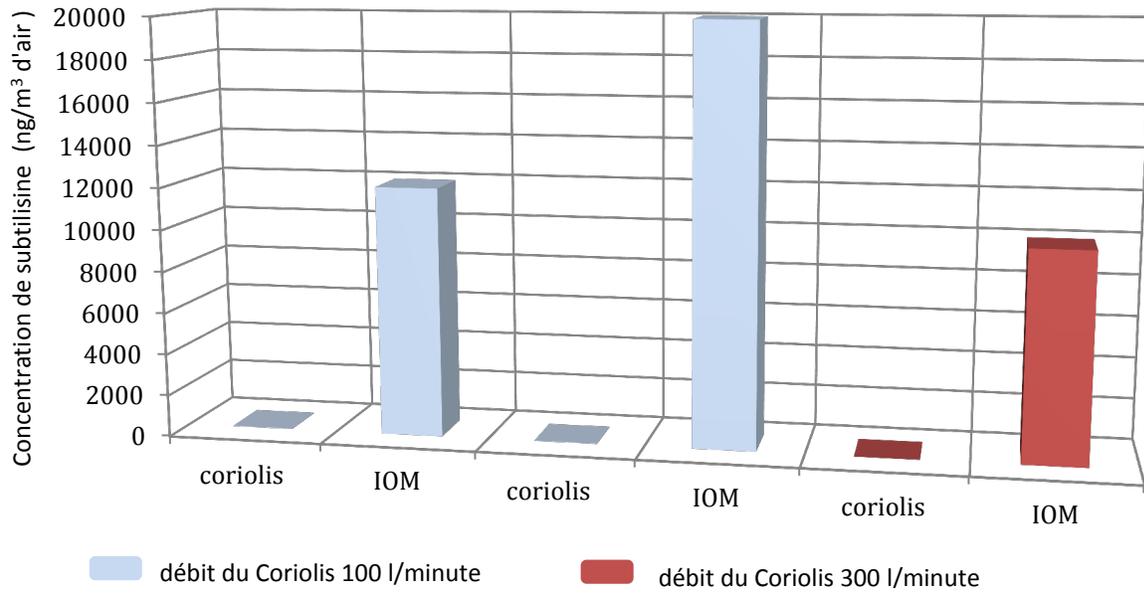


Figure 10 : Comparaison des concentrations de subtilisine mesurées avec l'appareil Coriolis®μ et le porte-filtre IOM en utilisant l'enceinte d'exposition pour produire l'environnement contrôlé.

3.3 Échantillonnage en milieu de travail

Les salles évaluées lors de cette activité sont apparues très inégales du point de vue de l'instrumentation utilisée pour le nettoyage, car leurs installations dataient de différentes époques. En effet, les visites ont laissé voir aussi bien des locaux exigus et désuets que des pièces plus récentes, vastes, avec des espaces aérés, ou encore des salles avec de très petites aires de travail et peu de ventilation. Des hottes de captation grillagées, installées à proximité des éviers afin de capter à la source les émissions de contaminants lors de la décontamination des instruments, ont même été observées dans un local étudié. La Photo 1 montre l'emplacement des capteurs dans cette salle. Les schémas représentant toutes les salles ainsi que les sites de prélèvements se retrouvent à l'Annexe A.



Photo 1 : Captation à la source utilisée au-dessus des évier lors des premières étapes de décontamination. La flèche indique l'emplacement du capteur d'air.

La limite de détection d'analyse est calculée en utilisant le plus petit point de la courbe standard de subtilisine lors de l'analyse, qui est multiplié par le volume d'eau utilisée pour faire l'extraction de la subtilisine du filtre en fibre de verre, et le tout divisé par le volume d'air prélevé en mètres cubes d'air.

Exemple

Débit de prélèvement : 10 l/min

Durée du prélèvement : 15 minutes

Plus petit point de la courbe standard : 0,78 ng/ml

Volume d'eau à l'extraction : 3 ml

$$\text{Volume d'air prélevé} = \frac{\text{débit de prélèvement} \times \text{durée de prélèvement}}{\text{facteur de conversion du volume}} = \frac{10 \frac{\text{l}}{\text{min}} \times 15 \text{ min}}{1000 \text{ l/m}^3} = 0,150 \text{ m}^3$$

$$\text{Limite de détection} = \frac{\text{plus petit point de la courbe standard} \times \text{volume d'eau à l'extraction}}{\text{volume d'air prélevé}}$$

$$\text{Limite de détection} = \frac{0,78 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml}}{0,150 \text{ m}^3} = 15,6 \text{ ng/m}^3$$

Cinq résultats supérieurs à la limite de détection ont été obtenus avec l'appareil Coriolis®μ alors que ce nombre est de 18 pour les cassettes IOM et les filtres en fibre de verre. La méthode avec le porte-filtre IOM a rapporté des concentrations supérieures à la limite d'exposition pour au moins un poste dans trois des hôpitaux étudiés, soit dans une salle de décontamination de l'hôpital n°1, dans les salles de retraitement et de décontamination de l'hôpital n°3 et dans la salle de pré lavage de l'hôpital n°4. L'ensemble des concentrations des protéases de type subtilisine mesurées dans l'air ambiant des cinq hôpitaux est présenté au Tableau 2.

Tableau 2 : Concentration de protéases de « type subtilisine » mesurée dans l'air ambiant de cinq hôpitaux. Échantillonnages réalisés avec un porte-filtre IOM et des filtres en fibre de verre ou un appareil Coriolis®µ.

Porte filtre IOM et filtre en fibre de verre					Appareil Coriolis										
	Local	Poste	Volume d'air prélevé	Concentration de protéase de type subtilisine	Local	Poste	Volume d'air prélevé	Concentration de protéase de type subtilisine							
			Litres	ng/m ³ d'air			Litres	ng/m ³ d'air							
Hôpital 1 IOM	décontamination petite salle	B	120	<10	Hôpital 1 Coriolis	salle de retraitement	Près des travailleurs	1000	<10						
		C	120	<10				1000	<10						
		A	120	<10				1000	<10						
	décontamination grande salle	E	115	<10				1000	<10						
		D	115	40				1000	<10						
E	120	<10	1000	<10											
Hôpital 2 IOM	décontamination	Près des travailleurs	60	<3				Hôpital 2 Coriolis	décontamination petite salle	Près des travailleurs	1000	<10			
			60	<3							1000	<10			
			60	<3							1000	<10			
			60	<3							1000	<10			
			60	<3	1000	<10									
Hôpital 3 IOM	retraitement bronchoscope	Poste A 1 travailleur	150	<10	Hôpital 3 Coriolis	retraitement bronchoscope	Près des travailleurs				1000	<10			
			140	20							1000	<10			
			150	40							1000	<10			
			130	50							1000	<10			
	décontamination	Poste C aucun travailleur	120	<10							Hôpital 4 Coriolis	décontamination	Près des travailleurs	1000	<10
110			60	1000				<10							
150			DT	1000				<10							
Hôpital 4 IOM jour 2	salle pré lavage	Poste F	140	70				Hôpital 4 Coriolis	Salle pré lavage	Près des travailleurs				1000	<10
			115	<10										1000	140
			115	<10										1000	210
			H	120	110-reprise < 10	1000	60								
			B	115	<10	1000	130								
				115	50	1000	50								
			C	115	<10	Hôpital 4 Coriolis	décontamination							laveuse automatique	1000
				120	50						1000	<10			
			E	115	20						1000	<10			
				115	30						1000	<10			
F	115	<10	1000	<10											
	115	<10	1000	<10											
SOUS ÉVIER	115	<10	1000	<10											
	115	70	1000	<10											
I	115	<10	1000	<10											
	115	<10	1000	<10											
Hôpital 4 IOM jour 1	Salle pré lavage	Poste A-1	135	50	Hôpital 4 IOM jour 1	Salle pré lavage		135	90						
			135	90				135	90						
			135	90				135	60						
			135	160				135	90						
			135	90				135	<10						
	décontamination	Poste B	180	<10				135	<10						
			135	<10				135	<10						
			135	<10				135	<10						
			135	<10				135	<10						
			135	<10				135	<10						
Hôpital 5 IOM	décontamination	Poste A	135	<10	Hôpital 5 IOM	décontamination	Poste A	135	<10						
			135	<10				135	<10						
			140	<10				140	<10						
	stérilisation	Poste C	140	<10				135	<10						
			135	<10				130	<10						
			125	<10				125	<10						

supérieur à la norme
> Limite de détection

DT : Difficulté technique

3.4 Méthode d'analyse protéomique (identification subtilisine)

3.4.1 Standard de subtilisine

À la Figure 11, on montre que le contrôle positif de subtilisine Carlsberg (T+) a produit deux bandes distinctes sur le gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Avec cette analyse, il a été possible de déterminer que, pour le contrôle positif, une concentration supérieure à 37 mg/ml est facilement observable sur un gel SDS-PAGE.

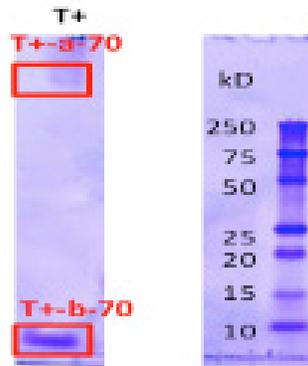


Figure 11 : Identification par analyse protéomique de la subtilisine pour le contrôle positif, concentration de 37 mg/ml, après un traitement à la trypsine. Deux bandes bien distinctes apparaissent sur le gel SDS-PAGE.

Les deux bandes distinctes du gel ont été coupées à l'aide d'un scalpel afin d'être analysées par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Les résultats obtenus de l'analyse par protéomique (Tableau 3) permettent de confirmer la présence de la subtilisine pour le contrôle positif.

Tableau 3 : Résultats de l'analyse protéomique pour le contrôle positif.

Bande	Protéine identifiée	Masse (kDa)
T+-a-70	Subtilisine Carlsberg	38 884
T+-b-70	Subtilisine Carlsberg	38 884

3.4.2 Analyse des savons

Après une concentration des savons par un facteur de 25, des bandes claires sont apparues pour trois des cinq savons analysés sur le gel de polyacrylamide (Figure 12). Les savons pour lesquels des bandes distinctes ont été observées sont le SO, le PR et le PO. Les trois bandes identifiées ont été coupées et isolées afin de poursuivre l'analyse par spectrométrie de masse. Comme aucune bande n'a été observée pour les savons EC et EM, leur étude n'a pas été poursuivie.

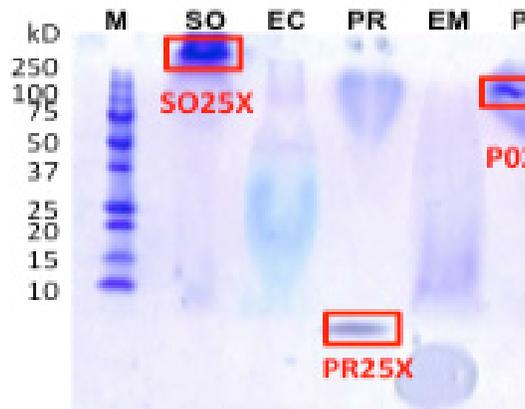


Figure 12 : Gel SDS-PAGE montrant les résultats de la migration des cinq concentrés de savon. Des bandes sont observables pour trois savons. Identification des bandes isolées pour l'analyse par spectrométrie. Standard de poids moléculaire (M). Savons analysés : SO, EC, PR, EM, PO.

Les données (séquences protéiques) obtenues à l'aide du LC-MS/MS ont été traitées par le moteur de recherche MASCOT. Les protéines identifiées à l'aide de cette base de données sont détaillées au Tableau 4. Cette analyse permet de confirmer que chacune des trois bandes isolées du gel contenait effectivement de la subtilisine. Toutefois, il est étonnant de constater qu'elle provient de l'isolation de trois bandes correspondant à des masses très différentes (variant de moins de 10 jusqu'à plus de 250 kDa [Figure 12]). La masse attendue de la subtilisine Carlsberg est d'environ 39 kDa; mais aucune des trois bandes ne correspond à ce poids moléculaire sur le gel. Une hypothèse sur ce constat serait la difficulté de migration dans le gel en raison de la présence de saponifiant dans les échantillons. Plusieurs essais ont été nécessaires afin d'obtenir la séparation des bandes et leur migration. Une optimisation de la séparation des protéines présentes dans les savons devra être effectuée. Fait intéressant démontré par cette analyse, deux des savons soit le SO et le PO contiennent d'autres protéines qui ont pu être déterminées. En effet, la présence d'alpha-amylase a été démontrée pour ces deux savons.

Tableau 4 : Résultats du dépistage des protéines présentes dans les bandes isolées du gel SDS-PAGE, analysées par LC-MS-MS et identifiées à l'aide de la base de données MASCOT.

Bande	Protéine identifiée	Masse (kDa)
SO25X	Alpha-amylase	58 513
	Complex Subtilisin Carlsberg et Eglin	27 272
	Alpha-amylase	58 023
	Amylase	57 704
	Subtilisin Carlsberg	38 884
	Hypothetical protein	12 753
	Cytochrome C oxidase subunit II	27 398
PR25X	Subtilisin Carlsberg	38 884
PO25X	Alpha-amylase	58 513
	Native structure of chimaeric amylase	54 939
	Alkaline protease	38 829

4. DISCUSSION

4.1 Méthode de dosage enzymatique

4.1.1 *Validation de la méthode analytique*

Les publications scientifiques consultées ne rapportent pas de méthode standard ni détaillée permettant la quantification de la subtilisine présente dans l'air ambiant des milieux de travail, dans les frottis de surface ou dans les savons. Cross et coll. soulèvent le problème relatif à l'absence de méthode validée par le NIOSH et l'OSHA pour analyser la subtilisine⁽⁴³⁾. Le manque d'information actuelle sur les limites méthodologiques ne permet pas de comparer les performances de la mise au point décrite ici à celles réalisées par d'autres chercheurs.

Notre méthode enzymatique est basée sur le dosage des protéases. L'utilisation de la trousse fournie avec l'ENZChek^{md} Protease assay kits a bien permis d'établir initialement les facteurs d'influence exigeant une évaluation et une attention particulières lors de la mise au point⁽⁴¹⁾. Les effets rapportés par le manufacturier sont : l'impact du gain sur la sensibilité, l'importance de produire une courbe standard avec l'enzyme ciblée et l'influence de la période d'incubation.

Lors de cette activité, les facteurs d'influence et les limites méthodologiques ont été déterminés. Les résultats montrent et confirment que le gain utilisé durant l'analyse influence de façon notoire la mesure de l'intensité de la fluorescence et donc la sensibilité de la méthode. Le gain optimisé pour la présente méthode est de 55. Ce gain permet d'obtenir l'intensité maximale d'émission pour la lecture de la fluorescence. L'effet de la période d'incubation a également été évalué. Les essais effectués avec différents temps d'incubation ont permis de déterminer qu'une période d'une heure alliait limite de détection et délai d'attente de façon acceptable. Une limite de détection inférieure est possible avec une période d'incubation plus longue, mais impose l'optimisation d'un nouveau gain et la production d'une nouvelle courbe d'étalonnage. Les courbes d'étalonnage sont produites à l'aide d'un standard de subtilisine. L'enzyme utilisée pour construire la courbe standard doit être la même que celle à mesurer parce que les différentes protéases ne possèdent pas nécessairement le même taux de dégradation du substrat⁽¹⁴⁾. Les courbes d'étalonnage sont réalisées en rapportant l'intensité relative de la fluorescence par rapport aux concentrations du standard. Elles seront utilisées pour déterminer ultérieurement les concentrations des échantillons en protéases de type subtilisine. Les courbes d'étalonnage produites pour diverses expériences montrent l'apparition d'un plateau lorsque les dosages de subtilisine sont au plus faibles. Le peu de variations de la fluorescence observées à ces doses inférieures à 0,5 ng/ml empêche une quantification adéquate dans cette zone.

Finalement, l'impact sur l'intensité d'émission lors d'une lecture répétée constitue également un facteur d'influence qui a été évalué et contrôlé. Cette répétition provoque une diminution considérable de l'intensité de la fluorescence émise et, par le fait même, influence les résultats. On doit imposer une limite au nombre de relectures d'une même multiplaque.

La validation de la méthode a montré de très bonnes performances au regard de l'exactitude et de la répétabilité. La présence d'agents inhibiteurs observée lors de certains des essais impose l'addition d'un ajout dosé de subtilisine standard à titre de contrôle. Cet ajout dosé permet en

plus de vérifier qu'une bonne récupération de subtilisine est effectuée: ce qui renforce la robustesse des résultats.

Les chercheurs du HSL^(14,44) rapportent, dans leurs récentes publications, quelques détails au sujet de la méthode qu'ils utilisent pour le dosage de la subtilisine. La méthode de dosage qui est décrite est celle de l'activité enzymatique protéolytique avec de la caséine Bodipy^{mc} à titre de substrat de la subtilisine. Elle est similaire à celle de notre activité. Leurs résultats ont toutefois été quantifiés à partir d'un standard de subtilisine purifiée et d'une courbe d'étalonnage s'étalant de 0 à 25 ng/ml tandis que ceux de la présente activité le sont à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à partir de subtilisine pure pour des concentrations de 0,7 à 10 ng/ml. Des courbes ayant de plus grandes étendues ont parfois été retenues ici pour certaines évaluations. Malheureusement, d'importantes informations en ce qui concerne le temps d'incubation et les interférences observables n'ont pas été rapportées dans ces publications. Malgré cela, de nombreux échanges entre les chercheurs du HSL et ceux de l'IRSST ont permis de faciliter le travail et la mise au point de la méthode jetant ainsi les bases nécessaires à une certaine uniformisation entre ces deux groupes de recherche et indirectement avec les futurs utilisateurs de la méthode. Cela permettra éventuellement la comparaison des résultats obtenus lors d'évaluations en milieux de travail dans différents pays.

4.1.2 Analyse des savons

Les produits nettoyants utilisés varient considérablement entre les hôpitaux et entre les unités d'un même hôpital. Les produits sont sélectionnés selon les besoins spécifiques de chaque unité, leurs performances, les recommandations des fournisseurs, mais aussi selon les budgets. Ce constat a également été dressé par les chercheurs du HSL lors d'études de cas réalisées dans deux hôpitaux d'Angleterre⁽⁴⁴⁾. La diversité des produits utilisés complique la détermination des risques.

L'information relative au contenu enzymatique des différents savons utilisés n'est ni connue ni même disponible. Certaines fiches signalétiques accompagnant les savons, et transmises par les responsables des hôpitaux lors de l'étude, ne mentionnaient aucunement la présence de subtilisine et d'enzyme dans leur contenu. Parmi ceux-ci, sept n'en contenaient effectivement aucune. En revanche, des protéases de type subtilisine ont été détectées dans le contenu de trois d'entre eux. Environ un savon sur trois, pour lequel aucune mention de subtilisine n'est rapportée dans la fiche signalétique, pourrait en contenir après vérification. Des omissions d'information de ce genre ont d'ailleurs déjà été signalées par les chercheurs du HSL en Angleterre et ceux de l'IRSST au Québec^(44,45).

Même si la fiche signalétique d'un savon indique bien la présence d'enzymes et son contenu de protéases et d'amylases, des omissions graves peuvent être commises à d'autres niveaux. À titre d'exemple, une fiche en particulier rapporte, en caractère gras, qu'il n'y a aucun ingrédient à risque pour la santé et que les enzymes présentes dans le produit sont sans danger. Or, les enzymes contenues dans les savons et les détergents sont des agents sensibilisants même à des concentrations inférieures à 1 %⁽³⁾.

Ces observations illustrent bien les déficiences en ce qui a trait aux informations fournies par les fabricants ainsi qu'à l'égard des connaissances et de la compréhension au sujet des enzymes et

de leurs effets sur la santé. Nous croyons que la classification sans risque pour la santé de certains microorganismes en regard à leur caractère infectieux ne doit pas être généralisée à l'ensemble des risques possibles sur la santé que pourraient représenter ces microorganismes. Ainsi, un produit dit « vert » pour l'environnement ne signifie aucunement qu'il soit exempt de tous risques pour la santé. La subtilisine en est un exemple parfait. Parce qu'issue d'une bactérie non reconnue comme étant pathogène, les utilisateurs concluent généralement qu'aucun risque pour la santé n'est présent lorsqu'elle se retrouve dans les savons dits « verts ». La vigilance est de mise, mais elle pourrait ne pas être suffisante. Lorsque l'information n'est pas fournie par le fabricant, il devient difficile de prévenir l'exposition du travailleur ainsi que les effets sur la santé que peuvent provoquer ces produits.

4.2 Échantillonnage de l'air

L'efficacité de captation des appareils de prélèvement peut varier selon leurs paramètres de fonctionnement. Des débits d'aspiration sont proposés par les manufacturiers de chaque appareil afin de conserver leur efficacité de captation pour les aérosols étudiés. Les débits d'utilisation proposés pour l'appareil Coriolis®µ vont de 50 à 300 l/min. Toutefois, cette activité a démontré que le débit d'aspiration du Coriolis®µ influait considérablement sur le volume résiduel de la suspension de prélèvement dans le cône. Cette constatation fait craindre une réduction non négligeable par réentraînement des particules prélevées. Selon les observations et les optimisations réalisées en laboratoire, il est préférable d'utiliser cet appareil à un débit de 100 l/min afin de limiter la perte de liquide. Toutefois, les essais réalisés à ce débit avec une enceinte d'exposition ont démontré que la subtilisine n'était pas conservée dans le cône de prélèvement et se retrouvait sur un filtre placé à la sortie d'air du Coriolis®µ.

D'autres expériences menées également dans l'enceinte d'exposition ont confirmé les difficultés de captation du Coriolis®µ. Lors de ces essais, les porte-filtres IOM et le Coriolis®µ, placés parallèlement dans l'enceinte, n'ont pas prélevé les mêmes concentrations. Le Coriolis®µ ne recueillait pas la subtilisine à un niveau quantifiable alors que les porte-filtres IOM et les filtres en fibre de verre permettaient d'atteindre aisément des doses mesurables et très largement au-dessus de la limite de détection. Les dimensions des particules générées dans l'enceinte d'exposition peuvent être différentes de celles rencontrées en milieu de travail et peuvent expliquer en partie cette piètre performance de captation du Coriolis®µ dans les conditions présentes. L'utilisation du Coriolis®µ a été abandonnée après trois évaluations terrain par crainte de sous-estimer de façon importante des concentrations réelles présentes dans les milieux. L'équipe a poursuivi les évaluations terrain avec les filtres en fibre de verre et le porte-filtre IOM.

L'utilisation des filtres en fibre de verre pour faire les prélèvements de subtilisine dans l'air ambiant de différents milieux a déjà été rapportée dans la littérature^(26,43,44). L'efficacité des filtres est confirmée par cette étude, aucune subtilisine n'a été retrouvée sur le filtre placé au deuxième rang. La subtilisine est donc entièrement captée par le filtre placé au premier rang : aucune particule ne l'a traversé. Zhou et Cheng ont démontré que les cassettes IOM conservaient leur efficacité de captation pour les particules de la fraction inhalable jusqu'à des débits atteignant 10 l/min⁽⁴⁶⁾. Puisque la réglementation québécoise impose une valeur plafond d'exposition pour la subtilisine, il est nécessaire de limiter la durée des prélèvements. C'est dans

cette optique qu'un débit de 10 l/min a été utilisé avec les porte-filtres IOM. Cela permet d'atteindre une limite de détection d'environ 15 ng/m³ pour une durée de prélèvement de 15 minutes, à un débit de 10 l/min. Ces paramètres ont été retenus lors de prélèvements sur le terrain et ont permis de démontrer la présence d'enzymes de type subtilisine dans quelques échantillons.

4.3 Échantillonnage en milieu de travail

Les prélèvements effectués dans les cinq centres hospitaliers participants ont confirmé la capacité et la performance de la méthode enzymatique mise en place. Cette méthode permet de documenter les concentrations d'enzyme de type subtilisine dans l'air ambiant des milieux de travail. Les concentrations enzymatiques mesurées dans l'air ambiant des hôpitaux étudiés correspondent à celles rapportées en Angleterre⁽¹⁴⁾. Les niveaux les plus élevés dans la présente étude ont été mesurés aux postes de lavage manuel comme il a été démontré dans les autres études. Les prélèvements d'air effectués aux abords des laveurs automatiques ne permettent pas de les décrire comme source d'exposition importante dans les hôpitaux, du moins lorsque les prélèvements sont réalisés du côté souillé des salles de stérilisation. En effet, en ce qui a trait au poste de lavage automatique, un seul des prélèvements effectués aux abords d'une laveuse automatique démontrait une concentration supérieure à la limite de détection.

4.4 Méthode d'analyse protéomique (identification subtilisine)

4.4.1 Analyse des savons

Les échantillons de savon brut ne peuvent pas être concentrés de façon substantielle par la méthode de dialyse. Cette technique n'a pas permis d'obtenir les bandes claires nécessaires sur le gel SDS-PAGE. Il est difficile d'établir la cause exacte de l'inefficacité de la dialyse. Il est possible que les pores de la cassette de dialyse aient été bloqués par un composé non identifié, empêchant ainsi l'échantillon de s'équilibrer par osmose avec le milieu extérieur.

Par contre, la méthode de concentration par filtres à centrifugation a permis l'obtention de bandes claires pouvant être isolées du gel pour la poursuite de l'analyse. La spectrométrie effectuée sur ces bandes a permis de générer les séquences protéiques des enzymes contenues dans ces savons. Le croisement des résultats avec ceux de la banque de données MASCOT a permis d'en déterminer la nature. En plus de quelques autres protéines, la subtilisine a été détectée dans trois savons. Les entreprises qui ajoutent de la subtilisine dans leurs savons, semblent le faire à partir d'un extrait cellulaire brut ou d'expressions recombinantes de la subtilisine sans purification ou seulement avec un assainissement très sommaire. Cela est démontré par la présence d'autres protéines dans deux savons, notamment de l'alpha-amylase.

Les résultats indiquent bien que les savons ont une influence marquée sur la migration des protéines dans le gel SDS-PAGE. Cet effet altère les résultats obtenus par rapport à l'échelle de masses standards utilisée. Par exemple, la subtilisine caractérisée lors de notre activité provient de bandes qui ne correspondaient en rien au poids moléculaire attendu de ce type d'enzyme. L'identification des protéines présentes dans ces bandes permet toutefois de prouver la présence de subtilisine.

Afin d'améliorer la méthode par analyse protéomique, quelques avenues sont envisageables. Lorsque les analyses sont réalisées dans des savons, il serait judicieux d'éviter de limiter la sélection des bandes à celles qui correspondent au poids moléculaire recherché. Il y aurait aussi avantage à réduire la quantité de savon contenue dans les échantillons afin d'obtenir de meilleures séparations sur gel. Et si les concentrations sont suffisantes, il pourrait être envisagé d'effectuer l'analyse protéomique directement sur les échantillons sans purification sur gel.

4.5 Moyens de contrôle

Différents moyens peuvent être envisagés pour contrôler l'exposition des travailleurs à la subtilisine dans les centres hospitaliers. Ce projet a permis de faire quelques observations.

Une première avenue est d'effectuer d'abord la substitution du produit par un autre n'en contenant pas. Il faut toutefois faire attention à ne pas sélectionner un produit pouvant occasionner d'autres problèmes. L'étude a démontré que certains produits ne contiennent pas de protéase, donc pas de subtilisine. D'autres enzymes présentes dans ces savons pourraient être responsables de la sensibilisation⁽⁴⁷⁾. Emprunter une telle avenue exige que l'utilisateur soit informé de la présence ou non de substances présentant des risques pour sa santé dans le nouveau produit visé. Un aspect préventif fondamental est de s'assurer que les fabricants remplissent de façon adéquate les fiches signalétiques en déclarant tous les produits présents dans les savons verts.

En deuxième lieu, un système de captation à la source (photo 1) peut être mis en place. Un des centres visités disposait d'une bouche d'aspiration tout près des éviers. La présente étude n'avait pas pour objectif d'évaluer l'efficacité de cette mesure de contrôle et ne permet donc pas de le faire. Tous les prélèvements effectués dans ce centre étaient négatifs puisqu'aucun savon contenant de la subtilisine n'y était utilisé. On ne peut ainsi présumer de l'efficacité d'une telle mesure de captation à la source. Toutefois, la captation à la source s'est montrée une technique efficace et à privilégier dans une multitude d'autres cas. Elle constitue à notre avis une option applicable qui devrait être considérée.

Le lavage manuel constitue l'étape qui génère les concentrations les plus élevées. L'évaluation minutieuse des postes de travail au lavage manuel est recommandée afin de repérer les méthodes et techniques de travail qui produisent des aérosols et de proposer des techniques qui en limitent la production. Déjà, l'utilisation d'un système d'injection submergé pour que le savon enzymatique soit ajouté dans un évier déjà rempli d'eau est efficace pour réduire la production d'aérosols⁽¹⁴⁾ et ce système pourrait être installé aux endroits nécessaires. L'ajout du savon enzymatique dans un évier vide est à proscrire puisque l'ouverture des robinets produit une aérosolisation importante du produit lorsque le jet d'eau atteint le fond de l'évier. La vérification des surfaces peut permettre de déceler une contamination et pourrait être utilisée à titre de suivi préventif.

Le port d'un appareil de protection individuel (API) est déjà prescrit dans certains des hôpitaux participants (Annexe B, Photo 5 et Photo 6). Le contrôle par les API peut être recommandé lorsque la charge de travail est importante ou pour la réalisation de certaines tâches qui créent des aérosols.

4.6 Les portées

Cette étude décrit une méthode de prélèvement et d'analyse applicable aux protéases de type subtilisine dans l'air des milieux de travail au Québec et ailleurs. La trousse de dosage des protéases disponible commercialement a permis de très bonnes performances analytiques et une facilité d'exécution qui minimise le temps d'obtention des résultats. Les prélèvements sur filtres sont conseillés. Ils peuvent atteindre une limite de détection aussi faible que 3 ng/m³ d'air selon le débit, la durée de prélèvement et le volume d'extraction choisis.

Les analyses protéomiques peuvent être mises à contribution lorsqu'une caractérisation des enzymes est nécessaire dans les savons. Ce travail met en évidence le potentiel d'une méthode combinant l'ingénierie des protéines et la spectrométrie de masse (protéomique); une méthode qui permet d'envisager la quantification et l'identification de la subtilisine dans les prélèvements d'air où les concentrations sont beaucoup plus faibles. Des essais réalisés durant notre étude ont permis de caractériser deux peptides tryptiques de la subtilisine. Ces deux peptides semblent efficaces pour effectuer la détection de la subtilisine en mode « multiple reaction monitoring » (MRM). L'incorporation d'un ou de plusieurs atomes d'azote 15 (¹⁵N) dans la structure peptidique caractéristique de la subtilisine permettrait éventuellement une analyse quantitative de l'enzyme dans différents échantillons.

Les chercheurs du HSL ont effectué des analyses enzymatiques sur des prélèvements de surface. Il s'agit d'une autre application intéressante de la méthode à explorer. Ce type de prélèvements, en permettant le suivi de la quantité d'enzymes sur les surfaces, pourrait servir à évaluer la qualité d'un nettoyage ou la nécessité d'en pratiquer un. Une telle méthode servirait, à titre préventif, à limiter l'accumulation de subtilisine sur les surfaces de travail et dans l'environnement et, par le fait même, le développement possible de sensibilisation chez les travailleurs exposés⁽⁴⁴⁾.

4.7 Les limites

La méthode par dosage enzymatique des protéases ne permet pas une caractérisation spécifique de la subtilisine. Elle permet toutefois de démontrer une absence de protéase donc de subtilisine. Pour des échantillons positifs, une confirmation demeure nécessaire.

L'identification des enzymes présentes dans cinq savons ayant produit des résultats positifs avec la méthode enzymatique a été effectuée avec succès. Les résultats démontrent clairement la capacité de la méthode à caractériser les enzymes pour des échantillons de savon qui en contiennent à des concentrations élevées. Il reste toutefois à démontrer que cette approche demeure utilisable pour les échantillons d'air en raison de la faible quantité de subtilisine qu'on y retrouve.

Pour la méthode enzymatique, l'analyse de certains échantillons a démontré que des inhibiteurs pouvaient interférer avec la réaction de dégradation enzymatique et biaiser les résultats. Par contre, un contrôle par récupération d'ajout dosé permet de contrôler et de reconnaître ce biais et d'assurer de bons résultats.

La disposition des échantillonneurs devait respecter la capacité de réalisation des tâches des travailleurs et les limitations en lien avec les règlements des hôpitaux. De plus, pour les salles de stérilisation, l'ensemble des échantillonnages a été réalisé du côté souillé de celles-ci; il n'est donc pas possible de conclure sur les concentrations mesurées du côté stérile. Aucun échantillonnage personnel n'a été effectué lors de cette étude; les résultats sont indicatifs des milieux dans lesquels les travailleurs évoluent.

4.8 Applicabilité des résultats

Cette étude décrit les approches utilisables pour l'analyse des protéases de type subtilisine dans les savons et les échantillons d'air. Elle contient toutes les informations nécessaires à la rédaction d'une méthode d'analyse enzymatique, notamment celle des laboratoires de l'IRSST, ainsi que les différents contrôles nécessaires au suivi analytique et à la production de résultats de haute fiabilité. Une fois la présence de protéases démontrée par la méthode enzymatique, la méthode par analyse protéomique permet l'identification des enzymes présentes.

5. CONCLUSION

Ici comme ailleurs, les mouvements « verts » revendiquent une réduction de l'emploi des composés chimiques dans la société et cela engendre une augmentation de l'utilisation des produits dits biologiques. L'argument principal appuyant cette tendance est que ce qui est naturel ne représente pas de risque pour la santé. Or, il existe bel et bien un manque de connaissances relatives aux risques pour la santé des produits dits « biologiques », particulièrement lors de l'utilisation des enzymes dans les produits d'usage courant. Dans un but de prévention, leur présence dans les produits doit être déclarée, même si les dosages sont faibles. Rappelons que Rähse juge que le contenu enzymatique dans les savons et détergents est sensibilisant à des concentrations inférieures à 1 %⁽³⁾. Une détermination adéquate du contenu enzymatique par le fabricant devrait être obligatoire et la fiche de leur produit devrait préciser les risques potentiels. Une bonne information permettra l'utilisation de moyens de contrôle et de protection appropriés par les utilisateurs. La divergence démontrée entre le contenu des produits rapporté dans les fiches et leur contenu réel appelle à la vigilance et peut justifier la vérification par un laboratoire des enzymes véritablement incluses.

Bien que l'objectif initial n'ait pas été atteint, cette étude a contribué à faire la mise au point d'une méthode d'analyse rapide et efficace des protéases dans des échantillons de savon et dans les prélèvements d'air ambiant. La stratégie d'échantillonnage employée a fourni des résultats démontrant la présence de protéases dans l'air ambiant de trois des cinq centres hospitaliers participants. Il s'agit d'une méthode d'évaluation simple qui requiert une stratégie de prélèvement utilisée couramment en hygiène du travail et qui permet la documentation de l'exposition des travailleurs du Québec aux enzymes.

Cette étude a également permis d'établir que l'étape du lavage manuel des instruments et des endoscopes constitue la source principale d'exposition des travailleurs aux aérosols de protéases de type subtilisine alors que les laveurs automatiques ne se sont pas avérés être des sources importantes d'aérosols dans les hôpitaux étudiés.

L'analyse protéomique s'est avérée très efficace pour caractériser les enzymes présentes dans les échantillons de savon. L'utilisation de la protéomique dans un contexte de SST représente une avenue prometteuse à explorer. Elle peut fournir une identification spécifique de la subtilisine à laquelle les travailleurs sont exposés et permettre, en plus, la caractérisation de plusieurs protéines et enzymes rencontrées dans les milieux de travail au Québec.

La présence des autres protéines retrouvées dans les savons, notamment l'alpha-amylase, doit absolument être considérée. Des réactions allergiques et des effets adjuvants possibles causés par ces autres enzymes pourraient être observés. Bien que la substitution de produit soit une avenue préventive, elle doit être effectuée avec prudence, car une sensibilisation a été démontrée à un produit sans subtilisine⁴⁸.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) TOBELEM, É. et P. BRIARD (1998). *Biotechnologies le droit de savoir*, Eurotext., John Libbey Eurotext.
- (2) NIMMO, C. (2014). *Le petit Larousse illustré 2015: 90000 articles, 5000 illustrations, 355 cartes, 160 planches ; chronologie universelle*, Paris, Larousse.
- (3) RÄHSE, W. (février 2014). « Production of Tailor-Made Enzymes for Detergents », *ChemBioEng Reviews*, [en ligne], vol. 1, n° 1, p. 27-39, <<http://doi.org/10.1002/cben.201300001>> (consulté le 16 septembre 2014).
- (4) ALEMZADEH, I. et Y.-T. HUNG (février 2012). « Enzyme technology for environmental engineering », dans *Handbook of Environment and Waste Management*, [en ligne], World Scientific, p. 1089-1135, <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789814327701_0024> (consulté le 24 septembre 2014).
- (5) LI, S., X. YANG, S. YANG, M. ZHU et X. WANG (septembre 2012). « Technology prospecting on enzymes; application, marketing and engineering », *Computational and Structural Biotechnology Journal*, [en ligne], vol. 2, n° 3, p. 1-11, <<http://doi.org/10.5936/csbj.201209017>> (consulté le 24 octobre 2014).
- (6) DELANGE, R. J. et E. L. SMITH (1968). « Subtilisin Carlsberg I. amino acid composition; isolation and composition of peptides from the tryptic hydrolysate », *Journal of Biological Chemistry*, [en ligne], vol. 243, n° 9, p. 2134-2142, <<http://www.jbc.org/content/243/9/2134.short>> (consulté le 24 octobre 2014).
- (7) RAWLINGS, N. D., M. WALLER, A. J. BARRETT et A. BATEMAN (1 janvier 2014). « MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors », *Nucleic Acids Research*, [en ligne], vol. 42, n° D1, p. D503-D509, <<http://doi.org/10.1093/nar/gkt953>> (consulté le 24 octobre 2014).
- (8) HERA (2007). *Human and Environmental risk Assessment, Subtilisins (Protease)*, [en ligne], <<http://www.heraproject.com>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (9) INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SÉCURITÉ (INRS) (2014). *Les risques biologiques en milieu professionnel*, [en ligne], <<http://www.inrs.fr>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (10) HEALTH CANADA et SANTÉ CANADA (2004). *Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire*, [en ligne], <<http://www.phac-aspc.gc.ca>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (11) FLINDT, M. L. H. (juin 1969). « Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of *Bacillus subtilis* containing proteolytic enzyme », *The Lancet*, [en ligne], vol. 293, n° 7607, p. 1177-1181, <[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)92165-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)92165-5)> (consulté le 31 octobre 2014).

- (12) PEPYS, J., J. L. LONGBOTTOM, F. E. HARGREAVE et J. FAUX (juin 1969). « Allergic reactions of the lungs to enzymes of *Bacillus subtilis* », *The Lancet*, [en ligne], vol. 293, n° 7607, p. 1181-1184, <[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)92166-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)92166-7)> (consulté le 2 décembre 2014).
- (13) KIMBER, I. et D. A. BASKETTER (avril 2014). « Categorisation of protein respiratory allergens: The case of Subtilisin », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, [en ligne], vol. 68, n° 3, p. 488-492, <<http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.02.004>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (14) GARETH, E., I. SMITH, S. STAGG et H. MASON (2013). *A survey of exposure to enzymes in cleaning solutions used to clean endoscopes*, [en ligne], Derbyshire, UK, Health and Safety Executive, <<http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr972.pdf>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (15) WARBURTON, J. (mai 2006). « Monitoring individual exposures to enzymes in the workplace », *Industrial hygiene news*, [en ligne], <<http://www.rimbach.com/cgi-bin/Article/IHN/Number.idc?Number=84>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (16) TANG, L. X., F. J. ROWELL et R. H. CUMMING (1997). « Monitoring proteolytic enzymes for health and safety in the manufacturing environment. A review », *Analytica chimica acta*, [en ligne], vol. 347, n° 1, p. 235-240, <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267097000056>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (17) JOHNSEN, C. R., T. B. SORENSEN, A. I. LARSEN, A. B. SECHER, E. ANDREASEN, G. S. KOFOED, L. F. NIELSEN et F. GYNTELBERG (1997). « Allergy risk in an enzyme producing plant: a retrospective follow up study. », *Occupational and environmental medicine*, [en ligne], vol. 54, n° 9, p. 671-675, <<http://oem.bmj.com/content/54/9/671.short>> (consulté le 2 décembre 2014).
- (18) SANTOS, H. F., F. L. CARMO, D. C. A. LEITE, H. E. JESUS, P. D. C. MAALOUF, C. ALMEIDA, A. U. SORIANO, D. ALTOMARI, L. SUHETT, V. VOLARO, E. VALONI, M. FRANCISCO, J. VIEIRA, R. ROCHA, B. L. SARDINHA, L. B. MENDES, R. R. JOAO, B. LACAVA, R. F. JESUS, G. V. SEBASTIAN, A. PESSOA, J. D. VAN ELSAS, R. P. REZENDE, D. O. PIRES, G. DUARTE, C. B. CASTRO, A. S. ROSADO et R. S. PEIXOTO (2012). « Comparison of different protocols for the extraction of microbial DNA from reef corals », *Brazilian Journal of Microbiology*, [en ligne], vol. 43, n° 2, p. 517-527, <<http://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200012>> (consulté le 20 mars 2014).
- (19) CHARNOCK, S. et B. MCCLEARY (juillet 2005). « Les enzymes: Applications industrielles et analytiques », *Extrait de la revue des oenologues*, [en ligne], n° 116, p. 1-5, <http://www.megazyme.com/docs/analytical-applications-downloads/enzymes_industrial_and_analytical_application_fra.pdf?sfvrsn=2> (consulté le 23 octobre 2014).

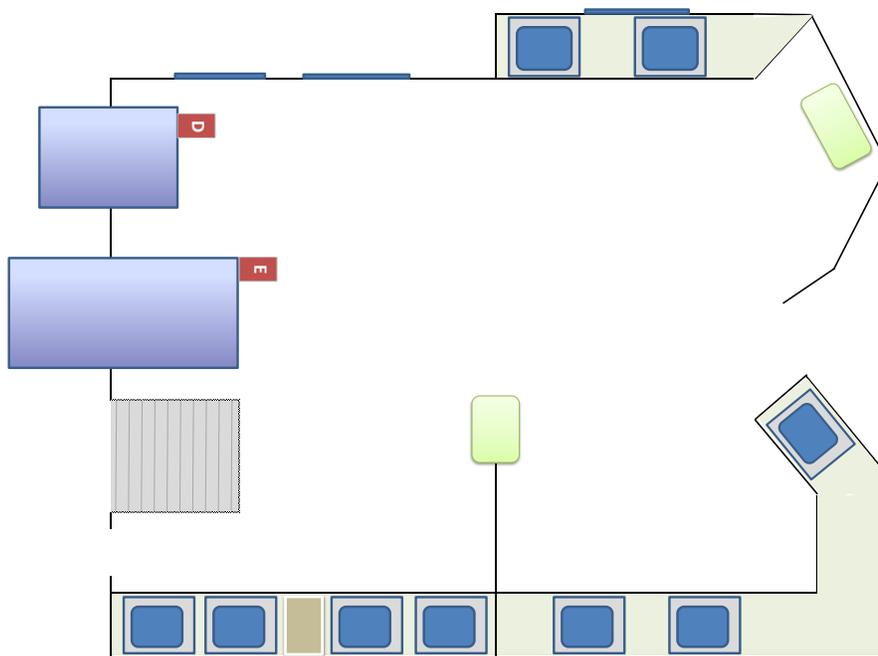
- (20) CSST (2014). « Fiche complète pour subtilisine (9014-01-1) », <http://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?no_produit=9431> (consulté le 31 octobre 2014).
- (21) AMFEP (2012). *Fact-sheet on Enzymes and the EU Regulation on classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures*, [en ligne], <<http://www.amfep.org/sites/amfep.drupalgardens.com/files/Amfep-12-01-Fact-sheet-enzymes-and-CLP-JAN2012-main.pdf>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (22) HSE (2006). *Minutes of the 49th meeting of the HSE committee on analytical requirements held at HSL.*, [en ligne], <<http://www.hsl.gov.uk>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (23) CATHCART, M., D. NICHOLSON, D. ROBERTS, M. BAZLEY, C. JUNIPER, P. MURRAY, M. RANDELL et OTHERS (1997). « Enzyme exposure, smoking and lung function in employees in the detergent industry over 20 years », *Occupational medicine*, [en ligne], vol. 47, n° 8, p. 473–478, <<http://occmed.oxfordjournals.org/content/47/8/473.short>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (24) PEDERSEN, R. (2003). *ACTs paper: Subtilisins - Proposal for a MEL*, [en ligne], <<http://www.hse.gov.uk/aboutus/meetings/iacs/acts/130303/paper08.pdf>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (25) ROSENBERG, N. (2007). *INRS - Asthme professionnel aux enzymes*, [en ligne], <<http://www.inrs.fr/accueil/produits/mediatheque/doc/publications.html?refINRS=TR%2040>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (26) SARLO, K., D. B. KIRCHNER, E. TROYANO, L. A. SMITH, G. J. CARR et C. RODRIGUEZ (mai 2010). « Assessing the risk of type 1 allergy to enzymes present in laundry and cleaning products: Evidence from the clinical data », *Toxicology*, [en ligne], vol. 271, n° 3, p. 87–93, <<http://doi.org/10.1016/j.tox.2010.03.007>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (27) LISS, G., J. KOMINSKY, J. GALLAGHER, J. MELIUS, S. BROOKS et I. BERNSTEIN (mars 1984). « Failure of enzyme encapsulation to prevent sensitization of workers in the dry bleach industry », *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, [en ligne], vol. 73, n° 3, p. 348–355, <[http://doi.org/10.1016/0091-6749\(84\)90407-X](http://doi.org/10.1016/0091-6749(84)90407-X)> (consulté le 3 novembre 2014).
- (28) CULLINAN, P., J. HARRIS, A. N. TAYLOR, A. HOLE, M. JONES, F. BARNES et G. JOLLIFFE (décembre 2000). « An outbreak of asthma in a modern detergent factory », *The Lancet*, [en ligne], vol. 356, n° 9245, p. 1899–1900, <[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03264-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03264-5)> (consulté le 31 octobre 2014).
- (29) VANHANEN, M. (2000). « Risk of enzyme allergy in the detergent industry », *Occupational and Environmental Medicine*, [en ligne], vol. 57, n° 2, p. 121–125, <<http://doi.org/10.1136/oem.57.2.121>> (consulté le 31 octobre 2014).

- (30) SDA (2005). *Risk assessment guidance for enzyme containing products*, [en ligne], <http://www.aciscience.org/docs/sda_enzyme_risk_guidance_october_2005.pdf> (consulté le 31 octobre 2014).
- (31) LIPIŃSKA-OJRZANOWSKA, A., D. ŚWIERCZYŃSKA-MACHURA, D. TYMOSZUK, E. NOWAKOWSKA-ŚWIRTA et J. WALUSIAK-SKORUPA (2013). « Occupational asthma in female factory worker resulting from exposure to Savinase in dishwashing tablets—A case study », *Journal of Occupational Health*, [en ligne], vol. 55, n° 4, p. 318-321, <<http://doi.org/10.1539/joh.12-0169-CS>> (consulté le 2 décembre 2014).
- (32) HOLE, A. M. (1 décembre 2000). « Occupational asthma caused by bacillary amylase used in the detergent industry », *Occupational and Environmental Medicine*, [en ligne], vol. 57, n° 12, p. 840-842, <<http://doi.org/10.1136/oem.57.12.840>> (consulté le 2 décembre 2014).
- (33) KEMPF, W., H. OMAN et B. WÜTHRICH (1999). « Allergy to proteases in medical laboratory technicians: A new occupational disease? », *Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 104, n° 3, p. 700-701.
- (34) LEMIERE, C., A. CARTIER, J. DOLOVICH et J.-L. MALO (1996). « Isolated late asthmatic reaction after exposure to a high-molecular-weight occupational agent. subtilisin », *Chest*, [en ligne], n° 110, p. 823-824, <<http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21736/823.pdf>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (35) VAN ROOY, F. G. B. G. J., R. HOUBA, N. PALMEN, M. M. ZENGENI, I. SANDER, J. SPITHOVEN, J. M. ROOYACKERS et D. J. J. HEEDERIK (2009). « A cross-sectional study among detergent workers exposed to liquid detergent enzymes », *Occupational and Environmental Medicine*, [en ligne], vol. 66, n° 11, p. 759-765, <<http://doi.org/10.1136/oem.2008.045245>> (consulté le 31 octobre 2014).
- (36) ACGIH (2014). *2014 TLVs and BEIs: based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents & biological exposure indices*.
- (37) RSST (2014). « Règlement sur la santé et la sécurité du travail », <http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/S_2_1/S2_1R13.HTM> (consulté le 3 novembre 2014).
- (38) MACHER, J., H. M. AMMANN et AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (1999). *Bioaerosols: assessment and control*, Cincinnati, Ohio, ACGIH.
- (39) OSHA « Chemical sampling information | Subtilisins », <https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_268300.html> (consulté le 3 novembre 2014).
- (40) JAMES, P. (1997). « Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics », *Quarterly reviews of biophysics*, [en ligne], vol. 30, n° 4, p. 279-331,

- <http://journals.cambridge.org/abstract_S0033583597003399> (consulté le 18 décembre 2014).
- (41) MOLECULAR PROBES (2004). *EnzChek® Protease assay kits*, [en ligne], <<http://www.dolphinbio.org/probes/docs/media/pis/mp06638.pdf>> (consulté le 4 novembre 2014).
- (42) MARK, D. et J. H. VINCENT (1986). « A new personal sampler for airborne total dust in workplace », *Annals of Occupational Hygiene*, [en ligne], vol. 30, n° 1, p. 89-102, <<http://doi.org/10.1093/annhyg/30.1.89>> (consulté le 5 novembre 2014).
- (43) CROSS, J. B., R. R. LARSON, L. F. PAHLER et D. K. SLEETH (juillet 2014). « Evaluation of the use of an SKC button inhalable aerosol sampler with a grimm aerosol monitor to determine air concentrations of subtilisin », *Journal of Chemical Health and Safety*, [en ligne], <<http://doi.org/10.1016/j.jchas.2014.06.002>> (consulté le 3 novembre 2014).
- (44) ADISESH, A., E. MURPHY, C. M. BARBER et J. G. AYRES (1 août 2011). « Occupational asthma and rhinitis due to detergent enzymes in healthcare », *Occupational Medicine*, [en ligne], vol. 61, n° 5, p. 364-369, <<http://doi.org/10.1093/occmed/kqr107>> (consulté le 26 novembre 2014).
- (45) BÉGIN, D., M. GÉRIN et J. LAVOIE (2014). *Risques associés aux préparations bactériennes et enzymatiques pour le dégraissage et le nettoyage*, [en ligne], Québec, IRSST, <<http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/R-829.pdf>> (consulté le 19 décembre 2014).
- (46) ZHOU, Y. et Y.-S. CHENG (30 décembre 2009). « Evaluation of IOM personal sampler at different flow rates », *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, [en ligne], vol. 7, n° 2, p. 88-93, <<http://doi.org/10.1080/15459620903418746>> (consulté le 27 novembre 2014).
- (47) SAVA F., GAUTRIN D., CARTIER A. et LEMIERE C, (1 mai 2014). « Sensitization To Detergent Enzymes In Healthcare Workers », dans *C104. OCCUPATIONAL ASTHMA AND OTHER EFFECTS OF DUST*, [en ligne], American Thoracic Society, p. A5210-A5210, <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2014.189.1_MeetingAbstracts.A5210> (consulté le 20 mai 2015).

Annexe A : Schémas des salles étudiées et des postes de prélèvements

a)



b)

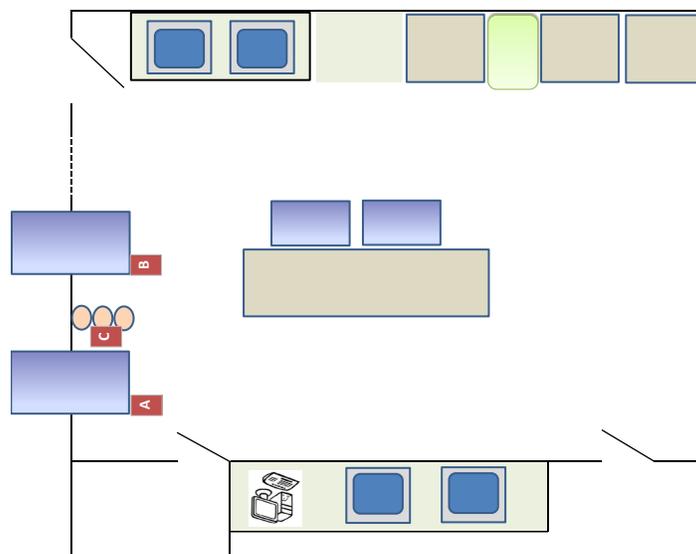


Figure 13 : Représentation schématique de la salle étudiée à l'hôpital 1 : a) Grande salle de stérilisation, prélèvements du côté souillé; b) Petite salle de stérilisation, prélèvements du côté souillé.

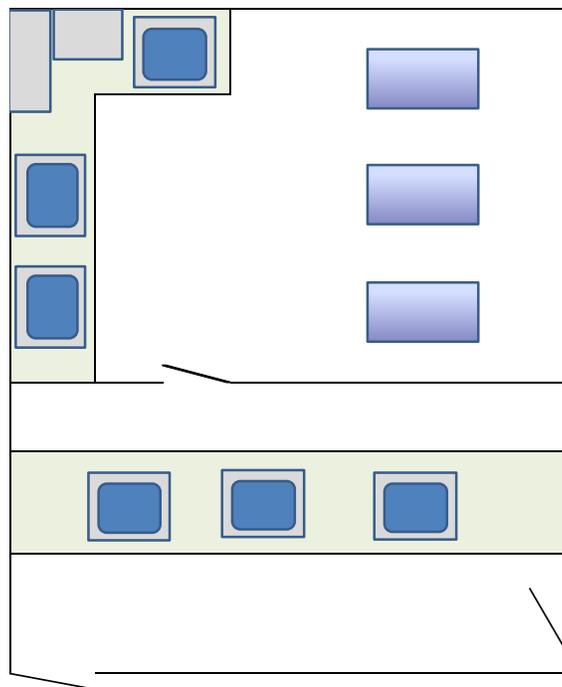
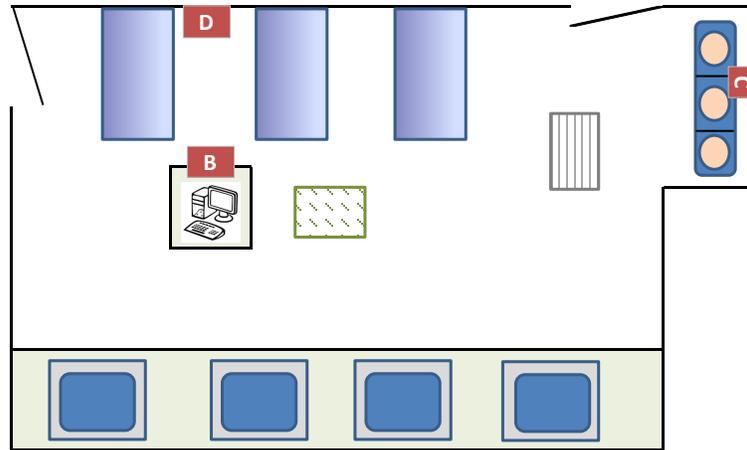


Figure 14 : Représentation schématique de la salle étudiée à l'hôpital 2.

a)



b)

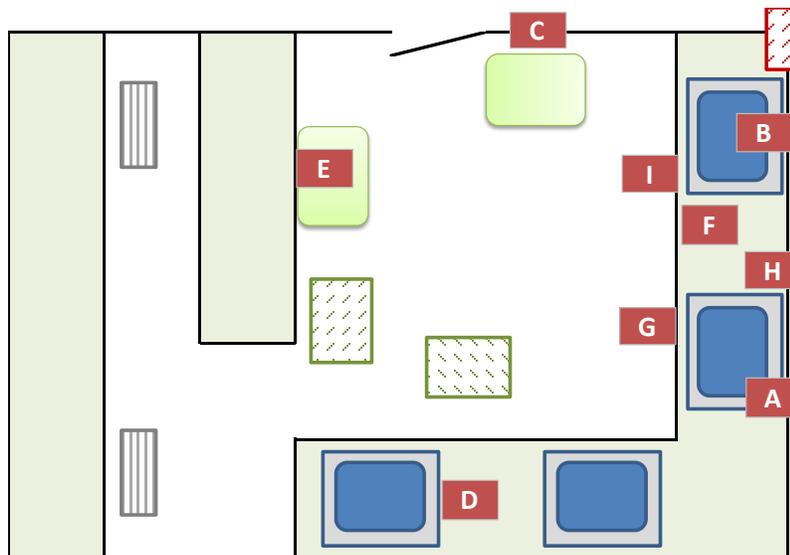


Figure 16 : Représentations schématiques des salles étudiées et des postes de prélèvements effectués à l'hôpital 4 : a) Salle de stérilisation, prélèvements côté souillé; b) Salle de prélavage.

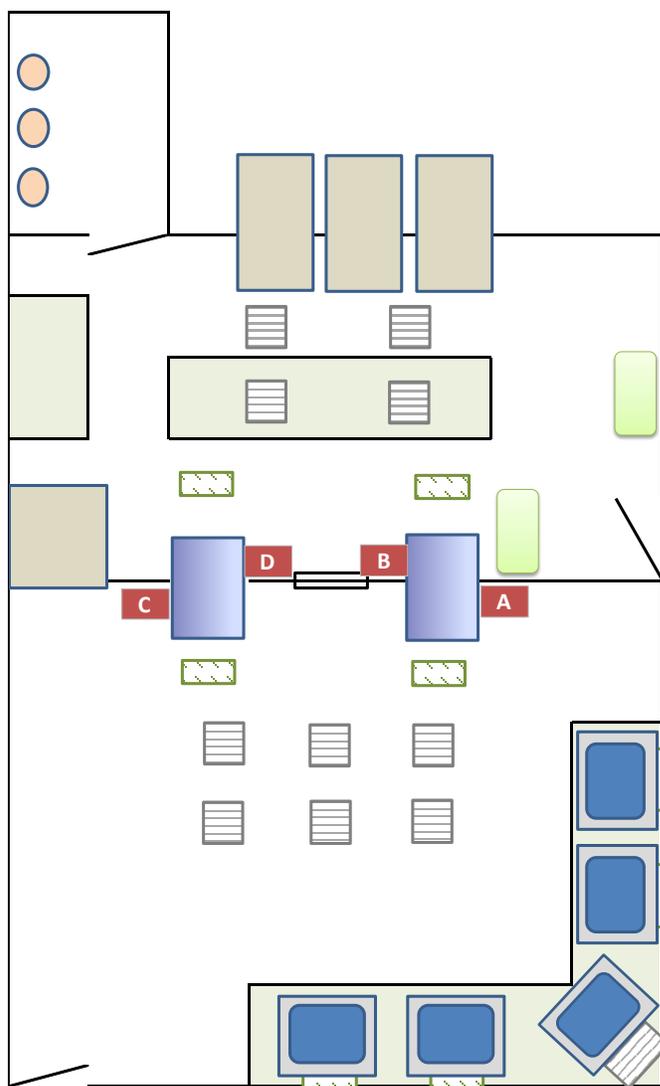


Figure 17 : Représentation schématique des salles étudiées et des postes de prélèvements effectués à l'hôpital 5 : Salle de stérilisation (côté souillé en bas et propre en haut).

Annexe B : Photos des salles lors des campagnes de prélèvements



Photo 2 : Emplacement des pompes de prélèvement près des laveurs automatiques.



Photo 3 : Emplacement des pompes de prélèvements près des éviers dans les salles de décontaminations et de retraitement des endoscopes (prénettoyage manuel).



Photo 4: Instruments provenant de la chirurgie qui sont lavés en salle de décontamination (prélavage).

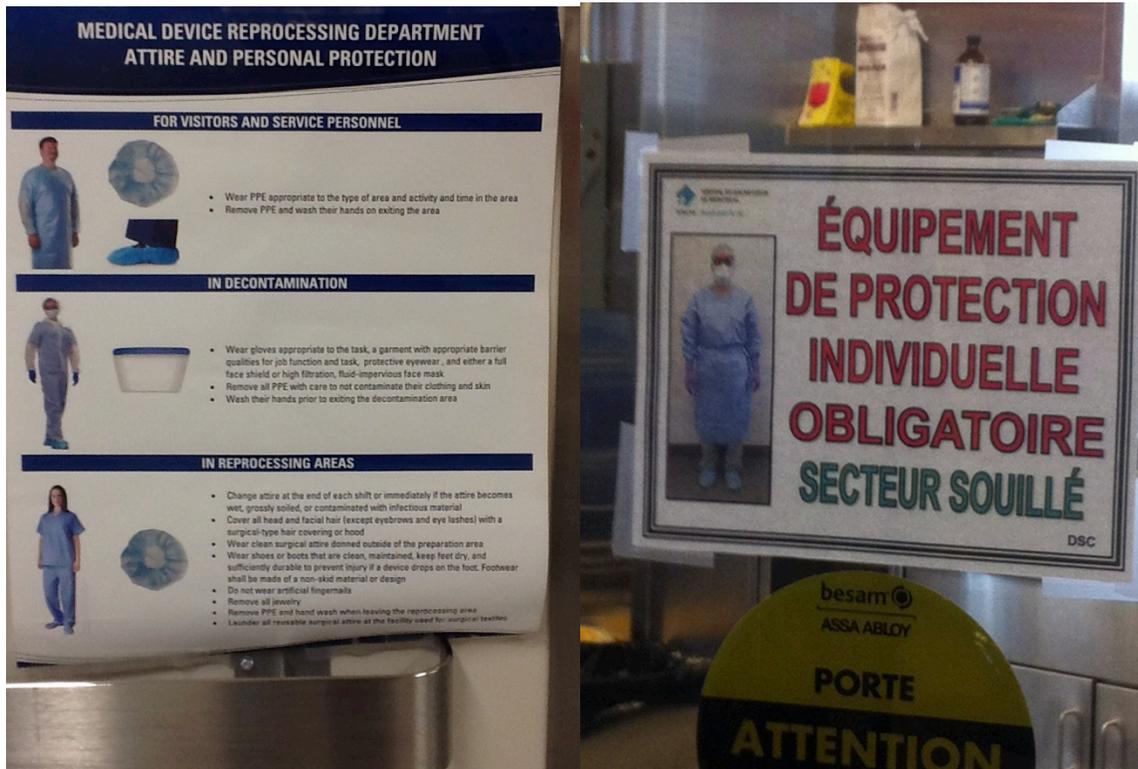


Photo 5 : Exemple d'affiche de recommandation pour la protection individuelle requise.



Photo 6 : Le port d'équipement de protection dans certaines unités.



Photo 7 : Espaces de rangement et système d'alimentation automatique pour les savons.