

Toxicité aiguë comparée du phénol et d'une série de chlorophénols sur des organismes aquatiques et terrestres

Acute comparative toxicity of phenol and some chlorophenols on aquatic and terrestrial organisms

N. IOUNES, M. GUERBET^{*}, J.-M. JOUANY, J. HAMEL

Reçu le 16 juillet 1999, accepté le 20 avril 2000^{**}.

SUMMARY

Chlorophenols are chemical compounds frequently used for many industrial applications and are subsequently often found in the environment. The aim of this study was firstly to compare the acute toxicities of phenol and five chlorinated compounds towards three organisms: a freshwater protozoan, *Colpidium campylum*; a terrestrial plant species, *Vicia lens*; and a mammalian mouse. Our experimental results have been compared with literature data for nine other environmental species.

With the exception of mammals, for which 2,4-dichlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol are less dangerous, it appears that toxicity is strictly related to the chlorine substitution level of the phenolic nucleus: the higher the number of chlorine atoms, the more toxic effect is the compound. On the other hand, this study shows that ten species, from the twelve observed, have a similar toxicological response to chlorophenols; only the rat and the mouse have a different sensitivity. However, pentachlorophenol is always the most dangerous compound.

Key-words: *phenol, chlorophenol, acute toxicity.*

RÉSUMÉ

Les chlorophénols sont des composés chimiques couramment utilisés dans de nombreuses applications industrielles et donc retrouvés dans l'environnement.

L'objectif de ce travail est d'abord de comparer la toxicité aiguë du phénol et de cinq dérivés chlorés vis-à-vis de trois organismes : un protozoaire d'eau

UER Médecine Pharmacie, Laboratoire de toxicologie, 22 boulevard Gambetta, 76183 Rouen cedex, France.

* Correspondance.

** Les commentaires seront reçus jusqu'au 15 mai 2001.

douce *Colpidium campylum*, un végétal terrestre *Vicia lens* et un mammifère, la souris. Afin d'avoir une comparaison plus large, nos résultats expérimentaux ont été confrontés avec des données relevées dans la littérature sur neuf autres espèces de l'environnement.

À l'exception des mammifères pour lesquels le 2,4 dichlorophénol et le 2,4,6 trichlorophénol sont les moins dangereux, il apparaît que la toxicité est étroitement liée avec le degré de substitution en chlore du noyau phénolique. Plus le nombre d'atomes de chlore est élevé, plus la toxicité est importante.

Cette étude montre d'autre part que dix organismes, parmi les douze étudiés, répondent de façon semblable vis-à-vis des chlorophénols. Seuls le rat et la souris présentent une sensibilité différente. Cependant, le pentachlorophénol s'avère être le composé le plus dangereux dans tous les cas.

Mots-clés : phénol, chlorophénols, toxicité aiguë.

1 – INTRODUCTION

Les chlorophénols sont des composés chimiques dont la présence, souvent constatée dans l'environnement, est liée à des utilisations dans des domaines industriels très variés. Ce sont également des molécules susceptibles d'apparaître secondairement au traitement de chloration des eaux usées industrielles dans lesquelles sont fréquemment retrouvés des phénols (BELTRAME *et al.*, 1984).

La contamination des milieux naturels par les chlorophénols justifie les nombreux travaux scientifiques consacrés à l'étude de la toxicité et de l'éco-toxicité de ces molécules. Pour notre part, nous nous sommes attachés à évaluer l'impact toxique de ces composés sur des organismes vivants pour lesquels les données relevées dans la littérature sont inexistantes ou incomplètes.

La toxicité aiguë du phénol et de cinq isomères de chlorophénols a été déterminée à l'aide de trois bioessais mettant respectivement en œuvre une espèce aquatique d'eau douce (protozoaire), une espèce végétale terrestre (lentille) et un mammifère terrestre (souris).

Les résultats de cette étude ont été ensuite comparés aux données relevées dans la littérature.

2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les produits étudiés sont le phénol (P) et cinq isomères de chlorophénols : 4 monochlorophénol (4 MCP) ; 2,4 dichlorophénol (2,4 DCP) ; 2,4,6 trichlorophénol (2,4,6 TCP) ; 2,3,5,6 tétrachlorophénol (2,3,5,6 TCP) ; pentachlorophénol (PCP). Tous ces produits sont d'origine OSI®, à l'exception du 2,3,5,6 TCP fourni par Jansen®, et présentent une pureté analytique supérieure à 98 %.

Le bioessai protozoaire est pratiqué selon la méthode décrite par DIVE *et al.* (1989). Il utilise *Colpidium campylum*, un protozoaire cilié d'eau douce, que l'on soumet à un milieu contenant le toxique étudié. Après une préculture de 24 heures par incubation à 28 °C et à l'obscurité, on fixe et on dénombre la population obtenue au moyen d'un compteur de particules Coulter counter® type ZB. Par référence à une culture témoin, on détermine la concentration de toxique qui provoque une inhibition de 50 % de la croissance des protozoaires (CI50 %).

Le phénol et le 4 monochlorophénol sont directement dilués dans l'eau de culture des protozoaires. Pour les autres chlorophénols qui présentent une faible hydrosolubilité, nous utilisons le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme tiers solvant à la concentration de 0,2 % dans le milieu de culture sans effet sur la croissance du protozoaire.

La toxicité sur la lentille terrestre *Vicia lens* est évaluée selon le protocole décrit par JOUANY *et al.* (1984). L'essai consiste à déterminer la concentration de toxique provoquant une inhibition de 50 % (CI50) de la croissance de la lentille terrestre par rapport à un témoin. La culture s'effectue dans des tubes à hémolyse en verre dans lesquels sont répartis unitairement des graines de lentille préalablement triées et dont la masse initiale est comprise entre 24 et 27 grammes.

Les lentilles sont cultivées sur un coton imprégné de 0,5 ml de la solution aqueuse du toxique étudié. Elles sont exposées à une lumière de $1\ 600 \pm 100$ lux avec une photopériode 16/8 et à une température thermostatée comprise entre 20 et 22 °C. La lecture de l'essai est pratiquée après 7 jours en mesurant les germinations et les comparant avec une série témoin cultivée sur eau pure.

Le phénol et le 4 monochlorophénol sont directement dilués dans l'eau tandis que les autres chlorophénols nécessitent l'utilisation d'un tiers solvant. Le DMSO ayant un effet néfaste sur la lentille, l'acétone a été utilisée à une concentration finale de 0,7 % sans effet sur la germination et la croissance.

La toxicité aiguë du phénol et des chlorophénols est mesurée sur la souris Swiss mâle d'un poids compris entre 20 et 25 grammes. Les animaux sont placés dans une animalerie régulée à une température de 21 °C avec une photopériode 12/12. La voie d'administration des produits est la voie orale. Les produits sont dispersés dans de l'huile d'olive pure et administrés aux animaux par gavage à l'aide d'une sonde gastrique, à raison de 0,5 ml de chaque dilution par souris. Après administration, les animaux sont observés pendant une période de 2 semaines au cours desquelles le dénombrement des individus morts pour chaque dose permet de déterminer la dose de toxique provoquant la mort de 50 % des animaux (DL50).

3 – RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de notre étude expérimentale de la toxicité du phénol et de 5 chlorophénols vis-à-vis du protozoaire *Colpidium campylum*, de la lentille *Vicia lens* et de la souris sont portés graphiquement sur la figure 1.

On constate tout d'abord des différences très marquées de toxicité des chlorophénols envers les trois organismes étudiés. Pour les critères observés,

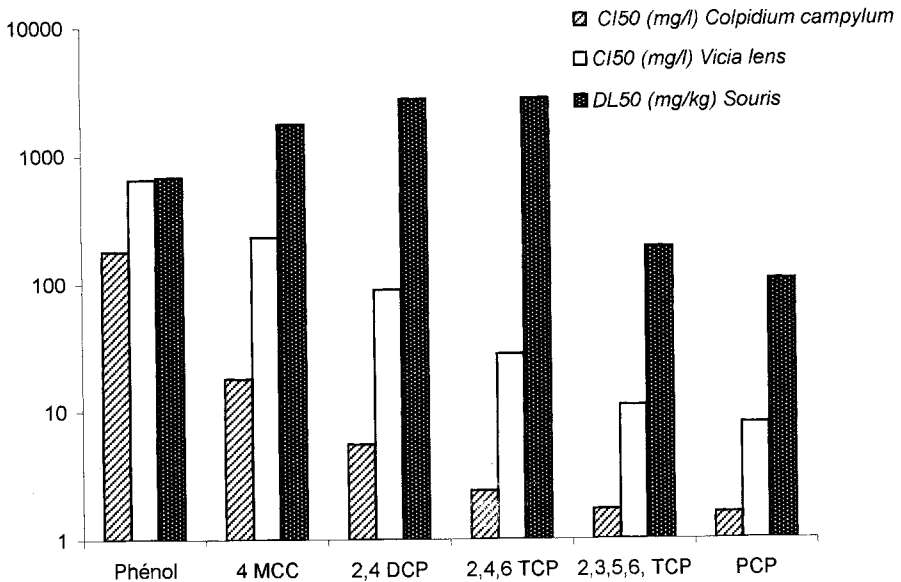


Figure 1 Toxicité du phénol et de 5 chlorophénols sur 3 organismes.
Toxicity of phenol and 5 chlorophenols on 3 organisms.

le protozoaire s'avère nettement plus sensible aux chlorophénols que la lentille terrestre elle-même plus sensible que la souris. Les CI50 des 6 composés pour *Colpidium campyllum* et *Vicia lens* sont comprises dans des rapports variant entre 3,6 et 16 fois. Les valeurs de DL50 sur la souris sont dans une gamme de concentrations 8 à 99 fois plus élevée que pour la lentille terrestre qui est elle-même moins sensible que le protozoaire. Le mammifère, en l'occurrence la souris dans notre étude, est donc l'animal de loin le moins sensible aux chlorophénols bien qu'il s'agisse d'une mesure de DL50 évaluée par gavage de l'animal, donc d'une dose effectivement absorbée par la souris, et non pas d'une CI50 qui correspond à une concentration dans le milieu de culture où sont placés les protozoaires et lentilles terrestres.

Il faut d'autre part noter que si les gammes de concentrations toxiques sont sensiblement différentes, les réponses observées sont tout à fait comparables entre le protozoaire et la lentille. Chez le protozoaire *Colpidium campyllum* et la lentille *Vicia lens*, la toxicité augmente régulièrement avec le degré de substitution en chlore du noyau phénolique. Le niveau de corrélation entre les CI50 définies pour ces deux organismes est très élevé ($r = 0,968$ $p < 1\%$).

À l'opposé, la réponse toxicologique de la souris est tout à fait différente. Le plus grand degré de chloration du noyau phénolique ne s'accompagne pas d'une augmentation de la toxicité de la molécule vis-à-vis de la souris comme cela est constaté avec les autres organisme étudiés. Chez la souris, le mono (4 MCP) et plus encore le di (2,4 DCP) et le trichlorophénol (2,4,6 TCP) présentent une toxicité moins élevée que le phénol. C'est pourquoi, en plus d'une échelle de sensibilité nettement différente, les résultats toxicologiques sur la

Tableau 1 Données toxicologiques comparatives du phénol et de 5 chlorophénols (les résultats sont exprimés en CI50 ou CE50 mg/l de milieu à l'exception du rat et de la souris pour lesquels il s'agit de DL50 mg/kg corporel).

Comparative toxicological data for phenol and five chlorophenols (results noted are IC50 or EC50 values, expressed in mg/l medium, except for the rat and the mouse for which results are given as LD50 values, in mg/kg body).

	Phénol	4 MCC	2,4 DCP	2,4,6 TCP	2,3,5,6, TCP	PCP	Références
<i>Colpidium campylum</i>	178,3	18,1	5,6	2,4	1,7	1,6	nous-mêmes
<i>Vicia lens</i>	650,0	230,0	90,0	28,0	11,0	8,0	nous-mêmes
<i>Lemna minor</i>	1504,0	281,6	58,3	5,9	0,6	0,2	BLACKMAN G.E. <i>et al.</i> (1955)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	253,9	36,7	15,0	4,0	1,4	0,3	SCHULTZ T.W. et RIGGIN G.W. (1985)
<i>Photobacterium phosphorum</i>	35,7	8,3	5,5	7,7	2,2	0,5	RIBO J.M. et KAISER K.L. (1982)
<i>Bacillus species</i>	2300,0	400,0	75,0	240,0	54,0	9,0	LIU D. <i>et al.</i> (1982)
Boues activées	85,8	71,0	47,6	42,0	44,3	23,3	BELTRAME P. <i>et al.</i> (1984)
<i>Daphnia magna</i>	37,2	8,1	2,7	5,5	2,3	0,8	DEVILLERS J. et CHAMBON P. (1986)
<i>Brachydanio rerio</i>	76,7	8,7	4,7	1,9	3,6	0,8	DEVILLERS J. et CHAMBON P. (1986)
<i>Poecilia reticulata</i>	35,2	1,2	2,9	0,5	3,6	0,04	BENOIT-GUYOD J.L. <i>et al.</i> (1984)
Souris	675,0	1 757,0	2 757,0	2 773,0	190,0	106,0	nous-mêmes
Rat	250,0	281,0	430,0	276,0	130,0	56,0	FARQUHARSON M.E. <i>et al.</i> (1958)

souris et les deux autres organismes, protozoaire et lentille terrestre, ne sont absolument pas corrélés entre eux.

Cette étude expérimentale montre des différences très nettes de sensibilité aux chlorophénols des espèces vivantes. Nous avons donc voulu vérifier cette observation en analysant les données toxicologiques de ces six composés relevés dans la littérature et en les comparant avec nos propres observations. C'est ainsi que nous avons comparé la toxicité du phénol et des 5 chlorophénols vis-à-vis de 12 organismes vivants représentatifs de la faune et de la flore (tableau 1).

On constate tout d'abord que les huit organismes aquatiques (*Colpidium campidium*, *Tetrahymena pyriformis*, *Photobacterium phosphorum*, *Bacillus species*, boues activées, *Daphnia magna*, *Brachydanio rerio*, *Poecilia reticulata*) et les deux représentants végétaux (*Vicia lens*, *Lemna minor*) sont très étroitement regroupés. Si les gammes de sensibilité de ces organismes sont sensiblement différentes, on observe pour toutes ces espèces une augmentation de la toxicité avec le degré de chloration du noyau phénolique. Le phénol se détache cependant très nettement des autres composés étudiés et apparaît comme le composé de loin le moins toxique.

Les mammifères, rat et souris, répondent très différemment des dix autres organismes pris en compte dans cette étude. Les résultats sur le rat et la souris sont très étroitement corrélés entre eux ($r = 0,86$ $p < 1 \%$) mais très différents de ceux relevés avec les dix autres organismes aquatiques et terrestres. Pour ces deux organismes, le dichlorophénol (4 MCC) et le trichlorophénol (2,4 DCP) s'avèrent moins toxiques que le phénol pur. Lorsque le nombre d'atomes de chlore atteint et dépasse 3, on constate alors comme précédemment une augmentation de l'effet toxique.

4 - CONCLUSION

De cette étude à la fois expérimentale et bibliographique, il ressort que les dérivés phénoliques fortement chlorés (2,4,6 TCP, 2,3,5,6 TCP, PCP) présentent une toxicité nettement plus élevée que le phénol pur. C'est le pentachlorophénol (PCP) qui s'avère être la molécule la plus toxique vis-à-vis des douze organismes terrestres et aquatiques pris en considération dans cette étude.

Il faut cependant noter la différence de réponse entre les mammifères (rat, souris) et les dix autres espèces vivantes. Pour tous les organismes, sauf mammifères, la toxicité s'accroît avec le degré de chloration du noyau phénolique. Pour le rat et la souris, ce sont les dérivés phénoliques di (2,4 DCP) et trichlorés (2,4,6 DCP) qui présentent la toxicité moindre. Cette différence de sensibilité confirme la nécessité de multiplier les essais toxicologiques et écotoxicologiques pour évaluer de façon satisfaisante le risque toxique d'une molécule pour la faune et la flore.

Sur un autre plan, il apparaît que les dix organismes terrestres et aquatiques pris en compte dans cette étude sont très étroitement liés entre eux. Les essais sur ces organismes, pourtant sensiblement différents les uns des autres,

sont donc redondants et n'apportent donc qu'un complément limité d'information. Cette étude démontre d'une part la nécessité bien connue de réaliser les essais en parallèle sur différentes espèces vivantes mais d'autre part la difficulté majeure à choisir les espèces les plus représentatives si on veut s'assurer d'une évaluation réellement globale du risque écotoxicologique d'une série de composés chimiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BELTRAME P., BELTRAME P.L., CARNITI P., 1984. Inhibition of chloro and nitrophenols on biodegradation of phenol: a structure toxicity relationship. *Chemosphere*, 13, 3-9.
- BENOIT-GUYOD J.L., ANDRE C., CLAVEL K., 1984. Chlorophénols : dégradation et toxicité. *J. Fran. Hydro.*, 17, 149-163.
- BLACKMAN G.E., PARKE M.H., GARTON.G., 1955. The physiological activity of substituted phenols. Relationships between chemical structure and physiological activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 54, 45-54.
- DEVILLERS J., CHAMBON P., 1986. Toxicité aiguë des chlorophénols sur *Daphnia magna* et *Brachydanio rerio*. *J. Fran. Hydro.*, 17, 111-120.
- DIVE D., ROBERT S., ANGRAND E., BEL C., BONNEMAIN H., BRUN L., DEMARQUE Y., DE DU A., ELBOUHOUTI R., FOURMAUX M.N., GUERY L., HANSSSENS O., MURAT M., 1989. A bioassay using the measurement of the growth inhibition of a ciliate protozoan : *Colpidium campylum*. *Hydrobiologia*, 188/198, 181-188.
- FARQUHARSON M.E., GAGE J.C., NOTHOVER J., 1958. The biological action of chlorophenols. *Brit. J. Pharmacol.*, 13, 20-24.
- JOUANY J.M., RIVALAIN-AUBER C., SAVALE J.F., GUERBET M., VASSEUR P., 1984. Essai simplifié d'écotoxicologie à deux niveaux, végétal et mammifère. *Comptes rendus symp. int. sur l'écotoxicologie terrestre*, SEFA, Les Arcs, 579-586.
- LIU D., THOMSON K., KAISER K.L., 1982. Quantitative structure toxicity relationships of halogenated phenols on bacteria. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29, 130-136.
- RIBO J.M., KAISER K.L., 1982. Effect of selected chemicals to photoluminescent bacteria and their correlations with acute sublethal effects on others organisms. *Chemosphere*, 12, 1421-1442.
- SCHULTZ T.W., RIGGIN G.W., 1985. Predictive correlations for the toxicity of alkyl and halogen substituted phenols. *Toxicol. Letters*, 25, 47-54.