

Article original / Original article

Origine muscarinique centrale des effets ventilatoires du dichlorvos à dose toxique chez le rat[★]

Ventilatory effects of toxic dose of dichlorvos results from central muscarinic effects

Pascal Houzé^{1,2,★★}, Alexandra David¹, Chantal Martin³, Frédéric J. Baud^{1,2}

¹ Laboratoire de Chimie et Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 75006 Paris, France

² Laboratoire de Biochimie & Réanimation Médicale et Toxicologique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe hospitalier Lariboisière-Saint Louis, Université Paris Diderot, 75010 Paris, France

³ Animalerie Centrale, Faculté de Pharmacie, 75006 Paris, France

Résumé – Objectif : Les organophosphorés sont fréquemment impliqués dans des intoxications chez l'homme. Leur toxicité se manifeste essentiellement sur le plan respiratoire. Des articles récents ont montré que la gravité de l'intoxication est dépendante de l'organophosphoré. Le but de ce travail est de comparer les effets ventilatoire du dichlorvos à ceux du diéthylparaoxon et de préciser leur origine. **Méthodes :** Les rats males Sprague-Dawley ($n = 6$) ont reçu en sous-cutanée le dichlorvos à la dose de 5,76 mg/kg. Au maximum des effets ventilatoires, les animaux ont reçu par voie intramusculaire 10 mg/kg d'atropine base ou une dose équimolaire de 5,42 mg/kg, méthylatropine base. Les effets ventilatoires sont mesurés par pléthysmographie corps entier chez l'animal vigile et la température centrale par télémetrie infrarouge. **Résultats :** Le dichlorvos induit rapidement des signes cliniques, une hypothermie maximale à 60 min, une baisse significative de la fréquence respiratoire résultant d'une augmentation du temps expiratoire et à une augmentation non significative du volume courant. Ces effets sont maximaux 5 min après l'injection et spontanément réversibles en 60 min. L'atropine corrige partiellement l'hypothermie, totalement les effets ventilatoires. La méthylatropine est sans effet sur le plan clinique, majore l'hypothermie et certains effets ventilatoires. **Conclusion :** Les effets ventilatoire induits par le dichlorvos sont comparables à ceux rapportés pour le diéthylparaoxon. Ils en diffèrent par des cinétiques d'apparition et de correction très rapides. L'atropine permet une correction complète de ces effets. L'inefficacité de la méthylatropine prouve que les effets ventilatoires ont une origine muscarinique purement centrale.

Mots clés : Dichlorvos, rat, effets ventilatoires, atropine, méthylatropine

Abstract – Objectives: Organophosphate (OP) insecticides are frequently involved in human poisonings. One major target is the respiratory system. A recent prospective study confirmed the severity and time-course of OP poisonings depend on the compound. The aim of this study was to assess the resting ventilation in rats poisoned with dichlorvos and to compare the effects to those induced by diethylparaoxon and to assess the central or peripheral origin of respiratory toxicity. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats ($n = 6$) were poisoned with dichlorvos administered subcutaneously at 5.76 mg/kg. At the maximum of respiratory effects, an equimolar dose of either 10 mg/kg, base atropine or 5.42 mg/kg, base méthylatropine was administered intramuscularly. Respiratory effects were assessed using whole body plethysmography in unrestrained animals and core temperatures using infra-red telemetry. **Results:** Dichlorvos induced symptoms of OP poisoning within 5 min, maximum hypothermia at 60 min, an increase in expiratory time, a decrease in respiratory rate, and a non significant increase in tidal volume. The maximum of effects occurred 5 min after dichlorvos injection and spontaneously reversed within 60 min. Atropine partially reversed hypothermia and completely respiratory toxicity. Méthylatropine was without any significant effects and significantly worsened hypothermia and transiently the expiratory time and the tidal volume. **Conclusion:** Alterations of ventilation at rest induced dichlorvos

* Une partie des résultats de ce travail a été présentée en communication orale au congrès de la Society of Toxicology, Baltimore, 2009, numéro d'abstract : 1391.

** Correspondance : Pascal Houzé, pascal.houze@sls.aphp.fr

and diethylparaoxon are similar. In contrast with diethylparaoxon, dichlorvos induced the rapid onset of short-lasting respiratory toxicity. Atropine completely reversed dichlorvos-induced respiratory toxicity while an equimolar dose of methylatropine was devoid of any effects evidencing the central muscarinic origin of respiratory toxicity.

Key words: Dichlorvos, rat, ventilatory effects, atropine, methylatropine

Reçu le 12 avril 2011, accepté après modifications le 24 mai 2011

Publication en ligne le 7 juillet 2011

1 Introduction

Les organophosphorés sont quotidiennement employés à travers le monde comme pesticides. Leur utilisation massive pose un important problème de santé publique, en raison de très nombreux cas d'intoxications, volontaires ou non, en particulier dans les pays en voie de développement [1]. D'après l'OMS, les pesticides seraient responsables annuellement de plus de 3 millions de cas d'intoxications avec une mortalité comprise entre 8 et 15 % selon les régions du monde et la qualité de leur infrastructure sanitaire [2].

Les organophosphorés sont de puissants inhibiteurs des cholinestérases qui induisent une accumulation d'acétylcholine au niveau de la fente synaptique [3]. Cette accumulation est à l'origine des syndromes muscarinique (sudation, hypersalivation, myosis, défécation et miction incontrôlées), nicotinique (fasciculations, tremblements) et central (apnée, coma) qui sont observés lors de l'intoxication par ces composés [2]. Le système respiratoire est une des cibles principales des organophosphorés. La défaillance respiratoire est la première cause de mortalité rapportée lors des intoxications par ces composés [4-6]. Malgré de nombreuses études, le mécanisme d'action de ces toxiques n'est pas complètement élucidé. Plusieurs hypothèses restent évoquées, en particuliers sur l'origine périphérique et/ou centrale de ces effets. Au niveau périphérique, l'hyperactivation des récepteurs muscariniques est responsable du bronchospasme et de la bronchorrhée. La paralysie des muscles inspiratoires (diaphragme et des muscles intercostaux) est liée à la stimulation permanente des récepteurs nicotiniques [7-12].

Pour étudier les mécanismes de la toxicité respiratoire, nous avons développé un modèle d'intoxication chez le rat par une dose toxique mais non létale de diéthylparaoxon (PO) (50 % de la DL_{50}) injectée par voie sous cutanée. Les effets de cette dose sur la ventilation ont été étudiés par pléthysmographie corps entier chez l'animal vigile. Elle induit une baisse de la fréquence respiratoire associée à un allongement du temps expiratoire et une augmentation du volume courant. Les effets observés sont maximum 30 min après l'injection du PO, puis vont se maintenir en plateau pendant la durée totale de l'observation [13]. L'efficacité des antidotes (atropine et/ou pralidoxime), habituellement utilisés dans le traitement de ces intoxications, peut également être évaluée par notre modèle. Ainsi, l'atropine à forte dose (10 mg/kg par voie intramusculaire) permet une réversion complète et prolongée des effets du PO sur la ventilation alors que la méthylatropine à dose équimolaire ou supérieures à celle de l'atropine, reste sans effet [14].

Si le diéthylparaoxon reste un excellent modèle expérimental, les résultats ne doivent pas être généralisés aux autres organophosphorés. En effet, il est classiquement admis que

la toxicité respiratoire des insecticides organophosphorés est comparable chez tous les mammifères et quelque soit le composé aboutissant à un schéma thérapeutique standardisé [7,15], mais des articles récents sur des intoxications humaines ont clairement démontré que la gravité de l'intoxication est dépendante de l'organophosphoré impliqué [1, 6]. Il nous est donc paru important d'étudier les effets sur la ventilation de repos d'autres organophosphorés, en particuliers pour des produits fréquemment impliqués dans les intoxications chez l'homme. Parmi ces composés, figure le dichlorvos qui est très utilisé dans le Maghreb [16], en Turquie [17, 18], en Jordanie [19] et dans les pays d'Asie du Sud Est à l'exception du Sri-Lanka [20] à la fois comme insecticide agricole et comme insecticide ménager pour traiter les habitations [21, 22]. Il s'agit d'un composé hautement toxique, classifié Ib selon les critères de l'OMS [23]. Cette toxicité importante associée à sa fréquence d'utilisation font que le dichlorvos est fréquemment impliqué chez l'homme dans des intoxications, volontaires ou accidentelles [17, 20].

Le but de ce travail est d'étudier les effets d'une dose toxique mais non létale de dichlorvos sur la ventilation de repos chez le rat, de les comparer à ceux induits par une dose équipotente de diéthylparaoxon et d'étudier leur réversibilité afin d'en préciser l'origine muscarinique ou nicotinique et, dans le cas d'effet muscarinique prédominant ou exclusif, l'origine centrale ou périphérique des effets observés par l'atropine et la méthylatropine.

2 Matériel et méthodes

Toutes les expérimentations ont été réalisées dans le cadre des règles d'éthique applicables à l'expérimentation animale. Elles ont fait l'objet d'un protocole déposé au près du Comité d'Éthique Animale de la Faculté de Pharmacie de Paris et approuvé par celui-ci sous la référence P2.FB.056.08.

2.1 Animaux

Nous avons utilisés des rats mâles Sprague-Dawley (Souche OFA, Charles River Laboratoires, BP 0109, 69592 L'arbresle Cedex, France) de 250 à 350 g (8 à 12 semaines). Les animaux ont été livrés au minimum une semaine avant le jour de l'expérimentation et gardés à l'animalerie centrale dans des conditions de température et de luminosité adaptées, l'eau et la nourriture étant fournies *ad libitum*.

Les animaux survivants à l'expérimentation ont été euthanasiés par injection (1 mL, voie intra péritonéale) de pentobarbital sodique en surdosage (50 mg/kg).

2.2 Médicaments et produits chimiques

Le dichlorvos [diméthyle-(2-2-dichlorovinyl)-phosphate, DVPP] (CAS n° 62-73-7, pureté > 99 %) a été obtenu chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'ampoule (250 mg) a été diluée dans 500 µL de DMSO pour obtenir une solution mère à 500 mg/mL. Par une première dilution au 1/8 dans du chlorure de sodium isotonique, nous avons obtenu une solution à 62,5 mg/mL. Cette solution diluée au 1/14 nous a permis de préparer notre solution de travail à la concentration finale de 4,33 mg/mL. Cette solution a été utilisée pour injecter les animaux à la dose de 6,40 mg/kg (50 % de la DL₅₀) sous un volume compris entre 0,3 et 0,5 mL.

Toutes les solutions de dichlorvos ont été être conservées à l'abri de la lumière à +4 °C pendant un maximum d'un mois.

L'atropine sous forme de sulfate mono hydraté (CAS 5908-99-6) et la méthylatropine sous forme de nitrate (CAS 31610-87-4) ont été obtenues auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Pour l'atropine, une solution mère a été préparée dans du chlorure de sodium isotonique, à la concentration de 18 mg/mL en atropine base (conservation à +4 °C pendant un mois maximum). Une solution fille (10 mg/mL) a été préparée extemporanément dans du chlorure de sodium isotonique pour permettre d'injecter les animaux à la dose de 10 mg/kg.

Une solution de méthylatropine à 5,42 mg/mL en méthylatropine base (solution équimolaire à la solution d'atropine base 10 mg/mL) a été préparée extemporanément dans du chlorure de sodium isotonique.

2.3 Mesures de sécurité

Toutes les opérations, impliquant la manipulation de solutions de dichlorvos ont été réalisées sous hotte chimique, en utilisant une surblouse, des lunettes et des gants en nitrile. Une solution de carbonate molaire était disponible pour neutraliser immédiatement le dichlorvos en cas d'accident. Régulièrement, à la fin de chaque expérimentation, cette solution a été utilisée pour décontaminer le matériel et les surfaces de travail.

2.4 Méthodes

2.4.1 Détermination de la dose létale 50 (DL₅₀) du dichlorvos

Nous avons déterminé dans nos propres conditions la dose létale 50 du dichlorvos chez le rat naïf, sans implantation d'une sonde de télémétrie. De façon à réduire le nombre d'animaux nécessaires, nous avons utilisé, la méthode « *up-and-down* » proposée par Bruce [24, 25] et améliorée par Dixon [26].

2.4.2 Évaluation des signes cliniques

Les signes cliniques d'intoxication par le dichlorvos ont été notés durant la détermination de la DL₅₀ et les enregistrements de pléthysmographie. Les signes d'intoxication retenus, correspondant aux syndromes muscarinique, nicotinique

et central, sont ceux rapportés par De Candole *et al.* [7] : salivation, sudation, larmimation, miction, défécation involontaire, tremblements, paralysie, prostration et coma. L'intensité de ces signes a été évaluée de façon semi-quantitative : absence, faible, moyenne, intense.

2.4.3 Pléthysmographie corps entier chez l'animal vigile

Les paramètres de ventilation ont été enregistrés dans un pléthysmographe corps entier en utilisant la méthode barométrique, initialement décrite et validée chez le rat [27]. Les animaux sont placés dans une chambre de Plexiglas de 2,8 L, relié à une chambre de référence de même volume. De façon à minimiser, les effets des changements de pression dans la chambre expérimentale, les deux enceintes sont reliées par un tube de faible diamètre. La chambre de mesure contenant l'animal est balayée continuellement par de l'air humidifié (débit minimal 5 L/min). Lors des périodes d'enregistrement, l'entrée et la sortie d'air sont clampées de façon temporaire et les variations de pression consécutives à chaque respiration sont enregistrées grâce à un capteur de pression différentiel (Validyne MP, 45 ± 3 cm H₂O, Northridge, CA), intercalé entre les chambres. Au cours de chaque période d'enregistrement, une injection de 1 mL d'air (volume de calibration) est pratiquée dans la chambre de mesure et la température de cette chambre est relevée. Les spirogrammes sont enregistrés sur un ordinateur par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition de données (PCI-DAS1000, Dipsi, Chatillon, France). Ils sont ensuite analysés « offline » en utilisant le programme Elphy Software (CNRS-UNIC, Gif-sur-Yvette, France). Cette méthode a été journalièrement validée par un test de fuite. L'existence d'une fuite est affirmée par la décroissance du signal de plus de 33 % en 5 s [13]. Dans les conditions expérimentales de la présente étude, la limite de quantification des volumes est de 15 µL, correspondant à une limite de quantification de 50 µL. La mesure est linéaire ($r^2 = 0,9999$) sur la gamme des volumes testés (0,05 à 2 mL). La précision inter-séries (3 séries de 10 mesures réalisées le même jour) était de 1,5 ± 0,2%, et la précision intra-séries (3 séries de 10 mesures réalisées sur 10 jours différents) était de 3,0 ± 1,3%. Nous avons vérifié en utilisant un capnographe (Ohmeda 5250 RGM) que la valeur moyenne du CO₂ durant les périodes d'enregistrement, n'excédait pas 0,6 % du volume d'air contenu dans la chambre de mesure [13].

La température centrale des rats a été enregistrée par télémétrie infrarouge. Après anesthésie par un mélange kétamine/xylazine (70/10 mg/kg) administré par voie intrapéritonéale, la sonde de télémétrie (TA10TA-F20, Data Sciences International, USA) est insérée dans la cavité péritonéale de façon aseptique. Les parois abdominales sont suturées et la peau est refermée par des agrafes. Une période de récupération d'au moins 4 jours est respectée avant leur utilisation expérimentale [14].

Les paramètres suivants ont été mesurés ou calculés : chaque matin, la pression barométrique ; à chaque mesure, les températures de la chambre et de l'animal, le volume courant ou Tidal volume (V_T), le temps inspiratoire (T_I), le temps expiratoire (T_E), le temps respiratoire total ($T_{TOT} = T_I + T_E$), la fréquence respiratoire (f) et la ventilation minute ($V_E = V_T \times f$).

3 Protocoles opératoires

3.1 Étude 1 : Détermination de la DL₅₀ du dichlorvos

Environ 18 heures avant l'expérimentation, Les animaux ont été mis à jeuner tandis que leur était conservé un libre accès à l'eau de boisson. Le dichlorvos a été administré par voie sous-cutanée, puis chaque animal a été replacé dans des cages individuelles et surveillé régulièrement. L'enregistrement des signes cliniques a été réalisé avant l'injection, puis aux temps 30, 60, 90, 120, 180 min, 4, 6 et 24 h après l'injection, puis une fois par jour pendant 7 jours.

3.2 Étude 2 : Étude des effets du dichlorvos sur la ventilation de repos chez le rat

La ventilation de repos a été étudiée dans 2 groupes de 6 animaux. Le groupe témoin a reçu le solvant du dichlorvos (0,4 mL de chlorure de sodium isotonique, SC). Le groupe dichlorvos a reçu le dichlorvos à la dose de 45 % de La DL₅₀, déterminée dans l'étude précédente (5,76 mg/kg, SC, volume compris entre 0,3 et 0,5 mL). Le premier enregistrement pléthysmographique a été réalisé après une période d'acclimatation de 30 min au moins, de l'animal dans la chambre de mesure. Les valeurs de base des paramètres respiratoires ont été obtenues par trois enregistrements pratiqués avant l'injection des produits. L'animal a ensuite été sorti délicatement pour être injecté par voie sous cutanée puis replacé dans la chambre de mesure. Des enregistrements pléthysmographiques ont ensuite été réalisés toutes les 5 min pendant 30 min, puis toutes les 10 min pendant 1 h et enfin toutes les 30 min jusqu'à la fin de l'expérimentation (180 min). À chaque temps, les signes cliniques ont été enregistrés.

3.3 Étude 3 : Réversion des effets ventilatoires du dichlorvos par des doses équimolaires d'atropine ou de méthylatropine

La ventilation de repos a été étudiée dans 4 groupes de 6 animaux. Le groupe témoin a reçu le solvant du dichlorvos (0,4 mL de chlorure de sodium isotonique, SC), suivi par celui de l'atropine ou de la méthylatropine (0,4 mL de chlorure de sodium isotonique, SC). Le groupe dichlorvos a reçu le dichlorvos à la dose de 45 % de La DL₅₀ (5,76 mg/kg, SC, volume compris entre 0,3 et 0,5 mL), suivi par le solvant de l'atropine ou de la méthylatropine. Les groupes atropine et méthylatropine ont reçu le dichlorvos suivi par atropine (10 mg/kg base, IM) ou la méthylatropine (5,42 mg/kg base, IM) en dose équimoléculaire, au moment des effets ventilatoires maximaux du dichlorvos, soit 5 min après son injection. Ce temps a été déterminé lors de l'étude 2. Le premier enregistrement pléthysmographique a été réalisée après une période d'acclimatation de 30 min au moins de l'animal dans la chambre de mesure. Les valeurs de base des paramètres respiratoires ont été obtenues par trois enregistrements pratiqués avant l'injection des produits. L'animal a ensuite été sorti délicatement pour l'injection sous cutanée du dichlorvos puis replacé dans la chambre

de mesure. Après 5 min, un premier enregistrement a été effectué. L'animal a été sorti à nouveau délicatement de l'enceinte pour recevoir l'injection de l'antidote. Des enregistrements pléthysmographiques ont ensuite été réalisés toutes les 5 min pendant 30 min, puis toutes les 10 min pendant 1 h et enfin toutes les 30 min jusqu'à la fin de l'expérimentation (180 min). À chaque temps, les signes cliniques sont enregistrés.

4 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM (erreur standard sur la moyenne).

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (temps et traitement), pour mesure répétées. Pour chaque paramètre, s'il existait une interférence significative temps-traitement ($p < 0,05$), l'analyse de variance a été suivie par un test de comparaison multiple de Bonferroni, avec un risque global fixé à $p < 0,05$.

Pour l'étude des effets ventilatoires du dichlorvos, le groupe de référence choisi pour les comparaisons multiples est le groupe témoin.

Pour l'étude des effets de l'atropine/méthylatropine, la question était de savoir si ces traitements étaient capables de normaliser les effets ventilatoires induits par le dichlorvos. Dans ces conditions, le groupe de référence pour la comparaison multiple a été le groupe dichlorvos [14].

Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism (v 5.0, San Diégo, Californie).

5 Résultats

5.1 Étude 1 : Détermination de la DL₅₀ du dichlorvos

En utilisant la méthode « up-down », nous avons retrouvé une valeur médiane de la DL₅₀ (MDL₅₀) à 12,8 mg/kg après administration par voie sous-cutanée chez le rat (figure 1). Les signes cliniques observés apparaissent très rapidement chez l'animal intoxiqué, dès l'injection du produit. Ils sont à leur maximum au bout de 30 min et disparaissent complètement, chez les animaux survivants, à la 90ème minute après l'injection. Les principaux signes cliniques observés ont été des tremblements et une prostration et de façon moins constante une miction involontaire et une hypersalivation.

5.2 Étude 2 : Etude des effets du dichlorvos sur la ventilation de repos chez le rat

5.2.1 Choix de la dose

Le protocole initial prévoyait d'étudier les effets du dichlorvos sur la ventilation de repos chez le rat intoxiqué par une dose correspondant à 50 % de la DL₅₀ (6,40 mg/kg) afin de comparer les effets du dichlorvos à ceux d'autres pesticides étudiés par notre groupe à la même dose [13]. En utilisant

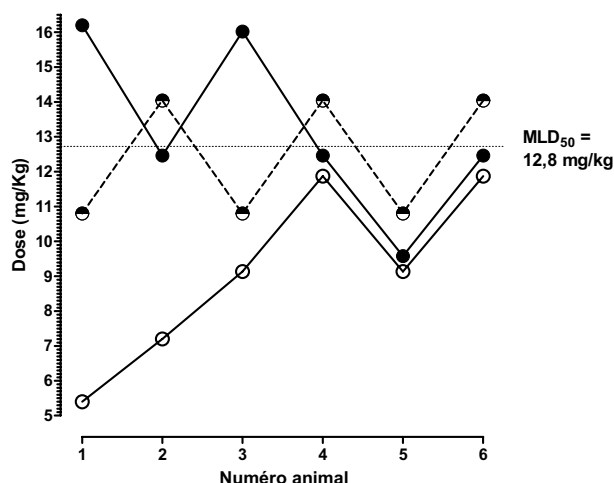


Fig. 1. Représentation de la détermination de la DL₅₀ par la méthode « up-and-down ». À partir de la DL₅₀ rapportée dans la littérature, 3 séries d’animaux ont été traités respectivement par 0,5 (série 1, cercle blanc), 1 (série 2, cercle blanc-noir) et 1,5 fois la DL₅₀ théorique (série 3, cercle noir). Si un animal survit, l’animal suivant de la même série reçoit la dose précédente augmentée d’un facteur 1,3. Inversement si l’animal meurt, l’animal suivant de la même série reçoit la dose précédente diminuée d’un facteur 1,3.

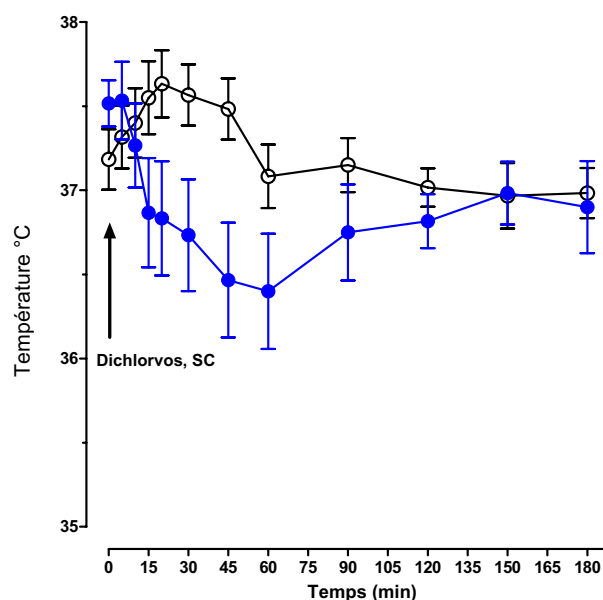


Fig. 2. Évolution de la température centrale au cours du temps chez les animaux témoins (cercle blanc) et chez les animaux traités par le dichlorvos (cercle bleu) à la dose de 45 % de la DL₅₀ (5,76 mg/kg, SC).

cette dose, nous avons observé une mortalité de 100 % dans les 15 min suivant l’injection. La conséquence a été la nécessité de réduire la dose injectée. La dose de 40 % de la DL₅₀ (5,12 mg/kg) testée sur 2 animaux n’entraînait, ni mortalité, ni signes patents d’intoxication. Nous avons donc choisi la dose de 45 % de la DL₅₀ (5,76 mg/kg) pour laquelle, nous avons pu observer les effets toxiques du dichlorvos avec une absence de mortalité.

5.2.2 Comparaison des valeurs de bases des différents paramètres

Il n’existait aucune différence significative de la température centrale et des paramètres respiratoires (f , T_{TOT} , T_I , T_E , V_T et V_E) entre les groupes témoin et traité par le dichlorvos.

5.2.3 Effets du dichlorvos

5.2.3.1 Données cliniques

En comparaison avec le groupe témoin, l’injection de dichlorvos (5,76 mg/kg) a induit des signes cliniques dès la 5^e minute avec un maximum entre $T + 10$ min et $T + 30$ min. Les principaux signes cliniques observés ont été la défécation, l’hypersalivation, miction, la sudation et les tremblements. Ces signes cliniques ont diminué partir de $T + 60$ min pour disparaître 90 min après l’injection du toxique.

La température des animaux intoxiqués par le dichlorvos a commencé à baisser 10 min après l’injection et a présenté un minimum à $T + 60$ min, ($37,0 \pm 0,2$ °C pour les témoins versus $36,4 \pm 0,4$ °C pour le groupe dichlorvos). Cependant,

les valeurs observées n’ont jamais été significativement différentes entre les animaux contrôles et ceux du groupe dichlorvos. À partir de $T + 90$ min, nous avons observé une correction partielle de l’hypothermie avec un retour à la normale à partir de $T + 150$ min. En fin d’expérimentation ($T + 180$ min), la température dans le groupe témoin n’était pas significativement différente de celle du groupe dichlorvos ($36,9 \pm 0,2$ versus $36,8 \pm 0,3$ °C, respectivement) (figure 2).

5.2.3.2 Pléthysmographie

Cinq minutes après l’injection du dichlorvos, comparativement au groupe contrôle, nous avons observé une augmentation significative du T_{TOT} ($0,49 \pm 0,02$ versus $0,66 \pm 0,03$ s, $p < 0,01$) et du T_E ($0,32 \pm 0,02$ versus $0,50 \pm 0,04$ s, $p < 0,01$). A ce même temps, la fréquence respiratoire décroît significativement chez les animaux intoxiqués par rapport aux animaux contrôles (124 ± 6 versus 91 ± 4 b/min, $p < 0,01$). Ces modifications de f , T_{Tot} et T_E vont rester significatives pendant les 15 premières minutes de l’intoxication (figure 3). À partir de $T + 20$ min, il n’y a plus de différence significative avec correction de tous ces paramètres à $T + 60$ min. Pour les autres paramètres ventilatoires (T_I , V_T et V_E), il n’y avait aucune différence significative entre les deux groupes durant la durée totale de l’observation (figure 4). La rapidité d’apparition et de réversibilité des effets du dichlorvos sur la ventilation chez le rat, explique que l’étude pléthysmographique ait été étudiée sur 60 min, alors que l’étude sur la température a été conduite sur 180 min afin de visualiser le retour à la normale de ce paramètre.

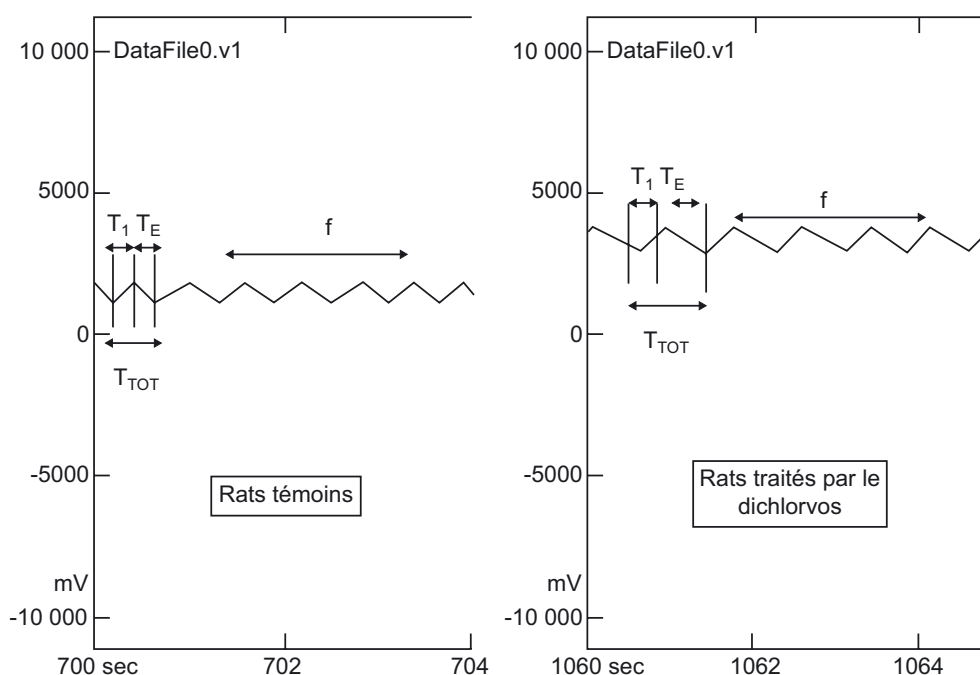


Fig. 3. Enregistrements pléthysmographiques obtenus chez un rat témoin (à gauche) et chez un rat traité par le dichlorvos (à droite) à la dose de 45 % de la DL₅₀ (5,76 mg/kg, SC).

5.3 Étude 3 : Réversion des effets ventilatoires du dichlorvos par des doses équimolaires d'atropine ou de méthylatropine

5.3.1 Valeurs de bases des différents paramètres

Il n'existait aucune différence significative de la température centrale et des paramètres respiratoires (f , T_{TOT} , T_I , T_E , V_T et V_E) entre les groupes témoin, traité par le dichlorvos et traité par les dichlorvos + atropine ou méthylatropine.

5.3.2 Effets de l'atropine et de la méthylatropine

5.3.2.1 Données cliniques

Les animaux intoxiqués par le dichlorvos et traités par atropine (10 mg/kg) au maximum de l'intoxication par le dichlorvos montrent des signes cliniques (défécation, tremblements, sudation et salivation) comparables en fréquence à ceux du groupe dichlorvos seul, jusqu'au temps 30 min, soit 25 min après l'injection intra musculaire d'atropine. Au temps $T + 30$ min, 50 % des animaux traités par l'atropine sont symptomatiques contre 80 % dans le groupe dichlorvos seul. À $T + 60$ min, les animaux traités par l'atropine sont totalement asymptotiques alors que 20 % des animaux du groupe dichlorvos présentes encore un symptôme d'intoxication, généralement une hypersudation. Pour tous les temps étudiés, les animaux du groupe dichlorvos + méthylatropine n'ont pas présenté d'amélioration de leurs symptômes par rapport aux animaux traités par le dichlorvos seul.

Comparé au groupe dichlorvos, l'injection d'atropine ou de méthylatropine s'accompagne d'une baisse de la température plus importante que le dichlorvos seul, non significative

pour l'atropine, mais qui le devient pour la méthylatropine (figure 5). Dans le cas de l'atropine, la baisse des températures va présenter un minimum à $T + 45$ min, suivi par une remontée régulière au cours de l'expérimentation pour arriver à des températures non significativement différentes de celles des témoins à la fin de l'expérimentation à 180 min (témoin : $36,9 \pm 0,2$ °C, dichlorvos : $36,8 \pm 0,3$ °C; dichlorvos + atropine : $37,0 \pm 0,4$ °C). Cependant, l'administration de l'atropine ne permet pas une correction plus rapide de la température des animaux traités par le dichlorvos. Pour la méthylatropine, la baisse de température va présenter un minimum à $T + 60$ min ($34,9 \pm 0,3$ °C dans le groupe dichlorvos + méthylatropine *versus* $36,4 \pm 0,3$ °C dans le groupe dichlorvos, $p < 0,01$). La température des animaux du groupe dichlorvos + méthylatropine va ensuite remonter lentement, en restant significativement plus basse que celle du groupe dichlorvos entre les temps 60 et 150 min et sans atteindre une normalisation en fin d'expérimentation (témoin : $36,9 \pm 0,2$ °C, dichlorvos : $36,8 \pm 0,3$ °C; dichlorvos + méthylatropine : $35,8 \pm 0,3$ °C) (figure 5).

5.3.2.2 Pléthysmographie

Comme pour l'étude des effets ventilatoires du dichlorvos, la réponse à l'atropine/méthylatropine a été étudiée sur une durée totale d'expérimentation de 60 min. Avant l'administration de ces composés au temps $T + 5$ min, les valeurs des différents paramètres de ventilation ne sont pas différents de ceux du groupe dichlorvos. Après administration de l'atropine (10 mg/kg), les valeurs de f , T_E et T_{TOT} vont se corriger rapidement pour devenir significativement différentes du groupe dichlorvos à $T + 15$ min ($p < 0,05$). À ce temps, les valeurs des paramètres sont non significativement différentes par rapport à celles du groupe témoin (figure 5). Du temps $T + 20$ min

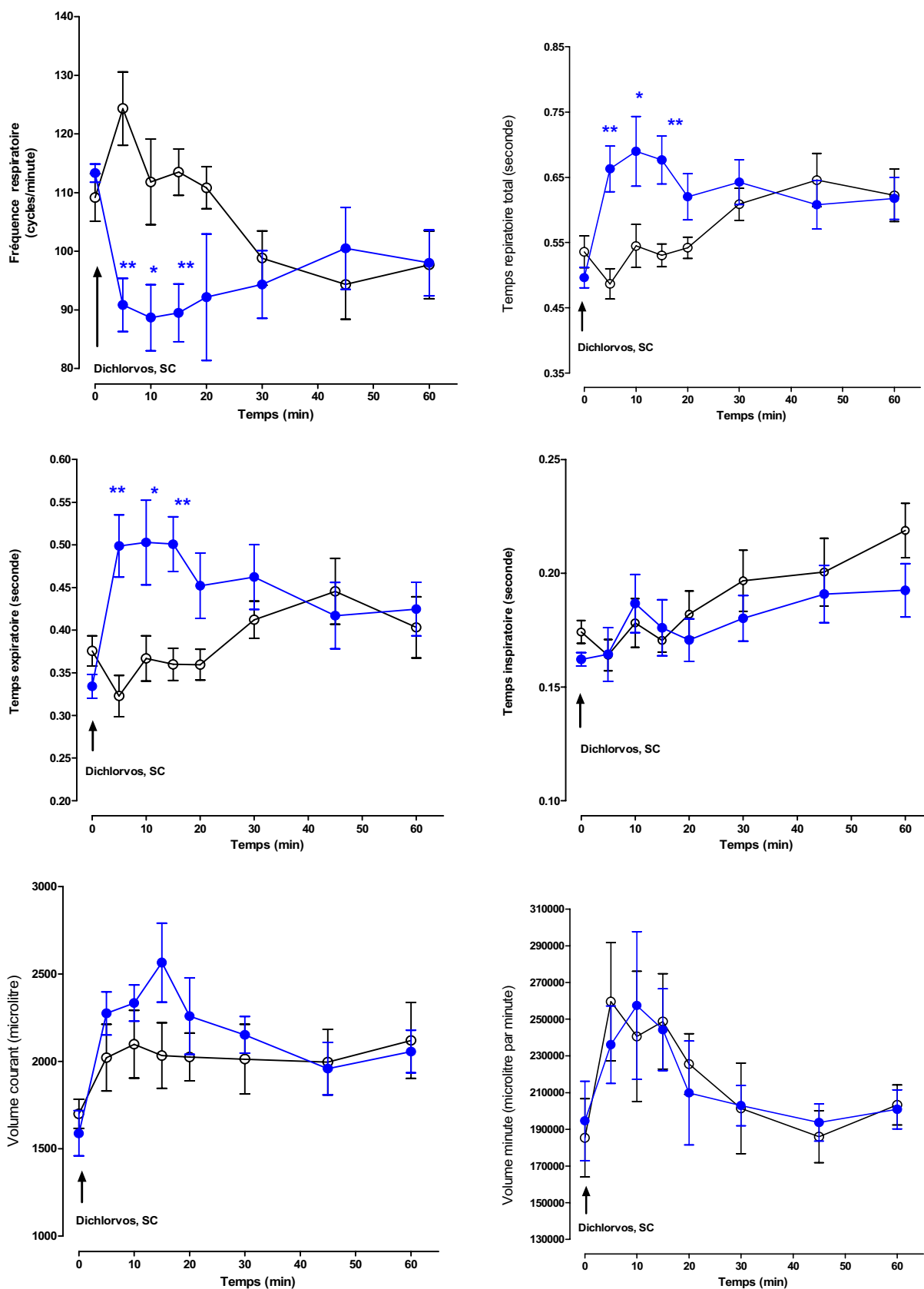


Fig. 4. Évolution des paramètres respiratoires (f , T_{TOT} , T_I , T_E , V_T , et V_E) au cours du temps chez les rats témoins (cercle blanc) et chez les rats traités par le dichlorvos (cercle bleu) à la dose de 45 % de la DL_{50} (5,76 mg/kg, SC).
 Signification statistique : * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ groupe dichlorvos *versus* groupe témoin.

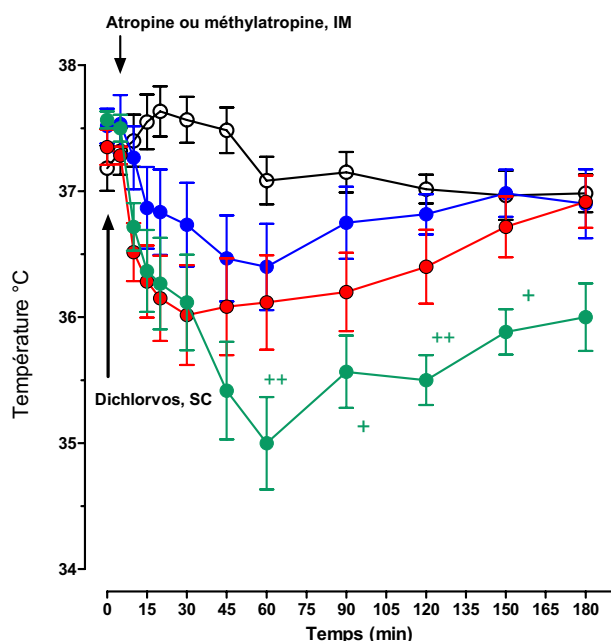


Fig. 5. Évolution de la température centrale au cours du temps chez les animaux témoins (cercle blanc), les animaux traités par le dichlorvos (cercle bleu) à la dose de 45 % de la DL₅₀ (5,76 mg/kg, SC) et les animaux recevant de l’atropine (cercle rouge) ou de la méthylatropine (cercle vert) à la dose de 10 et 5,42 mg/kg, respectivement. Signification statistique : + $p < 0,05$ et ++ $p < 0,01$ groupe dichlorvos + méthylatropine *versus* groupe dichlorvos.

à la fin de l’expérimentation, nous avons observé un effet propre de l’atropine caractérisé par une augmentation de la fréquence, une diminution du T_E et du T_{TOT} significativement différents des valeurs du groupe dichlorvos. Durant la même période, l’atropine induit également une diminution non significative du T_I et du V_T et reste sans effet sur le volume minute (figure 5).

L’injection intramusculaire de la méthylatropine à dose équimoléculaire (5,42 mg/kg) à celle de l’atropine ne corrige pas les effets sur la ventilation induits par le dichlorvos, mais au contraire majore les effets de ce toxique de façon non significative, à l’exception du temps $T + 10$ min pour le V_T (dichlorvos : $2333 \pm 103 \mu\text{L}$; dichlorvos + méthylatropine : $3563 \pm 380 \mu\text{L}$) et $T + 45$ min pour le T_E (dichlorvos : $0,42 \pm 0,04$ s; dichlorvos + méthylatropine : $0,57 \pm 0,04$ s) et le T_{TOT} (dichlorvos : $0,61 \pm 0,04$ s; dichlorvos + méthylatropine : $0,79 \pm 0,05$ s) (figure 6).

6 Discussion

De nombreuses études ont rapporté une altération des paramètres de la ventilation lors des intoxications par les organophosphorés [1, 4, 8, 13, 29–31], expliquant la mortalité par insuffisance respiratoire au cours de ces intoxications [1, 18, 31, 32]. Nous avons récemment publié un modèle d’intoxication par le diéthylparaoxon à faible dose (50 % de la DL₅₀) chez le rat montrant une baisse significative de f , un allongement significatif du T_{TOT} et du T_E , alors que le T_I n’est pas altéré [13, 14]. Une des principales limites de cette étude était de

ne pas pouvoir généraliser ces résultats à d’autres insecticides organophosphorés sans les avoir testés dans notre modèle.

Dans ce travail nous rapportons les effets ventilatoires induits chez l’animal vigile, par l’administration sous-cutanée de dichlorvos à 50 % de la DL₅₀ déterminée par la méthode « up-and-down ». Par cette méthode, nous avons trouvé une DL₅₀ comparable à celle rapportée dans la littérature [33]. Chez nos animaux laparotomisés pour poser la sonde de télémétrie, nous avons observé une mortalité de cent pour cent lors de l’administration de cette dose. Cette surmortalité, nous a contraints à réduire la dose à 45 % de la DL₅₀. Elle pourrait s’expliquer par un affaiblissement des animaux secondaire à la chirurgie et ceci malgré la période de récupération observée [14].

L’administration chez le rat mâle Sprague-Dawley de dichlorvos à dose létale ou toxique par différentes voies s’accompagne de signes d’intoxication (lacrimation, salivation, miction involontaire, tremblements et prostration) qui vont disparaître en moins d’1 heure chez les animaux survivants [34] alors que l’hypothermie peut persister jusqu’à 24 h chez les rongeurs intoxiqués par les organophosphorés [35]. Notre étude rapporte des signes cliniques et une hypothermie comparable à ceux décrits dans la littérature qui permettent de valider notre modèle d’intoxication, avec dans le cas du dichlorvos, une hypothermie qui va se corriger spontanément, contrairement à celle du diéthylparaoxon qui va persister [13].

Takahashi *et al.* ont également rapporté que la toxicité du dichlorvos est fonction de la voie d’administration, de la dose mais aussi de l’état de conscience de l’animal. Ainsi chez le rat anesthésié à l’uréthane, l’administration intra veineuse de dichlorvos à la dose de 10 mg/kg s’accompagne d’une baisse de la fréquence respiratoire suivie d’une apnée, alors que les mêmes signes sont observés chez l’animal conscient pour la dose de 2,5 mg/kg [34]. La différence de toxicité des organophosphorés entre animal éveillé et anesthésié avait déjà été souligné par Foutz *et al.* [36] dans le cas du diéthylparaoxon après injection intra cérébroventriculaire. En raison des résultats divergents sur la toxicité des OP chez l’animal anesthésié et chez l’animal éveillé, nous avons choisi d’étudier les effets du dichlorvos chez l’animal vigile. Notre étude pléthysmographique montre une baisse significative de la fréquence respiratoire (f) (–38 % par rapport aux témoins) consécutive à un allongement du temps expiratoire (T_E) (+47 % par rapport aux témoins) sans modification du temps inspiratoire (T_I). Concernant les volumes respiratoires, seule une augmentation non significative du volume courant (V_T) a pu être observée chez les animaux intoxiqués. Ces effets sur la ventilation de repos, que nous avons observés avec le dichlorvos sont comparables, qualitativement et quantitativement à ceux que nous avons décrits pour le diéthylparaoxon à une dose équipotente [13]. Cependant, ils en diffèrent sur le plan cinétique, en termes de maximum des effets et sur la durée de leur persistance. Cette différence d’évolution des effets ventilatoires entre les deux OP pourrait s’expliquer par les caractéristiques pharmacocinétiques du dichlorvos, en particulier par sa demi-vie plasmatique de l’ordre d’une dizaine de minutes après inhalation et par son absence d’accumulation tissulaire [37].

Les mécanismes de l’insuffisance respiratoire induit par les organophosphorés n’ont pas encore été complètement éluci-

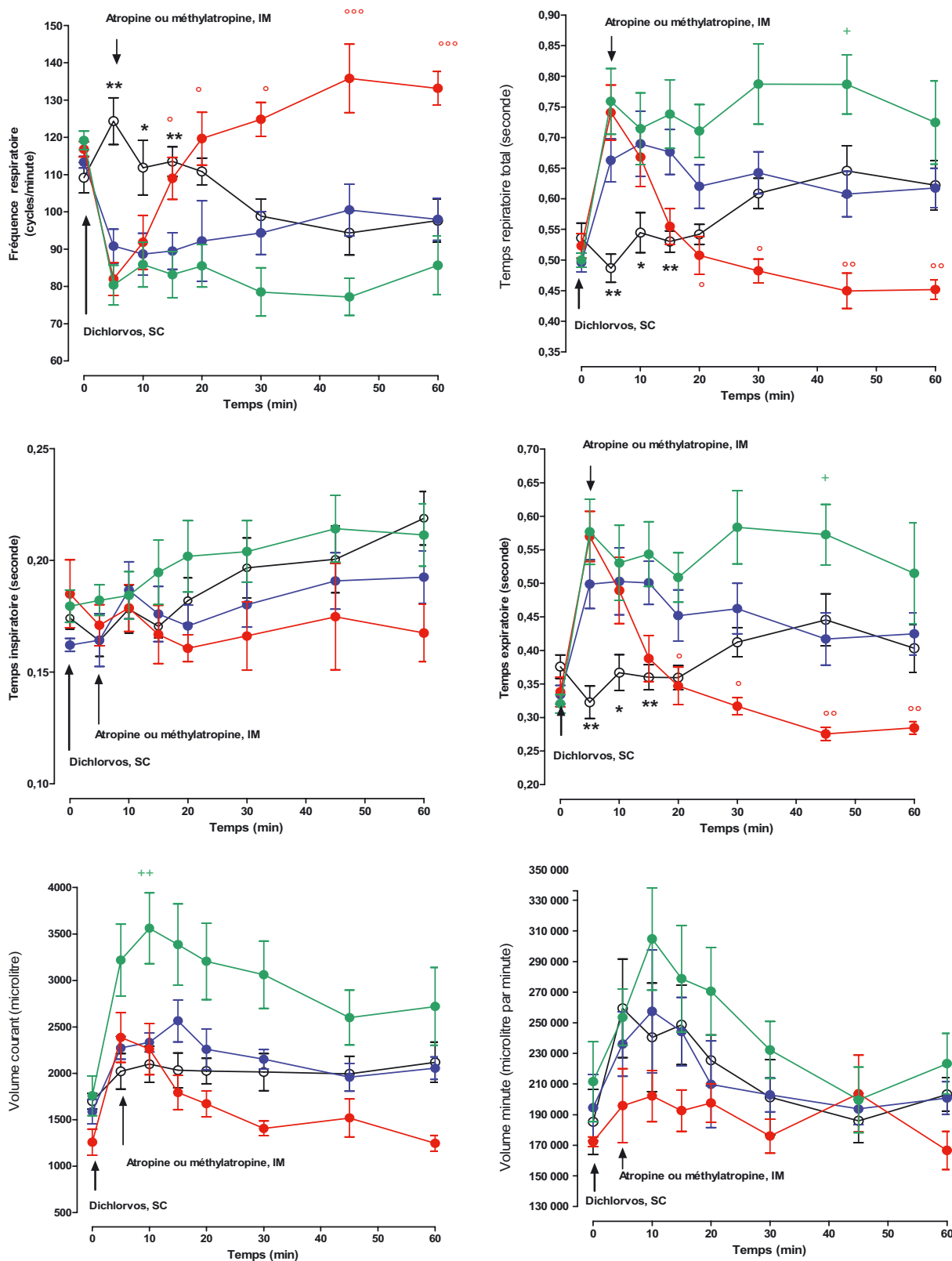


Fig. 6. Évolution des paramètres respiratoires (f , T_{TOT} , T_I , T_E , V_T , et V_E) au cours du temps chez les animaux témoins (cercle blanc), les animaux traités par le dichlorvos (cercle bleu) à la dose de 45 % de la DL_{50} (5,76 mg/kg, SC) et les animaux recevant de l'atropine (cercle rouge) ou de la méthylatropine (cercle vert) à la dose de 10 et 5,42 mg/kg, respectivement.

Signification statistique : * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ groupe témoin *versus* groupe dichlorvos. ° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$ et °°° $p < 0,001$ groupe dichlorvos + atropine *versus* groupe dichlorvos. + $p < 0,05$ et ++ $p < 0,01$ groupe dichlorvos + méthylatropine *versus* groupe dichlorvos.

dés, malgré de nombreux travaux réalisés principalement sur des animaux intoxiqués par des armes chimiques [7, 38–41] et très peu avec des insecticides [2, 20, 42]. Dans notre travail sur le diéthylparaaxon [13], nous avons rapporté des signes cliniques en faveur d'un syndrome muscarinique et nicotinique, qui sont retrouvés dans notre modèle d'intoxication par le dichlorvos. À l'opposé sur le plan ventilatoire, l'absence d'apnée et de modification du volume minute, voire même une augmentation du V_T lors de l'intoxication par le dichlorvos, sont en défaveur d'un effet nicotinique, tandis que la baisse de la fréquence respiratoire, l'augmentation du T_E (et du T_{TOT}) et la réversion par l'atropine à forte dose (10 mg/kg) sont des arguments directs et indirects en faveur d'un effet muscarinique pur. L'atropine à forte dose corrige également les signes cliniques et l'hypothermie induits par le dichlorvos, en agissant sur les récepteurs de type M2, impliqués dans la régulation de la température centrale [43] et dans les mécanismes ventilatoires [12].

De plus faibles doses d'atropine, 1 mg/kg dans le cas du diéthylparaaxon [13, 14, 44], 3, 5, 7 mg/kg dans le cas du dichlorvos (données personnelles) ne corrigent pas les effets ventilatoires induits par les organophosphorés. Ces résultats sont comparables à ceux d'autres études qui ont rapporté l'absence d'effet de l'atropine à 1 mg/kg [34] ou 5 mg/kg [45], sur les effets cardiorespiratoires ou sur la mortalité induits par le dichlorvos chez le rat.

L'inefficacité des doses conventionnelles [34] ou même élevées d'atropine justifie le choix de dose non usuelles (10 mg/kg) dans le traitement des intoxications par les organophosphorés avec comme corollaire, le surdosage en atropine faisant suite à la phase cholinergique de l'intoxication organophosphorée [6, 46] et le passage, sur le plan ventilatoire, d'une intoxication par les organophosphorés à une intoxication atropinique. Pour le diéthylparaaxon, nous avons déjà rapporté une correction excessive des effets ventilatoires par l'atropine apparaissant 60 min après son administration par voie sous-cutanée [14]. Pour le dichlorvos, l'injection de l'atropine par voie intramusculaire induit au temps $T + 30$ min des modifications significatives des paramètres respiratoires (augmentation de la fréquence, diminution du T_I , du T_E), caractéristiques d'une intoxication atropinique. Diéthylparaaxon et dichlorvos ne modifient pas le T_I , il paraît possible d'imputer à l'atropine sa diminution significative. Pour le dichlorvos, la survenue rapide de ces signes ainsi que leur plus grande intensité que dans le cas du diéthylparaaxon pourrait s'expliquer par l'utilisation de la voie intramusculaire et surtout par des effets ventilatoires spontanément résolutifs.

L'atropine est connue pour traverser la barrière hémato-encéphalique. Ses effets thérapeutiques sont la résultante de son action sur les récepteurs muscariniques centraux et périphériques. Les dérivés de l'atropine de structure ammonium quaternaire, comme la méthylatropine, sont des antagonistes muscariniques plus puissants que l'atropine. En raison de leur faible passage cérébral, ils sont dépourvus d'effets muscariniques centraux [47–49]. L'injection intramusculaire d'une dose de méthylatropine ne corrige pas les signes cliniques, l'hypothermie et les effets ventilatoires induits par le dichlorvos. Ces résultats corroborent les travaux de Dickson *et al.* qui rapportent que chez des rats mâles Wistar, le traitement

par des agonistes muscariniques périphériques, ipratropium et glycopyrrolate, ne réduit pas la mortalité d'une dose létale de dichlorvos [45]. Dans le cas du dichlorvos, l'administration de méthylatropine majore les troubles ventilatoires induit par l'organophosphoré. Pour expliquer cette action paradoxale, des études complémentaires sont nécessaires pour rechercher soit une potentialisation des effets du dichlorvos par la méthylatropine, soit des effets propres de la méthylatropine au décours d'une intoxication organophosphorée de courte durée.

En conclusion, notre étude montre que les effets ventilatoires induits chez le rat par le dichlorvos sont qualitativement et quantitativement comparables à ceux du diéthylparaaxon. Cependant, ils en diffèrent sur le plan cinétique. Pour le dichlorvos, les effets apparaissent et se corrigent très rapidement en moins d'une heure. L'injection intramusculaire d'atropine permet leur correction complète. L'inefficacité de la méthylatropine prouve que les effets ventilatoires induits par le dichlorvos ont une origine muscarinique centrale.

Remerciements. Les auteurs remercient les Laboratoires S.E.R.B. (Paris, France) pour leur soutien apporté à cette recherche.

Conflits d'intérêts. Le professeur FJ Baud est expert auprès des Laboratoires S.E.R.B. (Paris, France).

Références

1. Eddleston M, Eyer P, Worek F, Mohamed F, Senarathna L, von Meyer L, Juszczak E, Hittarage A, Azhar S, Dissanayake W, Sheriff MH, Szinicz L, Dawson AH, Buckley NA. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. *Lancet*. 2005; 366: 1452-1459.
2. Satoh T. Global Epidemiology of Organophosphate and Carbamate Poisons. In: *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Elsevier, 2006: p. 89-100.
3. Namba T. Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. *Bull World Health Organ*. 1971; 44: 289-307.
4. Goswamy R, Chaudhuri A, Mahashur AA. Study of respiratory failure in organophosphate and carbamate poisoning. *Heart Lung*. 1994; 23: 466-472.
5. Segura P, Chavez J, Montano LM, Vargas MH, Delaunoy A, Carbajal V, Gustin P. Identification of mechanisms involved in the acute airway toxicity induced by parathion. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 1999; 360: 699-710.
6. Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet*. 2008; 371: 597-607.
7. De Candole C, Douglas W, Evans C, Holmes E, Spencer K, Torrance R, Wilson K. The failure of respiration in death by anticholinesterase poisoning. *Br J Pharmacol*. 1953; 8: 466-475.
8. Tsao TC, Juang YC, Lan RS, Shieh WB, Lee CH. Respiratory failure of acute organophosphate and carbamate poisoning. *Chest*. 1990; 98: 631-636.
9. Betrosian A, Balla M, Kafiri G, Kofinas G, Makri R, Kakouri A. Multiple systems organ failure from organophosphate poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1995; 33: 257-260.

10. Thompson JW, Stocks RM. Brief bilateral vocal cord paralysis after insecticide poisoning. A new variant of toxicity syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997; 123: 93-96.
11. Lund C, Monteagudo FS. Therapeutic Protocol No. 1. Early management of organophosphate poisoning. *S Afr Med J.* 1986; 69: 6.
12. Gies JP, Bertrand C, Vanderheyden P, Waeldele F, Dumont P, Pauli G, Landry Y. Characterization of muscarinic receptors in human, guinea pig and rat lung. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989; 250: 309-315.
13. Villa AF, Houze P, Monier C, Risede P, Sarhan H, Borron SW, Megarbane B, Garnier R, Baud FJ. Toxic doses of paraoxon alter the respiratory pattern without causing respiratory failure in rats. *Toxicology.* 2007; 232: 37-49.
14. Houze P, Pronzola L, Kayouka M, Villa A, Debray M, Baud FJ. Ventilatory effects of low-dose paraoxon result from central muscarinic effects. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 233: 186-192.
15. Namba T. Diagnosis and treatment of organophosphate insecticide poisoning. *Med Times.* 1972; 100: 100-101.
16. Brahmi N, Mokline A, Kouraichi N, Ghorbel H, Blél Y, Thabet H, Hedhili A, Amamou M. Prognostic value of human erythrocyte acetyl cholinesterase in acute organophosphate poisoning. *Am J Emerg Med.* 2006; 24: 822-827.
17. Yurumez Y, Durukan P, Yavuz Y, Ikizceli I, Avsarogullari L, Ozkan S, Akdur O, Ozdemir C. Acute organophosphate poisoning in university hospital emergency room patients. *Intern Med.* 2007; 46: 965-969.
18. Sungur M, Guven M. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit Care.* 2001; 5: 211-215.
19. Saadeh AM, al-Ali MK, Farsakh NA, Ghani MA. Clinical and sociodemographic features of acute carbamate and organophosphate poisoning: a study of 70 adult patients in north Jordan. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1996; 34: 45-51.
20. Eddleston M, Gunnell D, Karunaratne A, de Silva D, Sheriff MH, Buckley NA. Epidemiology of intentional self-poisoning in rural Sri Lanka. *Br J Psychiatry.* 2005; 187: 583-584.
21. Reuber MD. Carcinogenicity of dichlorvos. *Clin Toxicol.* 1981; 18: 47-84.
22. DiGiacomo RF, Brodie SJ, Giddens Jr. WE, Van Hoosier GL, Jr. Dichlorvos toxicity in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Lab Anim Sci.* 1987; 37: 471-473.
23. International Programme on Chemical Safety. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. World Health Organization, Geneva, 2002.
24. Bruce RD. An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundam Appl Toxicol.* 1985; 5: 151-157.
25. Bruce RD. A confirmatory study of the up-and-down method for acute oral toxicity testing. *Fundam Appl Toxicol.* 1987; 8: 97-100.
26. Dixon WJ. Staircase bioassay: the up-and-down method. *Neurosci Biobehav Rev.* 1991; 15: 47-50.
27. Bartlett D. Jr, Tenney SM. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* 1970; 10: 384-395.
28. Boudinot E, Morin-Surun M, Foutz AS, Fournie-Zaluski M, Roques BP, Denavit-Saubie M. Effects of the potent analgesic enkephalin-catabolizing enzyme inhibitors RB101 and ketaorphon on respiration. *Pain.* 2001; 90: 7-13.
29. Bardin PG, van Eeden SF, Joubert JR. Intensive care management of acute organophosphate poisoning. A 7-year experience in the western Cape. *S Afr Med J.* 1987; 72: 593-597.
30. Groszek B, Pach J, Klys M. Intermediate syndrome in acute fenitrothion poisoning. *Przegl Lek.* 1995; 52: 271-274.
31. Eddleston M, Buckley N, Eyer P, Dawson A. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet.* 2008; 371: 597-607.
32. Pawar KS, Bhoite RR, Pillay CP, Chavan SC, Malshikare DS, Garad SG. Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2006; 368: 2136-2141.
33. Gajewski D, Katkiewicz M. Activity of certain enzymes and histomorphological changes in subacute intoxication of rats with selected organophosphates. *Acta Physiol Pol.* 1981; 32: 507-520.
34. Takahashi H, Kojima T, Ikeda T, Tsuda S, Shirasu Y. Differences in the mode of lethality produced through intravenous and oral administration of organophosphorus insecticides in rats. *Fundam Appl Toxicol.* 1991; 16: 459-468.
35. Johnson Rowsey P, Gordon CJ. Tolerance to the hypothermic and hyperthermic effects of chlorpyrifos. *Toxicology.* 1997; 121: 215-221.
36. Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubie M. Central respiratory depression induced by acetylcholinesterase inhibition: involvement of anaesthesia. *Eur J Pharmacol.* 1987; 142: 207-213.
37. RTECS®. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. In: Canada, 2004-3 edition Hamilton, Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CCOHS), MDL Information Systems, Inc., 2005.
38. Aas P, Veiteberg TA, Fonnum F. Acute and sub-acute inhalation of an organophosphate induce alteration of cholinergic muscarinic receptors. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36: 1261-1266.
39. Johnson DD, Wilcox WC. Studies on the mechanism of the protective and antidotal actions of diazepam in organophosphate poisoning. *Eur J Pharmacol.* 1975; 34: 127-132.
40. Nambiar MP, Gordon RK, Rezk PE, Katos AM, Wajda NA, Moran TS, Steele KE, Doctor BP, Sciuto AM. Medical countermeasure against respiratory toxicity and acute lung injury following inhalation exposure to chemical warfare nerve agent VX. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 219: 142-150.
41. Worek F, Kleine A, Falke K, Szinicz L. Arrhythmias in organophosphate poisoning: effect of atropine and bispiridinium oximes. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1995; 329: 418-435.
42. Eddleston M, Singh S, Buckley N. Organophosphorus poisoning (acute). *Clin Evid.* 2005: 1744-1755.
43. Chavez J, Segura P, Vargas MH, Arreola JL, Flores-Soto E, Montano LM. Paradoxical effect of salbutamol in a model of acute organophosphates intoxication in guinea pigs: role of substance P release. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 292: L915-923.
44. Gomezja J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 1692-1697.

45. Dickson EW, Bird SB, Gaspari RJ, Boyer EW, Ferris CF. Diazepam inhibits organophosphate-induced central respiratory depression. *Acad Emerg Med.* 2003; 10: 1303-1306.
46. Kokshavera N, Prodanchuk N, Zhminko P, Krivenchuk. Cholinesterase blockers as potential agents for chemical terrorism and contemporary approaches to therapy of acute poisonings induced by anti-cholinesterase neuroparalytic substances. In Monov A, Dishovsky C editors. *Medical aspects of chemical and biological terrorism. Chemical Terrorism and Traumatism.* Sofia: Publishing house of the Union of Scientists in Bulgaria, 2005, 153-182.
47. Witter A, Slangen JL, Terpstra GK. Distribution of 3H-methylatropine in rat brain. *Neuropharmacology.* 1973; 12: 835-841.
48. Smith RD, Grzelak ME, Coffin VL. Methylatropine blocks the central effects of cholinergic antagonists. *Behav Pharmacol.* 1994; 5: 167-175.
49. Brezenoff HE, Xiao YF, Vargas H. A comparison of the central and peripheral antimuscarinic effects of atropine and methylatropine injected systemically and into the cerebral ventricles. *Life Sci.* 1988; 42: 905-911.