

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 647 347**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **89 06819**

⑤1 Int Cl^B : A 61 K 33/06.

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 24 mai 1989.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 48 du 30 novembre 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRES LUCIEN, société ano-
nyme et INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE, Etablissement public. — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Guy Berthon ; Huguette Gilbert.

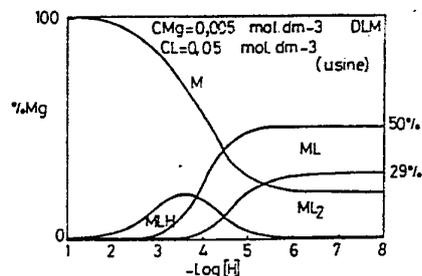
⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet M. Sabatier.

⑤4 Agents et complexes de l'ion Mg^{2+} facilitant l'absorption du magnésium dans un organisme humain ou animal, et compositions pharmaceutiques ou diététiques utilisables pour l'administration de magnésium dans un organisme humain ou animal.

⑤7 Agents et complexes de l'ion Mg^{2+} facilitant l'absorption du magnésium dans un organisme humain ou animal, notamment un agent-vecteur destiné à être associé à une solution monométallique de magnésium et comportant un ou plusieurs ligands de l'ion magnésium Mg^{2+} pour former au moins un complexe électriquement neutre au pH de la lumière gastro-intestinale et administrable dans l'organisme, le pourcentage d'ion magnésium sous forme de complexe électriquement neutre étant au moins égal à 10 % en concentration molaire pour un pH compris entre 6,5 et 8.

L'invention concerne également des compositions de pharmacie ou de diététique humaine ou animale contenant un ou plusieurs agents-vecteurs, notamment un sel de l'acide DL-malique.



FR 2 647 347 - A1

AGENTS ET COMPLEXES DE L'ION Mg^{2+} FACILITANT L'ABSORPTION
DU MAGNESIUM DANS UN ORGANISME HUMAIN OU ANIMAL, ET
COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES OU DIETETIQUES UTILISABLES
POUR L'ADMINISTRATION DE MAGNESIUM DANS UN ORGANISME
5 HUMAIN OU ANIMAL.

La présente invention concerne l'administration du
magnésium à un organisme humain ou animal tant à titre de
traitement, ou de prévention, de toutes les affections
10 relevant de la magnésothérapie en général que dans le
cadre de régimes diététiques humain et animal destinés à
apporter du magnésium.

D'une façon générale, l'absorption dans un organisme
15 humain d'une substance administrée par voie orale résulte
de la faculté, pour cette substance, premièrement à
traverser la membrane gastro-intestinale pour pénétrer
dans le flux sanguin (absorption gastro-intestinale),
deuxièmement à pénétrer dans les tissus à partir du plasma
20 sanguin (absorption tissulaire).

Dans le cas particulier du magnésium, l'absorption gastro-
intestinale est réalisée sans apport d'énergie par le
double mécanisme de la diffusion passive et de la
25 diffusion facilitée. La diffusion passive intervient
suivant le gradient de concentration du magnésium qui doit
cependant se présenter sous une forme non chargée
électriquement pour assurer sa liposolubilité dans la
membrane des entérocytes. La diffusion facilitée, au
30 contraire de la diffusion passive, est un mécanisme
saturable dans lequel le transport du magnésium intervient
par l'intermédiaire d'un composé confiné dans la membrane
traversée. Chez un sujet sain adulte, le partage diffusion
passive/diffusion facilitée est de l'ordre de 20/80 %.
35 Toutefois, on a remarqué que chez les sujets dits

malabsorbants, le pourcentage de diffusion facilitée chute de façon sensible, notamment chez les personnes âgées, chez les sujets diabétiques ou insuffisants rénaux et chez les personnes suivant certains traitements thérapeutiques.

5 Cette réduction de l'absorption gastro-intestinale se traduit par une augmentation du taux d'élimination du magnésium ingéré par excrétion fécale directe.

En ce qui concerne l'absorption tissulaire du magnésium, elle est le plus souvent médiocre, entraînant une élimination importante du magnésium par voie urinaire.

10

Dans le cadre de la magnésothérapie ont déjà été proposées des compositions pharmaceutiques administrables par voie orale dans lesquelles l'ion Mg^{2+} est apparié à des anions tels que le sulfate et certains halogénures. A des concentrations thérapeutiques et dans des conditions de pH équivalentes au pH de la lumière gastro-intestinale, les ions Mg^{2+} se présentent sous leur forme unitaire chargée électriquement. Il en résulte, pour ces ions, une difficulté à diffuser de façon passive au travers des membranes des entérocytes et un taux important d'élimination du magnésium ingéré par excrétion fécale directe.

15

20

Ont également été proposées, dans le cadre de la magnésothérapie, des compositions pharmaceutiques dans lesquelles le magnésium est uniquement administré sous la forme de sels stoechiométriques de magnésium tels par exemple les glutamate, aspartate, citrate, pidolate et lactate. Des études ont révélé que certains de ces sels étaient susceptibles dans les conditions du biofluide gastro-intestinal, de former avec l'ion Mg^{2+} des complexes électriquement neutres a priori plus facilement diffusibles au travers de la membrane intestinale grâce à leur absence de charge. Toutefois la présentation

25

30

35

strictement stoechiométrique des sels de magnésium impose, par le jeu des équilibres chimiques, un pourcentage de complexes neutres trop faible pour avoir, en tant que complexe neutre, un effet spécifique significatif sur
5 l'absorption du magnésium.

Par ailleurs, ont également été proposées, des compositions pharmaceutiques dans lesquelles du $\alpha\beta$ -glycérophosphate de magnésium, sous la forme de sel
10 stoechiométrique, est associé à d'autres sels stoechiométriques métalliques, en particulier des sels de calcium. Une fois encore le jeu des équilibres chimiques et des interactions entre les substances en présence est tel qu'il est difficile de maîtriser la formation et les
15 concentrations des complexes neutres de magnésium et, par voie de conséquence, d'en contrôler les effets particuliers au niveau de l'absorption du magnésium.

L'invention a essentiellement pour but d'améliorer
20 l'absorption du magnésium dans un organisme humain ou animal par l'action de complexes neutres de l'ion Mg^{2+} au niveau de la diffusion passive et au niveau de la diffusion tissulaire. En particulier, l'invention concerne de nouveaux complexes de l'ion magnésium Mg^{2+} , de nouveaux
25 agents facilitant l'absorption du magnésium et de nouvelles compositions pharmaceutiques ou diététiques utilisables pour l'administration de magnésium dans un organisme humain ou animal.

L'invention propose un agent-vecteur facilitant
30 l'absorption d'une dose efficace de magnésium dans un organisme humain ou animal en tant que seul élément métallique actif, caractérisé en ce qu'il comporte un ou plusieurs ligands de l'ion magnésium Mg^{2+} pour former au
35 moins un complexe électriquement neutre au pH de la lumière gastro-intestinale et administrable(s) dans

l'organisme, et en ce qu'il présente, pour être associé dans une solution monométallique à un ou plusieurs sels de magnésium, une concentration en ligand(s) adaptée à la concentration choisie en ion Mg^{2+} pour assurer un pourcentage d'ions magnésium Mg^{2+} sous forme de complexe électriquement neutre au moins égal à 10 % en concentration molaire pour un pH compris entre 6,5 et 8, à l'exclusion des citrate, glutamate et aspartate de magnésium administrés sous leur forme stoechiométrique.

10

Selon une variante de l'invention telle que définie ci-dessus, l'agent-vecteur est caractérisé en ce que, par administration orale chez le rat, en association avec un sel témoin de magnésium du type sel ionique fortement dissociable notamment le chlorure de magnésium, il favorise la réduction de la quantité de magnésium excrété par voie fécale et/ou urinaire par rapport aux quantités correspondantes résultant de l'administration par voie orale du seul sel témoin de magnésium.

20

L'invention concerne également des compositions de pharmacie ou de diététique humaine et vétérinaire caractérisées en ce qu'elles contiennent du magnésium en tant que seul élément métallique actif et en ce qu'elles comportent au moins un agent-vecteur facilitant l'absorption du magnésium défini ci-dessus, à l'exception des compositions dont l'apport en magnésium est uniquement réalisé par des sels de magnésium sous leur forme stoechiométrique et choisis dans le groupe des glutamate, aspartate, et citrate.

30

Avantageusement, l'agent-vecteur présent dans les compositions est associé à un composé ou sel ionique administrable dans l'organisme, facilement dissociable en solution aqueuse, susceptible de libérer l'ion Mg^{2+} en vue de sa complexation, notamment le carbonate de magnésium.

35

Selon une autre variante de l'invention, la composition comporte au moins 25 mg d'élément métallique magnésium, administrables dans 200 cm³ maximum d'une solution aqueuse et correspondant à une concentration minimale de 0,005 mol.dm⁻³, associés à un agent-vecteur dont la concentration minimale assure un pourcentage d'ions magnésium sous forme de complexe électriquement neutre au moins égal à 10% en concentration molaire.

10

Il est à noter que, dans la présentation de l'invention donnée ci-dessus, l'agent-vecteur est utilisé pour l'absorption du magnésium en tant que seul élément métallique, permettant ainsi un meilleur contrôle des concentrations en ligand et en magnésium. Toutefois, l'invention n'est pas limitée à cette caractéristique et concerne également des agents-vecteurs du magnésium utilisables dans des solutions polymétalliques.

20 Ainsi, l'invention propose également un agent-vecteur facilitant l'absorption du magnésium dans un organisme humain ou animal et destiné à être administré soit en tant que seul apporteur de magnésium, soit en association avec un autre composé apporteur de magnésium, caractérisé en ce qu'il contient un ou plusieurs des composés suivants, ou de leurs sels d'addition administrables dans l'organisme, agissant en tant qu'apporteur de ligand de l'ion Mg²⁺ : acide tartrique, phosphate de pyridoxal, acide α -glycérophosphorique, acide β -glycérophosphorique, 30 acide maléique, acide malonique, acide éthylmalonique, acide malique, acide iminodiacétique, acide kojique, tiron et tropolone, à l'exception du α -glycérophosphate de magnésium administré sous la forme d'un sel stoechiométrique d' α -glycérophosphate acide double et 35 d'un mélange de α/β -glycérophosphates de magnésium et de calcium administrés sous forme stoechiométrique.

Avantageusement, certains agents-vecteurs ainsi définis, contiennent au moins deux des composés suivants ou leurs sels d'addition administrables dans l'organisme : composés appartenant à la liste donnée ci-dessus, acide
5 citrique, acide glutamique, acide aspartique et acide phosphorique. De préférence, ces agents-vecteurs contiennent au moins deux des composés suivants : acide malique, acide maléique, acide α -glycérophosphorique, acide β -glycérophosphorique, acide phosphorique et acide
10 malonique.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques ou diététiques comportant au moins un agent-vecteur défini dans le paragraphe précédent
15 éventuellement associé à un autre composé ou sel apporteur en magnésium, notamment le carbonate de magnésium, pour former avec l'ion Mg^{2+} au moins un complexe électriquement neutre. Avantageusement, ces compositions comportent au moins 25 mg d'élément métallique magnésium administrables
20 dans 200 cm³ maximum d'une solution aqueuse correspondant à une concentration minimum de 0,005 mol.dm⁻³ en association avec un agent-vecteur de concentration minimum prédéfinie.

25 Selon un mode de réalisation particulier d'une composition pharmaceutique ou diététique selon l'invention, l'agent-vecteur contient de l'acide (DL)-malique ou un de ses sels administrable dans l'organisme, la concentration en ligand (DL)-malate étant de préférence égale à 0,076
30 mol.dm⁻³ pour une concentration de magnésium égale à 0,04 mol.dm⁻³.

Selon un autre mode de réalisation particulier d'une composition de l'invention, l'agent-vecteur est constitué
35 par de l'acide $\alpha\beta$ -glycérophosphorique ou un de ses sels administrables dans l'organisme, la concentration en

ligand α/β -glycérophosphate étant de préférence égale à 0,048 mol.dm⁻³ pour une concentration de magnésium égale à 0,04 mol.dm⁻³.

5 Selon encore un autre mode de réalisation particulier de l'invention, est proposée une composition pharmaceutique ou diététique du type comportant l'ion citrate et/ou l'ion glutamate et/ou l'ion aspartate à titre de ligand d'au moins 25 mg d'ion Mg²⁺ administrables dans une solution
10 aqueuse de 200 cm³ environ, correspondant à une concentration de 0,005 mol.dm⁻³, pour former un complexe électriquement neutre d'ion Mg²⁺ selon une concentration minimale, de 0,005 mol.dm⁻³ pour l'ion citrate seul, de 0,015 mol.dm⁻³ pour l'ion glutamate seul et de 0,020
15 mol.dm⁻³ pour l'ion aspartate seul, à l'exception des citrate, glutamate et aspartate de magnésium administrés sous leur forme stoechiométrique.

Il est à noter que les compositions selon l'invention
20 sont conditionnées sous la forme de préparations en vue d'une administration par voie orale ou parentérale.

L'invention concerne également à titre de produits nouveaux les complexes, notamment les complexes
25 électriquement neutres, de l'ion Mg²⁺ de type MqLp et/ou de type MqLpHr où M représente l'ion Mg²⁺, H représente le proton et L représente un ligand choisi parmi le groupe suivant: tartrate, phosphate de pyridoxal, maléate, malonate, éthylmalonate, malate, iminodiacétate, kojate,
30 tropolonate et tironate.

Enfin l'invention concerne l'utilisation de ces nouveaux complexes à la magnésothérapie humaine ou animale et/ou aux suppléments en magnésium dans le cadre de régimes diététiques humain et animal.

35 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la

description qui va suivre dans laquelle sont présentés, à titre d'exemples non limitatifs, quelques agents-vecteurs facilitant l'absorption du magnésium, les complexes correspondants et quelques compositions pharmaceutiques ou diététiques utilisables pour l'administration du magnésium dans un organisme humain ou animal. Ces exemples sont accompagnés de tableaux et de figures qui seront présentés en cours de l'exposé qui, pour des raisons de présentation n'ayant aucun caractère limitatif, a été divisé en quatre chapitres principaux "Recherche in vitro et simulation", "Tests in vivo", "Acide malique", "Applications pharmaceutiques et diététiques".

I - Recherche in vitro et simulation

15

D'une façon générale, toute substance chimique introduite dans un biofluide, par exemple le fluide gastro-intestinal, est soumise à des interactions de la part des autres substances qui le composent. Il en résulte que seule une fraction de cette substance demeure sous la forme initialement introduite. Le reste se répartit sous différentes formes complexes, dont les proportions respectives dépendent :

- de la force de ces interactions,
- 25 - des concentrations des divers réactifs en présence,
- du pH de la solution.

La capacité d'une substance à franchir les membranes cellulaires qui séparent le biofluide considéré des autres compartiments de l'organisme dépend en premier lieu de l'état électriquement neutre de ses formes prépondérantes. Ce dernier point, qui a déjà fait l'objet d'un développement particulier, ne sera pas repris ici.

En ce qui concerne l'absorption du magnésium, le principe de l'invention repose sur l'utilisation après formation en 35 quantité appréciable de complexes électriquement neutres

de l'ion Mg^{2+} relativement stables au pH de la lumière gastro-intestinale. Il en résulte, dans un premier temps, un effet favorable au niveau de la composante diffusion passive de l'absorption gastro-intestinale. De plus, le vecteur facilitant l'absorption gastro-intestinale du magnésium diffuse également dans le plasma, sous sa forme protonée, pour atteindre une concentration suffisamment importante de sorte qu'il favorise la formation de complexes neutres de l'ion Mg^{2+} dans ce milieu (pH = 7) et par voie de conséquence, la diffusion tissulaire de ce métal.

La recherche des ligands susceptibles de constituer un agent-vecteur favorisant l'absorption d'une dose efficace de magnésium fait appel à la simulation informatique. En effet, si les techniques analytiques permettent de mesurer la concentration globale d'une substance donnée, elles ne permettent pas d'accéder aux valeurs individuelles des différentes formes auxquelles celle-ci donne naissance.

La constitution de modèles de simulation appropriés à chaque type de situation requiert l'identification des composants du biofluide, notamment des divers complexes de l'ion magnésium Mg^{2+} et la mesure de leurs concentrations globales, puis la détermination expérimentale des paramètres qui définissent la force des interactions, c'est-à-dire les constantes de formation des espèces complexes.

Pour ce faire, la méthode utilisée a consisté à :

- 1°/ - déterminer in vitro les constantes d'équilibre des complexes magnésiens dans les conditions expérimentales adéquates, c'est-à-dire les plus proches des conditions physiologiques (par exemple à 37°C),
- 2°/ - simuler la répartition des complexes magnésiens aux concentrations thérapeutiques entre pH 1 et 8, avec une

attention particulière pour l'intervalle 6 à 7. Cette méthode a été présentée de façon générale dans un article de C. Blaquière et G. Berthon dans la revue *Inorganica Chimica Acta*, 135 (1987) 179-189 concernant l'étude de la formation de certains complexes de l'ion Mg^{2+} .

La méthode de recherche de ligand a été utilisée pour divers vecteurs potentiels choisis parmi les anions essentiellement organiques susceptibles de former des complexes avec le magnésium. Les anions minéraux tels que le sulfate et les halogénures ont été d'emblée écartés car les complexes potentiels sont totalement dissociés aux concentrations thérapeutiques. Il est à noter que, pour la suite de la description, on suivra la convention d'écriture suivante de la formule générale d'un complexe $MqLpHr$ avec M = métal, L = ligand, H = proton.

A titre d'exemple non limitatif, la méthode de détermination des constantes d'équilibre et de simulation de répartition des complexes de magnésium, est maintenant présentée en se référant au système magnésium-malonate.

I - Phase 1 : détermination des constantes de formation des complexes.

La méthode potentiométrique associée aux techniques informatiques a été utilisée pour cette étude. Les constantes de protonation du ligand, utilisées par la suite comme références, ont été calculées au moyen d'un programme informatique (MINIQUAD) à partir de données expérimentales provenant de titrages réalisés en solution aqueuse à $37^{\circ}C$ et sous atmosphère d'azote.

La complexation dans chaque système magnésium-ligand a ensuite été étudiée à partir de plusieurs titrages en solution aqueuse du ligand en présence de magnésium, pour

différents rapports de concentrations métal-ligand correspondant à l'éventail le plus large possible de conditions thérapeutiques. Ces dosages se traduisent graphiquement par le tracé des courbes de protonation $s = f(-\log[H])$, où s est le nombre moyen de protons liés au ligand. Ce type de courbes permet de visualiser la complexation. Par exemple, sur la figure 1, relative au système magnésium-malonate, on a représenté la courbe de protonation de référence du ligand par un trait plein et matérialisé les points expérimentaux des titrages du ligand en présence de magnésium par les symboles +, x, □, ◀ dans l'ordre des rapports de concentrations métal/ligand croissants. On remarque deux zones de pH différentes :

- 15 - l'une, de pH 2 à 3, pour laquelle les points se superposent à la courbe de protonation de référence, ce qui dénote une absence totale de complexation,
- l'autre, de pH 3 à 7, pour laquelle les points sont décalés vers la gauche par rapport à la protonation de référence, c'est-à-dire vers des pH plus acides. Il y a donc une libération d'ions H^+ en solution due à la complexation des ions Mg^{2+} par le malonate.

Cette complexation est confirmée par le tracé de la courbe de formation expérimentale $p = f(-\log[L])$ au moyen d'un autre programme (ZAPAPLOT) où p est le nombre moyen de ligands liés au métal (représenté par le degré de formation DF à la figure 2). L'allure de cette courbe donne une idée de la forme sous laquelle le ligand intervient dans les complexes formés et permet d'estimer la valeur de leurs constantes de formation.

A partir des données expérimentales des titrages, le programme MINIQAD calcule les constantes par la méthode des moindres carrés. Parmi les différentes combinaisons de complexes possibles, seules sont retenues celles pour

lesquelles les critères numériques (notamment la somme des carrés des résidus) sont convenables. Le meilleur ensemble est finalement choisi d'après le tracé des courbes de formation simulées au moyen d'un troisième programme informatique (PSEUDOPLOT) : c'est celui qui permet d'obtenir la meilleure coïncidence entre courbes expérimentale (figure 2) et simulée (figure 3).

10 Trois cas possibles a priori ont été effectivement rencontrés :

i) si aucune complexation n'est constatée dans les conditions expérimentales précisées plus haut, c'est à dire si le degré de complexation reste nul sur tout le domaine de concentrations en ligand examiné, aucune espèce complexe indépendante ne peut exister dans le fluide gastro-intestinal. Ceci ne signifie pas que les ligands envisagés ne puissent pas coordonner le magnésium à des concentrations beaucoup plus élevées, mais cette possibilité se rapportant à des conditions extra-physiologiques ne présente pas d'intérêt dans le cadre de l'invention.

25 ii) si l'ensemble de complexes sélectionné d'après les critères ci-dessus n'est constitué que d'espèces ionisées, il est impossible à ces dernières de se dissoudre dans la membrane phospholipidique ; les ligands correspondants ne peuvent donc être utilisés comme vecteurs pour l'absorption gastro-intestinale du magnésium.

30 iii) si l'ensemble retenu contient une ou plusieurs espèces neutres, les ligands correspondants peuvent être a priori des vecteurs efficaces pour l'absorption du magnésium par les membranes des entérocytes. Leur efficacité dépendra toutefois de la proportion de ces

espèces neutres dans les conditions thérapeutiques. L'étude de ces systèmes est étendue à l'analyse de la complexation du calcium par le même ligand, afin de tester la possibilité d'une éventuelle compétition antagoniste.

5

En ce qui concerne le malonate, les constantes ($\log \beta$) de protonation des ligands et de formation des complexes correspondantes sont données dans le Tableau 1 suivant :

10

Système	Complexe MqLpHr	$\log \beta$	+/-
proton-malonate	LH	5,235	0,002
15 proton-malonate	LH2	7,815	0,003
magnésium-malonate	ML	2,064	0,007
magnésium-malonate	ML3	5,266	0,043
magnésium-malonate	MLH	5,524	0,118
magnésium-malonate	MLH-1	-6,326	0,099
20 calcium-malonate	ML	1,511	0,009

I - Phase 2 : Simulation.

Une fois le meilleur ensemble de complexes établi pour chaque système potentiellement actif, il reste à déterminer les conditions de concentrations susceptibles d'entraîner la formation d'un pourcentage optimal d'espèce(s) neutre(s). Dans le cas de systèmes simples, ne comportant par exemple qu'un complexe monomère de type ML et son homologue protoné MLH, la connaissance des constantes "conditionnelles" de formation de ces espèces permettrait d'en situer les pourcentages respectifs. Pour des systèmes faisant intervenir plusieurs complexes tels que ceux envisagés ici, le pourcentage d'espèce neutre dépend non seulement des concentrations en ions Mg^{2+} et en ligand, du rapport métal/ligand, mais aussi du pH. On a

35

alors recours à la simulation par ordinateur, et c'est grâce aux programmes informatiques (COMICS, COMPLIT ou/et TRIPLIT) spécialement élaborés à cet effet que l'on peut déterminer les conditions optimales d'administration : il s'agit de calculer la répartition théorique des espèces formées dans les conditions de concentration de la lumière gastro-intestinale en fonction du pH.

L'appréciation dans la pratique de la distribution réelle d'un médicament administré par voie orale pose un certain nombre de questions discutées ci-dessous.

L'administration de complexes métalliques peut se faire :

- soit dans un estomac vide, pratique souhaitable ; cette solution offre un avantage notable : les sécrétions gastro-intestinales spécifiques au processus de digestion peuvent être négligées et la répartition de l'ion métallique en ses différents complexes avec le ligand choisi peut être simulée directement.
- soit dans un estomac plein, au moment des repas : c'est ce qui est habituellement recommandé pour les médicaments actuels contenant du magnésium. Dans ce cas, la simulation de la répartition réelle du métal pose un problème beaucoup plus ardu, spécifique à chaque situation particulière : il y a compétition entre les ligands libérés au cours de la digestion et ces mêmes vecteurs vis-à-vis de l'ion Mg^{2+} .

Cette deuxième possibilité ne peut donc, par définition, être développée sur le plan général. Néanmoins, pour prendre en compte les variations dans différents volumes de fluide gastro-intestinal, deux concentrations de magnésium ont été considérées pour les simulations : 0,005 et 0,05 mol.dm⁻³, avec une concentration de ligand associé telle que le rapport métal/ligand varie de 1/1 à 1/10. Par exemple, dans le cas du malonate (désigné sous le symbole

MLO), les simulations des figures 4a/b/c/d mettent en évidence un comportement du système magnésium-malonate très variable en fonction des concentrations et des rapports de concentrations métal/ligand.

5

L'examen des quatre courbes de simulation présentées aux figures 4a/b/c/d montre que l'espèce neutre est favorisée pour $CMg = 0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$ et $CMLO = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$. Dans ce cas (figure 4c), ML existe de pH 3 à 8 avec un maximum de 51% à pH 5 et se maintenant de pH 5 à 8 aux environs de 45%.

10

Par la suite, les interactions potentielles du calcium sur la mobilisation du magnésium en espèces neutres ont été analysées en simulant tout d'abord des concentrations de calcium équivalentes à celle du magnésium puis jusqu'à 10 fois supérieure. Les résultats ont montré que le calcium a une influence positive sur le pourcentage d'espèces magnésiennes neutres incorporant le ligand malonate (voir la figure 5 à rapprocher de la figure 4d).

20

Au terme de ces deux premières phases de recherche, les résultats présentés ci-après ont permis de sélectionner à titre d'agent-vecteur favorisant l'absorption, notamment gastro-intestinale, du magnésium les ligands suivants comme formant avec le magnésium des complexes relativement stables avec au moins une espèce neutre : ce sont, outre l'anion malonate (MLO), les anions glutamate (GLU), aspartate (ASP), citrate (CTA), phosphate (PO_4), α et β -glycérophosphate (AGC et BGC), phosphate de pyridoxal (PDP), tartrate (TRA), maléate (MLE), éthylmalonate (EMA) et malate (MLA). De plus, des complexes très stables, dont des espèces neutres, ont été mis en évidence avec les quatre ligands suivants également susceptibles d'être utilisés comme agent-vecteur: acide iminodiacétique (IDA), tropolone (TPL) (2-hydroxy-2,4,6-cycloheptatrienone), tiron (TIR) (acide 4,5-dihydroxy-1,3-benzène-disulfonique)

35

et acide kojique (KJA) (5-hydroxy-2-(hydroxy-méthyl)-4H-pyran-4-one).

Il est à noter que, parmi toutes les préparations utilisant ces composés, celles destinées à des applications pharmaceutiques ou diététiques seront présentées sous une forme pratiquement ingérable et à des concentrations non toxiques selon les critères en vigueur dans la profession, après les vérifications d'usage bien connues de l'homme de l'art. Ces dernières ne devraient pas soulever de difficulté particulière, tout du moins pour les dix premiers composés qui sont déjà relativement bien connus.

Les Tableaux 2 et 3 présentés en pages suivantes, donnent les valeurs des constantes de protonation des ligands et des constantes d'équilibre de formation des complexes de magnésium de type $MqLpHr$ concernant les ligands sélectionnés calculées à partir des résultats expérimentaux obtenus par titrage. D'une façon générale, les complexes sont identifiés par les valeurs de leurs indices de coordination p , q et r .

TABLEAU 2

Système	p	q	r	log β	\pm
Proton-glutamate	1	0	1	9,176	
	1	0	2	13,256	
	1	0	3	15,440	
Proton-aspartate	1	0	1	9,321	0,021
	1	0	2	12,935	0,005
	1	0	3	14,910	0,006
Proton-citrate	1	0	1	5,518	0,002
	1	0	2	9,758	0,003
	1	0	3	12,581	0,004
Proton-tartrate	1	0	1	3,855	0,002
	1	0	2	6,584	0,002

TABLEAU 2 (suite)

Systeme	p	q	r	log β	\pm
Proton-phosphate	1	0	1	6,627	0,002
	1	0	2	8,575	0,004
Proton-pyridoxal phosphate	1	0	1	7,948	0,002
	1	0	2	13,904	0,003
	1	0	3	17,320	0,005
Proton- α -glycérophosphate	1	0	1	6,116	0,001
	1	0	2	7,311	0,011
Proton- β -glycérophosphate	1	0	1	6,143	0,002
	1	0	2	7,460	0,013
Proton-maléate	1	0	1	5,803	0,002
	1	0	2	7,525	0,004
Proton-malonate	1	0	1	5,235	0,002
	1	0	2	7,815	0,003
Proton-éthyl-malonate	1	0	1	5,409	0,001
	1	0	2	8,180	0,001
Proton-malate	1	0	1	4,608	0,001
	1	0	2	7,782	0,011
Proton-iminodiacétate	1	0	1	9,060	0,002
	1	0	2	11,611	0,006
	1	0	3	13,298	0,013
Proton-kojate	1	0	1	7,596	0,001
Proton-tropolonate	1	0	1	6,617	0,001
Proton-tironate	1	0	1	11,552	0,005
	1	0	2	18,914	0,005
Proton-D-malate	1	0	1	4,620	0,001
	1	0	2	7,819	0,002
Proton-DL-malate	1	0	1	4,615	0,001
	1	0	2	7,829	0,001
Proton-DL-malate (usine)	1	0	1	4,617	0,001
	1	0	2	7,818	0,001
Proton- $\alpha\beta$ -glycéro phosphate	1	0	1	6,170	0,002
	1	0	2	7,507	0,013

TABLEAU 3

Systeme	p	q	r	log β	\pm
Magnésium-glutamate	1	1	0	2,196	0,021
	1	1	1	11,081	0,018
	1	1	2	14,876	0,021
	2	1	-1	-6,125	0,023
Magnésium-aspartate	1	1	0	2,040	0,029
	1	1	1	10,501	0,030
	1	1	2	14,074	0,042
	1	1	-1	-8,666	0,023
	1	2	0	4,426	0,049
Magnésium-citrate	1	1	0	3,333	0,009
	1	1	1	7,483	0,024
	2	2	-2	-12,638	0,033
	1	1	-2	-18,468	0,015
	2	1	0	5,126	0,041
	2	1	1	10,411	0,069
	1	1	2	11,008	0,063
Magnésium-tartrate	1	1	0	1,202	0,013
	2	1	0	3,057	0,032
	1	1	1	4,120	0,111
	2	1	-1	-3,764	0,156
Magnésium-phosphate	1	1	0	2,399	0,071
	1	1	1	8,662	0,096
Magnésium-pyridoxal phosphate	1	1	0	2,050	0,014
	1	1	1	9,405	0,023
	2	1	1	11,628	0,106
Magnésium- β -glycero phosphate	1	1	0	2,450	0,023
	1	1	1	8,338	0,026
	2	1	0	4,255	0,024
	2	1	1	10,114	0,032
	1	1	-1	-6,425	0,033
Magnésium- α -glycero phosphate	1	1	0	1,896	0,023
	1	1	1	7,711	0,032
	2	1	0	3,609	0,025
	2	1	1	9,583	0,030
	1	1	-1	-8,083	0,291
Magnésium-maléate	1	1	0	1,803	0,015
	1	1	1	7,117	0,024
	2	1	0	2,678	0,194
Magnésium-malonate	1	1	0	2,064	0,007
	3	1	0	5,266	0,043
	1	1	1	5,524	0,118
	1	1	-1	-6,326	0,099

TABLEAU 3 (suite)

Système	p	q	r	log β	\pm
Magnésium-éthylmalonate	1	1	0	1,601	0,018
	2	1	0	2,935	0,076
	1	1	1	5,904	0,078
Magnésium-iminodiacétate	1	1	0	2,876	0,007
	1	1	1	9,540	0,097
	2	1	-1	-6,146	0,041
	3	1	0	6,229	0,050
Magnésium-kójate	1	1	0	2,883	0,002
	2	1	0	4,997	0,003
	1	1	-1	-7,993	0,004
Magnésium-tropolonate	1	1	0	3,786	0,002
	2	1	0	6,805	0,003
	3	1	0	8,725	0,012
Magnésium-tironate	1	1	0	6,025	0,002
	2	1	0	9,653	0,008
	1	1	1	13,576	0,006
	2	1	-1	-1,688	0,008
Magnésium-malate	1	1	0	1,707	0,011
	1	1	1	5,579	0,025
	2	1	0	2,878	0,081
Magnésium-D-malate	1	1	0	1,707	0,007
	1	1	1	5,452	0,021
	2	1	0	2,864	0,056
Magnésium-DL-malate	1	1	0	1,712	0,007
	1	1	1	5,563	0,017
	2	1	0	2,837	0,059
Magnésium-DL-malate (usine)	1	1	0	1,738	0,005
	1	1	1	5,589	0,012
	2	1	0	2,862	0,044
Magnésium- $\alpha\beta$ -glycéro phosphate	1	1	0	2,294	0,024
	1	1	1	8,066	0,034
	2	1	0	3,674	0,049
	2	1	1	9,825	0,052
	1	1	-1	-6,863	0,027

Il est à noter que les Tableaux 2 et 3 incorporent des résultats concernant diverses variétés des ligands malate et glycérophosphate qui se sont avérés particulièrement intéressants dans le cadre de la présente invention et qui
5 seront discutés en détail ultérieurement.

Les résultats concernant la simulation de la répartition des complexes en fonction du pH sont détaillés ci-après en se référant aux figures correspondantes 6 à 21. Ces
10 simulations effectuées dans les conditions de concentrations du fluide gastro-intestinal en fonction du pH permettent de mettre en évidence non seulement le pourcentage d'espèce neutre mais aussi la zone d'existence de cette espèce. Parmi tous les ligands
15 étudiés formant des complexes neutres avec le magnésium, ont été écartés les ligands dont le pourcentage d'espèce neutre était trop faible ou ceux dont l'existence de l'espèce neutre se situait en dehors d'un intervalle d'utilisation prévue de pH compris entre 6/7,5.

20
Sauf indications contraires, les simulations présentées ci-après ont été effectuées pour $CMg = 0,005 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ et $CL = 0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$:

- 25 - Pour le glutamate (GLU) et l'aspartate (ASP), l'espèce neutre ML n'existe qu'à partir de pH 7 et en faible pourcentage (8% à pH 8) (figures 6 et 7).
- Avec le citrate (CTA), l'espèce neutre MLH existe de pH 2 à 6 avec un maximum de seulement 32% à pH 4 (figure 8).
30 - L'ion phosphate (PO_4) forme une espèce neutre dès pH 4, atteignant 91% à pH 8 (figure 9). De plus, la simulation de la répartition de l'espèce magnésienne neutre en présence de calcium est pratiquement identique à celle obtenue sans calcium, indiquant que le calcium n'a aucune
35 influence sur la mobilisation du magnésium par le phosphate.

- Le glycérophosphate (étudié avec $CMg = CL = 0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$) forme également une espèce neutre à partir de pH 4, atteignant à pH 8, 35% pour la forme α (AGC) (figure 10), et 47% pour la forme β (BGC) (figure 11). L'influence du calcium apparaît également négligeable pour des concentrations en magnésium et calcium équivalentes.

Les sels α et β -glycérophosphate sont deux produits de structures différentes ; l'étude de ces deux systèmes a conduit à sélectionner la forme β au détriment de la forme α .

Le produit α/β -glycérophosphate (ABG) est un mélange équimoléculaire de ces deux formes. Toutefois, la pratique a montré que l'équimolécularité n'est généralement pas respectée dans les produits couramment disponibles. Sous cette réserve, les résultats de simulation présentés dérivent tous de l'étude in vitro du même composé α/β -glycérophosphate. Les valeurs des constantes de protonation de ce composé se situent entre celles des produits purs α et β (Tableau 2). De même, la stabilité des complexes du magnésium avec le composé α/β , notamment celle de ML, est intermédiaire entre les stabilités des complexes formés par les produits purs α et β (Tableau 3).

La simulation de la répartition des complexes en fonction du pH donne des résultats variables selon les rapports de concentrations envisagés :

- I - pour une concentration de $0,005 \text{ mol.dm}^{-3}$ en magnésium et de $0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$ en ligand (figures 27a/b/c), l'espèce neutre ML n'atteint à pH 8 que 28 % pour α (figure 27a) et, 25 % pour β (figure 27b), l'espèce chargée ML2 étant majoritaire ; dans le cas de α/β , ML et ML2 se forment en pourcentage équivalent : 45% à pH 8 (figure 27c) ;
- II - pour une concentration identique en magnésium et en ligand égale à $0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$ (figures 28a/b/c), c'est l'espèce ML qui est majoritaire dans les trois systèmes ; il est de plus remarquable que le pourcentage d'espèce

neutre pour $\alpha\beta$, 54% à pH 7,5, soit supérieur à ceux trouvés pour α , 36 % et pour β , 47 %.

- 5 En ce qui concerne la répartition de l'espèce neutre en fonction du pH et de la concentration en ligand dans les conditions du fluide gastro-intestinal, le pourcentage maximum, 56 % est obtenu à pH 7,5, lorsque, pour une concentration en magnésium de 0,04 mol.dm⁻³, la
- 10 concentration en ligand est de 0,048 mol.dm⁻³. En présence d'une concentration en calcium égale à celle de magnésium (0,04 mol.dm⁻³), on obtient le même pourcentage pour une concentration en ligand de 0,104 mol.dm⁻³.
- Avec le tartrate (TRA), l'espèce magnésienne neutre
- 15 existe dans une zone très étendue (pH 3 à 7) mais avec un pourcentage très faible (19%). C'est l'espèce chargée ML2 qui est majoritaire (figure 13).
- Le phosphate de pyridoxal (PDP) forme avec le magnésium une espèce neutre MLH de pH 5 à 8 avec un maximum de 43% à
- 20 pH 6,2. Il faut toutefois signaler que les espèces chargées ML et ML2H cessent d'être négligeables dès pH 7 (figure 12).
- Avec le malate (MLA) et le maléate (MLE), on obtient le même type de simulation : existence de l'espèce neutre ML
- 25 avec un pourcentage de 51% de pH 5 à 8 pour le malate (figure 14) et de 60% de pH 6 à 8 pour le maléate (figure 15). Ces deux systèmes ne sont pas perturbés par la présence de calcium : les simulations de la répartition des espèces magnésiennes neutres en présence de calcium
- 30 sont pratiquement inchangées pour des concentrations en calcium égales à celles de magnésium.
- Pour le malonate (MLO), on se reportera aux résultats présentés ci-avant.
- En ce qui concerne l'éthylmalonate (EMA), la simulation
- 35 permet aussi de déterminer les meilleures conditions de concentration pour optimiser le pourcentage d'espèce

neutre. Alors que pour $CMg = 0,005$ et $CEMA = 0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$, ML atteint 40% de pH 5 à 8 et ML2 avec 37% de pH 6 à 8 (figure 17), pour $CMg = CEMA = 0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$, seule l'espèce ML est présente de pH 4 à 8 avec 50% de 6 à 8
5 (figure 16).

- L'ion iminodiacétate (IDA) forme avec le magnésium une espèce neutre ML existant uniquement de pH 6 à 8 avec un pourcentage maximum de 68% à pH 8 (figure 18).

- Avec l'acide kojique (KJA), l'espèce neutre ML2 est
10 favorisée pour le rapport de concentration 1/10 avec $CMg = 0,005 \text{ mol.dm}^{-3}$: elle existe de pH 6 à 8 avec un maximum de 79% à pH 8 (figure 19).

- Le tiron (TIR) forme l'espèce neutre ML de pH 6 à 8 avec 67% à pH 8, mais l'espèce chargée MLH est présente de pH 8
15 à 8 avec un maximum à pH 7 (51%) (figure 20).

- En ce qui concerne le tropolone (TPL), l'espèce neutre ML2 est majoritaire pour $CMg = 0,05$ et $CTPL = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$: 63% de pH 6 à 8 (figure 21).

L'influence du calcium sur la répartition de l'espèce
20 neutre magnésienne relative à ces quatre derniers ligands est négligeable.

L'étape de simulation est très importante puisqu'elle permet non seulement de détecter les meilleurs ligands
25 susceptibles de vectoriser le magnésium, mais aussi de déterminer les conditions optimales d'administration orale de ce métal. Le tableau 4 donne la répartition ou fraction maximum calculée de l'espèce neutre en fonction du pH et de la concentration en ligand pour une concentration de
30 magnésium correspondant à 100 mg dans 100 cm³ ($CMg = 0,04 \text{ mol.dm}^{-3}$) et les valeurs optimales correspondantes du pH et de la concentration en ligand CL donnée en mol.dm^{-3} . Dans ce tableau les abréviations DMA et DLM désignent respectivement l'acide (D)-malique et l'acide racémique
35 (DL)-malique.

Tableau 4

	I Ligand	I Fraction maximum	I pH	I Concentration	I
	I	I	I	I en ligand	I
5	I				I
	I GLU	I 0,11	I 8	I 0,16	I
	I ASP	I 0,11	I 8	I 0,16	I
	I CTA	I 0,35	I 3,5	I 0,16	I
	I TRA	I 0,19	I 4,5	I 0,076	I
10	I PO4	I 0,95	I 8	I 0,16	I
	I PDP	I 0,42	I 8	I 0,076	I
	I AGC	I 0,37	I 8	I 0,048	I
	I BGC	I 0,49	I 7,5	I 0,048	I
	I ABG	I 0,56	I 7,5	I 0,048	I
15	I MLE	I 0,59	I 8	I 0,076	I
	I MLO	I 0,51	I 5	I 0,076	I
	I EMA	I 0,40	I 8	I 0,076	I
	I MLA	I 0,48	I 8	I 0,076	I
	I DMA	I 0,48	I 8	I 0,076	I
20	I DLM	I 0,50	I 8	I 0,076	I
	I IDA	I 0,74	I 8	I 0,132	I
	I KJA	I 0,89	I 8	I 0,16	I
	I TPL	I 0,63	I 5,5	I 0,132	I
	I TIR	I 0,67	I 8	I 0,104	I
25					

Au vu des simulations de répartition du magnésium neutre en fonction du pH, il a paru tout à fait intéressant de simuler la répartition des espèces magnésiennes neutres formées avec un mélange de deux ligands.

En effet, lorsque les espèces neutres de deux systèmes existent dans des zones de pH différentes, on a cherché à obtenir la fraction de magnésium neutre sur une plus grande zone de pH. Pour ce faire, les mélanges de ligands et les concentrations utilisées ont été choisis d'après

les résultats des simulations propres à chaque ligand.

Les vecteurs qui se sont avérés les plus intéressants sont les ligands qui donnent naissance à une espèce magnésienne neutre de stabilité relativement importante dans la zone de pH 6-7 : MLA, MLO, MLE, BGC, PO4.

Les résultats des simulations sont rapportés dans les Tableaux 5, donnant pour chaque mélange envisagé, les pourcentages d'espèce neutre aux pH 5, 7 et 8 pour divers rapports de concentrations en ligands. Pour comparaison, la première série de tableaux (5.A) donne les pourcentages relatifs aux ligands seuls. La concentration en magnésium est 0,05 mol.dm⁻³. La concentration en ligands est donnée à la première ligne des tableaux : 0,05 ou 0,1 mol.dm⁻³.

15

Tableaux 5

5.A

	MLE 0,05	MLE 0,1	MLA 0,05	MLA 0,1	MLO 0,05	MLO 0,1	PO4 0,05	PO4 0,1	BGC 0,05	BGC 0,1
pH 5:13	21	34	48	44	51	3	5	7	9	
pH 7:49	59	42	47	49	45	63	77	47	36	
pH 8:50	59	42	47	41	38	73	91	47	35	

25

5.B.a/b

	MLE/MLA 0,05/0,05	MLE/MLA 0,1/0,05	MLE/MLO 0,05/0,05	MLE/MLO 0,1/0,05
pH 5	40	39	42	41
pH 7	63	62	62	59
pH 8	63	62	57	55

30

5.C.a/b

	MLE/PO4 0,05/0,05	MLE/PO4 0,05/0,1	MLE/PO4 0,1/0,05	MLO/PO4 0,05/0,05	MLO/PO4 0,05/0,1
pH 5	10	8	14	27	19
pH 7	67	79	69	67	72
pH 8	81	89	77	71	79

35

5.D.a/b

	MLA/PO4	MLA/PO4	MLA/PO4	MLA/BGC	MLA/BGC	MLA/BGC
	0,05/0,05	0,05/0,1	0,1/0,1	0,05/0,05	0,05/0,01	0,1/0,05
5	pH 5:24	17	23	25	17	29
	pH 7:70	77	71	53	36	47
	pH 8:79	89	81	53	35	47

5.E

	MLA/TPL	MLA/KJA	MLA/IDA	MLA/TIR	
	0,1/0,1	0,1/0,1	0,1/0,1	0,1/0,1	
10	pH 5	49	47	46	49
	pH 7	62	43	53	39
	pH 8	62	68	66	63

15

5.F

	MLE/EMA	MLE/TPL	MLE/KJA	MLE/IDA	
	0,1/0,05	0,1/0,1	0,1/0,05	0,1/0,1	
	pH 5	29	45	20	19
20	pH 7	58	64	49	60
	pH 8	58	64	51	71

D'après ces simulations, plusieurs remarques peuvent être formulées.

25

- Les mélanges MLE/MLA (5.B.a) et MLE/MLO (5.B.b) conduisent à l'obtention d'espèces neutres dont le pourcentage est très supérieur à celui de chaque ligand pris séparément : pour le rapport Mg/MLE/MLA égal à 1/1/1, on obtient à pH 5, 7 et 8, respectivement 40, 63 et 63 % à comparer à 13, 49 et 50 % pour MLE et 34, 42 et 42 % pour MLA ; le rapport 1/2/1 est également très favorable. Le cas est sensiblement identique pour MLE/MLO.

30

35 - L'addition de MLE à PO4 (5.C.a) a un effet favorable sur le pourcentage d'espèces neutres, augmenté par rapport à

MLE seul, mais, à pH 5, il n'y a que 10 ou 14 %, ce qui est resté faible.

- 5 - L'addition de MLA à PO₄ (5.D.a) ou de MLO à PO₄ (5.C.b) améliore légèrement la situation en étendant la zone d'existence du magnésium neutre veers les pH acides (20 % à pH 5) ; l'addition de MLA à BGC (5.D.b) a peu d'effet.

10 Par ailleurs, les additions de TPL, KJA, IDA ou TIR à MLA (5.E) constituent des mélanges très intéressants : pourcentage d'espèces neutres plus élevé que MLA seul et zone d'existence des espèces neutres étendue (49 % à pH 5). L'addition à MLE de TPL ou IDA (5.F) conduit également à de bons résultats.

15 II - Tests in vivo

20 Des tests in vivo ont été réalisés en particulier sur les anions suivants : le citrate (CTA), le phosphate (PO₄), le β -glycérophosphate (BGC), le tartrate (TRA), le (L)-malate (MLA), le maléate (MLE) et le malonate (MLO).

25 Les tests in vivo ont été basés sur l'étude complète des bilans du magnésium ingéré. Ceci revient à prendre en compte non seulement le magnésium urinaire, mais aussi la fraction de métal retrouvée dans les fèces et la carcasse des animaux servant de base à l'expérience.

30 De manière générale, on considère en effet que les quantités de magnésium retrouvées dans les fèces correspondent à la fraction de métal non absorbée dans le plasma et que celles dosées dans l'urine se rapportent à la fraction excrétée du plasma. Enfin, celles contenues dans la carcasse représentent la fraction diffusée du plasma vers les tissus.

35

Du point de vue pratique, les urines de rats normaux à jeun ont été recueillies à divers temps déterminés après l'administration orale de solutions contenant le magnésium et le ligand-vecteur. La concentration de ce dernier a été choisie d'après les résultats de la modélisation. La teneur des urines en ions Mg^{2+} a été dosée par spectroscopie d'absorption atomique. Pour permettre d'établir le bilan global des différentes destinations de la dose de magnésium administrée, les fèces et la carcasse ont également été recueillies et analysées. Au titre d'organe le plus vascularisé, le foie a également été prélevé et analysé séparément comme test hypothétique de la diffusion tissulaire.

Plusieurs ligands ont été passés en revue suivant cette technique d'évaluation, afin de discriminer le meilleur vecteur, c'est-à-dire celui correspondant au pourcentage maximum de magnésium retenu par l'organisme.

Protocole expérimental des tests in vivo:

L'étude a été réalisée sur des rats normaux d'environ 100g. 12 h avant le début de l'expérience, les rats ont été pesés et placés dans des cages à métabolisme qui permettent de recueillir séparément l'urine et les fèces. Ils disposaient d'eau désionisée ad libitum, mais ne recevaient aucune nourriture pendant toute la durée de l'expérience.

Au temps $t = 0$ (début de l'expérience), on a administré à chaque rat par gavage au moyen d'une seringue avec aiguille à bout rond, une solution contenant des ions Mg^{2+} sous forme de chlorure, et le ligand-vecteur : la quantité de magnésium à administrer est de 9,7 mg/kg de rat dans un volume de 20 cm^3/kg . Ceci revient à administrer à des rats de 100 g, 4.10^{-5} moles de Mg^{2+} (soit 0,97 mg) dans un

volume de 2 cm³, c'est-à-dire une solution de concentration $2 \cdot 10^{-2}$ mol.dm⁻³ en Mg²⁺.

5 La concentration en ligand a été déterminée dans chaque cas d'après les simulations.

Les rats témoins ont reçu 2 cm³ d'eau désionisée.

Pour les essais préliminaires, seulement 3 produits ont été testés sur 48 rats. Pour les expériences suivantes, 11 séries ont été réalisées comportant chacune 9 rats parmi
10 lesquels le témoin a reçu H₂O, un autre MgCl₂ et les sept autres chacun un produit différent. Les sept ligands ont donc pu être comparés entre eux, à H₂O et à MgCl₂.

Les urines ont été prélevées aux temps $t = 1, 4, 8$ et 24 h
15 après le gavage ($t = 0$), en notant le volume recueilli. Les fèces ont été prélevées uniquement à la fin de l'expérience ($t = 24$), puis les rats ont été sacrifiés. Le foie et le système digestif (estomac et intestin) ont été
20 séparés du reste de la carcasse.

Technique d'analyse des tests in vivo:

Parmi les nombreuses méthodes de dosage des ions métalliques, a été utilisée la spectroscopie d'absorption
25 atomique (S.A.A.), technique très fiable et très précise. Les mesures ont été effectuées sur un spectrophotomètre à flamme Perkin Elmer, modèle 373, possédant une cathode multi-éléments réglée sur la longueur d'onde du magnésium ($\lambda = 285,2$ nm).

30 L'étalonnage de l'appareil a été effectué avant chaque série d'analyses en mesurant l'absorbance de solutions de MgCl₂ de concentrations variant de $6 \cdot 10^{-7}$ à $2 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³, limites inférieure et supérieure de détection de l'appareil, et en traçant les courbes d'étalonnage $A = f$
35 (CMg).

Il a été tenu compte, dans la préparation des

échantillons, des deux points particuliers suivants :
obtention de solutions parfaitement limpides et situation
des concentrations en ions Mg^{2+} dans la zone de linéarité
de la relation entre absorbance et concentration.

5

Les différents échantillons ont été préparés de la façon
suivante :

- urine : à chaque relevé, le volume d'urine a été dilué 2
fois dans HNO_3 (0,4 N), puis chaque échantillon a été
10 analysé après dilution convenable dans de l'eau désionisée
(2 cm³ dans 200 cm³ ou 1 cm³ dans 100 cm³).

- carcasse : la carcasse a été broyée ; à 5 g de celle-ci
ont été ajoutés 20 cm³ de $HNO_3/HClO_4$ (9/1) concentrés ;
après 48 h, la solution obtenue a été chauffée à 90°C
15 pendant 30 min ; après refroidissement, on a dilué 1 cm³
de cette solution dans 200 cm³ pour l'analyse par S.A.A.

- foie : le foie a été pesé (poids x) puis potterisé avec
4 x cm³ d' H_2O ; 1 cm³ de cet homogénat a été dilué dans 4
cm³ de $HNO_3/HClO_4$ (9/1) concentrés ; après 48 h, cette
20 solution a été chauffée à 90°C pendant 30 min, puis on a
dilué 0,5 cm³ de cette solution dans 20 cm³ pour l'analyse
par S.A.A.

- fèces : les fèces proprement dites, l'intérieur du tube
digestif et 2 cm³ d'eau de rinçage, ont été pesées (poids
25 x), puis diluées dans un volume x de $HNO_3/HClO_4$ (9/1) ;
après 48 h, la solution a été chauffée à 90°C pendant 30
min, puis on a dilué 0,5 cm³ de cette solution dans 100
cm³ pour l'analyse par S.A.A.

30 A partir de la mesure de l'absorbance de chaque
échantillon, on déduit de la courbe d'étalonnage sa
concentration molaire en magnésium, compte tenu de sa
dilution ; on déduit alors le nombre de moles et la
concentration du magnésium présents dans les urines, la
35 carcasse, le foie et les fèces. Les résultats obtenus ont
été traités par un programme d'analyse statistique

informatique.

Résultats préliminaires des tests in vivo :

- 5 Lors d'investigations préliminaires limitées à l'examen des seules excréctions urinaires, et réalisées avec uniquement trois produits, certaines observations ont déjà pu être relevées.
- 10 La première concerne la faible mesure de l'ensemble des volumes d'urine prélevés, due au fait que l'expérience était programmée pendant la journée, durant la période d'inactivité des animaux. On a cependant pu noter une diminution de l'excrétion urinaire pour certains rats
- 15 ayant reçu le magnésium en présence d'un ligand-vecteur : 1 h après gavage, alors que les rats recevant H₂O et MgCl₂ urinaient 1,3 cm³ (moyenne sur 48 rats), ceux recevant Mg/BGC et Mg/MLA excrétaient des volumes nettement inférieurs : 0,6 et 0,7 cm³ respectivement.
- 20 L'analyse statistique de ces résultats a montré que les écarts observés étaient significatifs.
- De plus, outre les écarts observés sur les volumes
- 25 d'urine excrétés, on a également noté une différence importante dans les quantités de magnésium correspondantes :
- 30 - d'une part, les quantités de magnésium urinées par les groupes d'animaux recevant Mg/BGC ou Mg/MLA étaient inférieures à celles produites par les rats gavés avec H₂O ou MgCl₂ ;
- d'autre part, les animaux recevant Mg/BGC excrétaient plus de magnésium que ceux traités avec Mg/MLA.
- 35 Cette tendance s'est poursuivie globalement jusqu'à 4 h après gavage, durée d'observation recommandée par différents auteurs.

Ces premiers tests ont été essentiels en ce qu'ils ont permis d'établir que l'ion Mg^{2+} ne peut être absorbé par voie orale qu'en présence d'un ligand-vecteur adéquat. En effet, aucune différence notable n'a été décelée entre
5 les rats ayant reçu H_2O et ceux ayant reçu du $MgCl_2$, alors qu'une réduction de l'excrétion urinaire a été noté chez certains rats ayant reçu le magnésium associé à un vecteur.

10

Il est à noter que dans aucun cas, on n'a retrouvé dans l'urine la totalité du magnésium administré : ceci a confirmé l'utilité du dosage du magnésium dans les fèces, le foie et la carcasse pour les expériences suivantes.

15

A ce stade, les quantités de magnésium retrouvées dans l'urine sont donc apparues comme un bon indice de l'absorption gastro-intestinale de ce métal.

20 Deux remarques complémentaires ont également paru dignes d'intérêt :

- il est probable que le vecteur facilitant l'absorption gastro-intestinale du magnésium atteigne dans le plasma
25 une concentration suffisamment importante, prédominante par rapport aux autres substances de ce milieu, de sorte qu'il favorise en plus la diffusion tissulaire du métal. Il a donc paru souhaitable de programmer à l'avenir l'analyse du magnésium urinaire sur des temps relativement plus longs ;

30

- l'examen de ces résultats a, de plus, désigné la réduction du volume d'urine excrété comme indice possible de cette pénétration tissulaire. Il a donc été décidé d'analyser par la suite les deux paramètres parallèlement.

35

Résultats des tests in vivo :

La même méthode a été utilisée pour tester les sept ligands-vecteurs choisis parmi ceux susceptibles d'optimiser l'absorption gastro-intestinale du magnésium. Comme il est précisé dans la description du protocole expérimental, les 99 rats utilisés pour cette expérience ont été répartis en 11 séries de 9 rats. Pour chaque série, la composition des solutions administrées est rapportée dans le Tableau 6 ci-dessous, où les concentrations sont exprimées en mol.dm⁻³:

Tableau 6

Solution	ligand	MgCl ₂
15 O	H ₂ O (témoin)	-
A	CTA : 0,05	0,02
B	BGC : 0,10	0,02
C	MLA : 0,07	0,02
D	MLE : 0,07	0,02
20 E	MLO : 0,04	0,02
F	PO ₄ : 0,05	0,02
G	TRA : 0,05	0,02
H	-	0,02

25 a) - Analyse statistique des résultats.

Le programme informatique utilisé a nécessité la création d'un fichier de données comportant, outre la variable qualitative relative au produit administré et la variable quantitative relative au poids du rat, les variables quantitatives relatives aux volumes d'urine excrétés et celles relatives aux quantités de magnésium excrétées ou tissulaires.

35 En ce qui concerne les volumes d'urine, on a mesuré les volumes recueillis 1h, 4h, 8h et 24h après le gavage

(désignés par vu1, vu4, vu8 et vu24), et les volumes totaux obtenus après 4h, 8h et 24h (désignés par vub4, vub8 et vubt respectivement).

5 De même, les quantités de magnésium urinaire excrétées 1h, 4h, 8h et 24h après le gavage ont été désignées par mgu1, mgu4, mgu8 et mgu24, et les quantités totales obtenues 4h, 8h et 24h après le gavage par mgub4, mgub8 et mgut respectivement.

10

De plus, on a désigné les quantités de magnésium excrétées par voie fécale, mg-fèces (ou mg-f), contenues dans la carcasse, mg-c, et dans le foie, mg-foie.

15 Les valeurs prises par toutes ces variables ont été rapportées à un poids de rat standard de 100 g afin de faciliter leur comparaison par rapport à une référence commune.

20 Sur la base de ce fichier de données, le programme calcule pour chaque produit la moyenne de chaque variable, son écart-type, et en analyse la variance. Ces moyennes ont ensuite été comparées, deux à deux, par le test de Student. Les résultats ont été visualisés au moyen
25 d'histogrammes tracés par un programme annexe. Seuls les histogrammes correspondants à vubt, mgut, et mg-feces (mg-f) ont été représentés sur les figures 22, 23 et 24 dans lesquelles les valeurs moyennes apparaissent en ligne à tirets.

30

b) - Résultats et Discussion:

Deux remarques préliminaires sont à noter : les animaux utilisés ont un poids moyen de 90,766 +/- 0,650g, avec un
35 coefficient de variation de 7,13% et une variance des écarts-type non significative.

Pour commencer, la mise en perspective de l'évolution des quantités de magnésium excrétées par les voies fécale (EF) et urinaire (EU) (voir les histogrammes des figures 22 et 23) conduit à observer quatre situations distinctes pour les produits symbolisés de A à H.

I. EF faible : A, C, D, E, F

10 I.a EU faible : C, E, (F)
I.b EU élevé : A, D, (F)

II.EF élevée : B, G, H

15 II.a EU faible : B, H
II.b EU élevé : G

L'observation d'une excrétion fécale faible est le premier indice d'une bonne absorption digestive du produit. On classera donc d'emblée les vecteurs A, C, D, E, F comme a priori supérieurs à B, G, H, du point de vue de leur efficacité vis-à-vis de l'objectif initialement fixé. Cependant, si l'on désire considérer l'efficacité réelle de ces différents vecteurs, c'est-à-dire par rapport à la diffusion tissulaire du magnésium, les deux termes de la précédente alternative vont être majorés ou minorés selon le degré de l'excrétion urinaire connexe. On va ainsi observer deux catégories extrêmes de produits pour lesquels vont se conjuguer :

30 - excrétions fécale et urinaire faibles : c'est le cas de C, E et F (?) qui vont être sélectionnés comme les plus efficaces,

35 - excrétions fécale et urinaire élevées : c'est le cas de G qui apparaît comme le moins intéressant.

Le problème de la discrimination entre produits à retenir et à écarter (second choix mais sans véritable exclusion) se complique lorsque se combinent :

5

- excrétion fécale faible et excrétion urinaire élevée :
c'est le cas de A, D et F (?).

10

- excrétion fécale élevée et excrétion urinaire faible :
c'est le cas de B.

15

Ainsi, B qui semblait devoir être écarté du point de vue de l'absorption gastro-intestinale proprement dite, peut très bien se révéler finalement très intéressant si la fraction de magnésium qu'il permet d'absorber, apparemment relativement faible par rapport à celle de A et D par exemple, est par contre effectivement retenue dans les tissus alors que celles correspondant à A et D le sont dans une bien moindre mesure.

20

25

La prise en considération des volumes d'urine recueillis, suggérée lors des études préliminaires, s'est révélée dans ce cas d'une grande utilité. Si l'on examine l'histogramme de la figure 22, on constate que B et E correspondent aux volumes d'urine les plus faibles, ce qui d'une part tend à confirmer la sélection de E comme vecteur efficace et, d'autre part, incite à retenir B. Par contre, il est à noter que C, retenu plus haut parmi les vecteurs a priori les plus efficaces, se classe dans le groupe moyen correspondant au témoin 0. Il en est de même pour F. A l'opposé, A et D bénéficiant d'une excrétion fécale faible ne semblent cependant pas à retenir, puisque provoquant à la fois une excrétion et un volume urinaires importants.

35

On a finalement résumé ces résultats dans le Tableau 7

faisant apparaître les deux variables relatives aux bilans magnésiens (EF et EU) ainsi que celle relevant des effets physiologiques (VU) où les produits les plus efficaces seraient ceux bénéficiant du nombre maximum de symboles + dans une classification relative de + à - :

Tableau 7

	EF	EU	VU
10	-----		
A :	++	-	0
B :	--	++	++
C :	++	+	0
D :	+	--	--
15 E :	0	++	++
F :	+	0	0
G :	--	--	0
H :	-	+	0

20 Le classement final de ces tests comparatifs est donc E > B > C, c'est-à-dire malonate > β -glycérophosphate > (L)-malate.

III - Acide malique

25 Les études précédentes ont permis de sélectionner sur critères scientifiques (opérations et tests in vivo) l'acide malique comme vecteur susceptible d'optimiser l'absorption du magnésium par un organisme humain ou
 30 animal. Par ailleurs, ce composé apparait particulièrement intéressant en matière pharmaceutique et diététique pour les raisons suivantes : il est ingérable (abondant dans la pomme et d'autres fruits) et dénué de toxicité. De plus, sa forme (DL)-malique est d'un coût de fabrication
 35 raisonnable.

L'acide malique existe sous la forme de deux isomères optiques : le (L)-malique (MLA), produit initialement étudié, et le (D)-malique (DMA). Il existe aussi le (DL)-malique (DLM), mélange racémique des formes D et L.

5

Il a donc été nécessaire de s'assurer que les propriétés chimiques de ces composés étaient identiques à celles du (L)-malique.

10 Une étude systématique selon la méthode précédemment exposée a été effectuée sur l'acide (D)-malique, l'acide racémique (DL)-malique de qualité pour analyses et l'acide (DL)-malique provenant de l'usine GIVAUDAN-LAVIROTTE.

15 Les constantes de protonation de ces produits et les constantes de formation de leurs complexes de magnésium sont respectivement rapportées dans les Tableaux 2 et 3 présentés ci-avant. Les valeurs obtenues pour tous ces produits sont très voisines et les simulations de la répartition des complexes du magnésium en fonction du pH montrent que le pourcentage d'espèce neutre ML est
20 sensiblement identique pour tous :

- pour une concentration de $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ en magnésium et de $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ en ligand, il existe 50% d'espèce neutre ML de pH 5 à 8 avec 30% d'espèce ML₂ (figure 25 illustrant la simulation pour l'acide (DL)-malique d'usine).

25 - pour une concentration en magnésium et ligand égale à $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, il se forme 44% d'espèce ML et 10% d'espèce ML₂ (figure 26 - acide (DL)-malique d'usine).

Pour les conditions de concentration du fluide gastro-intestinal, la simulation calculée avec le programme
30 TRIPLLOT montre que le pourcentage d'espèce neutre est maximum (50% à pH 8) lorsque, pour une concentration en magnésium de $0,04 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, la concentration en ligand est de $0,076 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. En présence d'une concentration en calcium égale à celle de magnésium ($0,04 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), on
35 obtient le même pourcentage pour une concentration en ligand égale à $0,132 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Par ailleurs, la simulation des variations de la concentration du malate dans le plasma sanguin à partir de la concentration moyenne physiologique normale de celui-ci ($3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) révèle un accroissement très significatif du pourcentage de complexe neutre ML (à ligand malate) en fonction de l'augmentation de la concentration du malate CMLA. Ces résultats sont illustrés dans le Tableau 8 ci-dessous dans lequel :

10 % Mg : représente le pourcentage de la fraction de Mg ultra filtrable disponible dans le plasma sous forme de métal libre.

% NMg : représente le pourcentage de la fraction de la totalité de complexes neutres de l'ion Mg^{2+} (NMg) par rapport à la fraction ultra filtrable disponible.

15 % ML : représente le pourcentage de la fraction du complexe neutre "malate/ Mg^{2+} " (ML) par rapport à la fraction ultra filtrable disponible.

% ML/NMg : représente en % le rapport de la fraction de complexes neutres "malate Mg^{2+} " (ML) sur la fraction de la totalité des complexes neutres de l'ion Mg^{2+} (NMg).

20

Tableau 8

25	CMLA ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	% Mg	% NMg dont	% ML	% ML/NMg
	$3,5 \cdot 10^{-5}$	75,4	7,9	0,1	1,3
	$1,1 \cdot 10^{-4}$	75,1	8,1	0,4	4,9
30	$3,5 \cdot 10^{-4}$	74,5	8,9	1,2	13,5
	$1,1 \cdot 10^{-3}$	72,5	11,2	3,7	33,0
	$3,5 \cdot 10^{-3}$	66,7	17,5	10,7	61,1
	$1,1 \cdot 10^{-2}$	52,7	30,8	25,5	82,8
	$3,5 \cdot 10^{-2}$	30,5	44,6	41,5	93,0

35

Il résulte de ce qui précède que le malate est également susceptible de favoriser sensiblement l'absorption tissulaire du magnésium à partir du plasma par l'augmentation importante de la concentration de complexe neutre "malate/Mg²⁺" dans le plasma résultant du transfert de l'ion malate à partir du fluide gastro-intestinal soit sous la forme neutre complexée avec le magnésium, soit sous la forme neutre protonée (acide non dissocié).

10 Ainsi donc l'utilisation de l'acide (DL)-malique dans les compositions pharmaceutiques et diététiques apparaît tout à fait recommandée. Cette conclusion a été confirmée par les deux expérimentations in vivo sur des rats mettant en jeu l'acide (DL)-malique et rapportées ci-après.

15

A - Expérimentation sur des rats carencés.

Des rats mâles S.P.F. de souche CD, de 70g environ, reçoivent "ad libitum" une alimentation pratiquement dépourvue de magnésium et, comme boisson, de l'eau déminéralisée.

20 3 jours après ce régime, les animaux présentent une nette diminution du taux de magnésium dans le plasma, les érythrocytes et les fémurs (cf. Témoins carencés dans les Tableaux 9 et 10 ci-après).

Deux essais ont permis de mettre en évidence l'absorption du magnésium chez ces animaux carencés :

Premier essai:

30 Il a consisté à administrer, par voie orale, une seule dose de l'association "magnésium + acide malique", soit 9,72 mg/kg Mg²⁺ sous un volume de 10 ml/kg.

Des prélèvements ont été effectués 24 h après cette administration pour les dosages de magnésium érythrocytaire, plasmatique et fémoral.

35

L'examen des résultats, reportés dans le Tableau 9, montre

L'examen des résultats, rapportés dans le Tableau 9, montre une augmentation significative du magnésium plasmatique après le traitement.

5

Tableau 9

M A G N E S I U M				
	Plasmatique mmol/l	Erythrocytaire mmol/l	Fémoral mmol/kg cendres	
10				
15	Témoins normaux n = 15	0,73	3,24	267
	Témoins carencés n = 15	0,360***	2,56***	207***
20	Traités carencés 1 dose de Mg ²⁺ n = 15	0,404*	2,73	208

*** Comparaison Témoins normaux/Témoins carencés : P < 0,001

25

* Comparaison Témoins carencés/Traités carencés : P > 0,05

Deuxième essai:

30 Il a consisté à administrer, par voie orale, une dose matin et soir pendant 3 jours, soit 6 doses au total, de l'association "magnésium + acide malique" à raison de 9,72 mg/kg Mg²⁺/dose sous un volume de 10 ml/kg.

35 Des prélèvements ont été effectués 17 h après la dernière administration pour les dosages de magnésium plasmatique,

érythrocytaire et fémoral.

L'examen des résultats, rapportés dans le Tableau 10, montre une augmentation significative du magnésium plasmatique, érythrocytaire et fémoral après le traitement.

10 Tableau 10

	Plasmatique en mmol/l	Erythrocytaire en mmol/l	Fémoral mmol/kg
15	-----		
	Témoins normaux	0,80 n = 14	3,32 n = 14
			278 n = 15

20	Témoins carencés	0,44*** n = 14	2,52** n = 14
			196*** n = 15

	Traités		
25	6 doses Mg ²⁺	0,62** n = 15	2,86** n = 15
			215** n = 15

*** Comparaison Témoins normaux/Témoins carencés:P <0,001

* Comparaison Témoins carencés/Traités carencés:P <0,05

30

Ces deux essais permettent de conclure que dans les carences d'apport (régime pratiquement dépourvu de magnésium), le magnésium de la formule est bien absorbé par les animaux carencés en magnésium pour conduire au rétablissement rapide de la teneur normale pour ce métal.

35

B - Expérimentation sur des rats non carencés.

5 B - 1. Protocole expérimental.

L'essai porte sur 60 rats mâles S.P.F. de souche "CD",
d'un poids moyen de 60 à 80 g à leur arrivée. Ils sont
maintenus en animalerie conventionnelle dans des
10 conditions identiques de température ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$),
d'hygrométrie (40 à 70 %) et de luminosité (12h/24).

Dès leur arrivée, les animaux sont placés en cage à
métabolisme et reçoivent un aliment contenant 570 mg de
15 Mg^{2+}/kg : concentration nécessaire et suffisante pour
maintenir chez l'animal une magnésémie normale.

4 jours après leur arrivée, au temps "t-16h" de l'essai,
soit 16 h avant l'administration des traitements (temps
20 "t"), les animaux sont pesés, mis à jeun et le volume
d'eau déminéralisée mis à leur disposition est exactement
mesuré.

Au temps "t-1h" soit 1 h avant l'administration des
25 traitements, l'eau de boisson est retirée. Elle est
redistribuée 30 minutes après cette administration, le
volume étant exactement mesuré.

Au temps "t+24h" les animaux sont sacrifiés par
30 dislocation cervicale et le contenu de la vessie et du
tube digestif est prélevé.

Les animaux sont répartis en 3 lots de 20 animaux chacun :
. Lot I : Témoins recevant 40 ml/kg d'eau déminéralisée;
35 . Lot II : Traités recevant 38,88 mg de Mg^{2+}/kg sous forme
de MgCl_2 , sous un volume de 40 ml/kg d'eau déminéralisée ;

- . Lot III : Traités recevant l'association "MgCl₂ + acide malique" à la dose de 38,88 mg de Mg²⁺/kg sous forme de MgCl₂ + 408 mg d'acide malique/kg, sous un volume de 40 ml/kg d'eau déminéralisée (pH ajusté à 5,1), ce qui correspond à une concentration en magnésium CMg = 0,04 mol.dm⁻³ et à une concentration de (DL)-malate CDLM = 0,076 mol.dm⁻³.
- 5
- 10 B - 2. Examens.
- A/ - Avant traitement : "t - 16 h" à "t"
. Recueil des urines et mesure du volume.
. Mesure de la consommation hydrique/15 h (les animaux étant privés d'eau de boisson 1 h avant l'administration des traitements).
- 15
- B/ - Traitement : "t"
. Pesée des animaux.
- 20 . Administration des traitements, voie orale, par tubage oesophagien.
- C/ - Après traitement : "t" à "t + 24 h"
C.1. Exploration urinaire :
. Recueil des urines de "t à t + 1 h", de "t + 1 h" à "t + 4 h", de "t + 4 h à t + 8 h" et de "t + 8 h à t + 24 h" après administration des traitements ; les urines contenues dans la vessie étant ajoutées au recueil de "t + 8 h à t + 24 h".
. Mesure des différents volumes et dosage du Mg²⁺ sur chaque fraction.
- 25
- 30
- C.2. Exploration au niveau fécal :
. Recueil des fèces émises pendant 24 h auxquelles sont ajoutées, à "t + 24 h", les fèces contenues dans le tube digestif.
- 35 . Pesée des fèces et dosage de Mg²⁺ sur la totalité des fèces.

C.3. Mesure de la consommation hydrique :

Du point de vue dosage, la méthode colorimétrique à la calmagite a été utilisée pour le magnésium urinaire et
 5 pour le magnésium fécal (après calcination de la totalité des fèces recueillies).

B - 3. Résultats :

Pour les urines, les volumes sont exprimés en ml/100 g de rat et la concentration de magnésium est exprimée en
 10 mg/100 g de rat. Le résultat exprimé par 24 h (par ex : V.U/24 h) est la somme des résultats obtenus à chaque période de recueil.

Pour les fèces, la concentration est exprimée en mg/100 g de rat.

15 Les coefficients du bilan magnésique sont calculés pour les lots II et III d'après les formules suivantes dans lesquelles :

- MgI = Magnésium Ingéré,
 MgF tr. = Magnésium Fécal de l'animal traité.
 20 MFM té. = Magnésium Fécal Moyen des animaux témoins,
 MgM tr. = Magnésium Urinaire de l'animal traité.
 MUM té. = Magnésium Urinaire Moyen des animaux témoins.

. Coefficient d'utilisation digestive (C.u.d.) :

25
$$C.u.d. = \frac{MgI - (MgF \text{ tr.} - MFM \text{ té.})}{MgI} \times 100$$

30 Ce coefficient met en évidence la faculté de passage de la membrane gastro-intestinale pour le surplus de magnésium ingéré (MgI) à partir de l'exploitation de la variation du magnésium recueilli dans les fèces entre le sujet traité et le témoin (absorption gastro-intestinale).

. Coefficient de rétention (C.r.) :

35
$$C.r. = \frac{MgI - ((MgF \text{ tr.} - MFM \text{ té.}) + (MgU \text{ tr.} - MUM \text{ té.}))}{MgI - (MgF \text{ tr.} - MFM \text{ té.})} \times 100$$

Ce coefficient met en évidence la faculté de passage dans les tissus pour le surplus de magnésium ingéré ayant déjà traversé la membrane gastro-intestinale à partir de l'exploitation de la variation du magnésium recueilli dans les urines entre le sujet traité et le témoin (absorption tissulaire).

. Coefficient d'absorption (C. abs.) :

$$C. \text{ abs.} = \frac{\text{MgI} - ((\text{MgF tr.} - \text{MFM té.}) + (\text{MgU tr.} - \text{MUM té.}))}{\text{MgI}} \times 100$$

Ce coefficient met en évidence la faculté d'absorption globale du magnésium ingéré dans les tissus, mettant en jeu les deux mécanismes d'absorption gastro-intestinal et tissulaire.

Pour tous les résultats donnés dans les tableaux 11 et 12 ci-après, le degré de signification des différences traitement "MgCl2"/traitement "MgCl2 + acide malique" est déterminé par le test "t - indépendant" de Student.

Tableau 11

LOT		V.U/24 h	MgU/24 h	MgF/24 h	
25	I	M	10,36	0,568	0,626
		E.T	3,68	0,207	0,318
30	II	M	11,70	1,916	1,652
		E.T	4,44	0,395	0,636
	III	M	9,59	1,241	1,805
		E.T	2,38	0,296	0,620
35		S	NS	S***	NS

Tableau 12

LOT		C.u.d.	C.r.	C. abs.
5	II M	73,617	50,083	38,948
	E.T	16,360	19,717	20,372
10	M	69,683	74,516	51,986
	III E.T	15,946	10,313	14,159
	S	NS	S***	S*

M = Moyenne NS = différence non significative $P > 0,05$

E.T = Ecart-type S* = différence significative $P < 0,05$

S = Signification S*** = différence significative $P < 0,001$

15

L'examen du Tableau 11 montre :

20 . Des volumes urinaires sur 24 h comparables (Il a toutefois été remarqué une réduction sensible du volume urinaire chez les sujets du lot III pendant la période "t" à "t + 1 h").

. Des excrétions urinaires plus faibles de façon très significatives pour le lot III.

Des excrétions fécales comparables pour les lots II et III.

25

30 L'examen du Tableau 12 montre un coefficient d'utilisation digestive comparable pour les deux lots traités, tandis que nous observons une augmentation du coefficient de rétention et d'absorption de Mg^{2+} chez les animaux recevant l'association "MgCl₂+acide malique" par rapport aux traités recevant MgCl₂ seul.

35 La quantité de Mg^{2+} fécale excrétée n'est pas significativement différente entre les deux traitements : MgCl₂ et association "MgCl₂ + acide malique".

L'absorption gastro-intestinale comparable dans les deux lots peut s'expliquer par le fait que ces animaux ont reçu une alimentation contenant une quantité nécessaire et suffisante de magnésium pour maintenir une magnésémie normale dans le plasma.

Par contre, l'excrétion urinaire s'est révélée nettement plus faible chez les animaux recevant l'association "MgCl₂ + acide malique", ce qui signifierait une augmentation de la diffusion tissulaire du Mg²⁺ à partir du plasma. Les coefficients de rétention et d'absorption plus élevés chez ces animaux confirmeraient cette hypothèse.

Ainsi donc, les trois tests présentés dans cet exposé mettant en jeu l'acide (DL)-malique ont tous permis de vérifier l'amélioration de l'absorption du magnésium par un organisme animal que ce soit au niveau gastro-intestinal et/ou tissulaire.

IV - Applications pharmaceutiques et diététiques :

Tous les ligands de l'ion Mg²⁺ pour former avec celui-ci des complexes électriquement neutres présentés ci-avant et administrables dans un organisme humain ou animal, sont susceptibles d'être utilisés comme constituants d'agents-vecteurs favorisant l'absorption du magnésium dans cet organisme. Ils sont susceptibles d'être incorporés dans des compositions pharmaceutiques utilisables en magnésothérapie humaine ou vétérinaire et/ou dans des préparations diététiques pour des suppléments en magnésium dans le cadre de régimes diététiques humain ou animal tout en respectant les domaines de concentration en ligand imposés par les résultats des études de toxicité conformes à la pratique courante dans la profession.

En particulier, sont concernés par l'invention les agents-vecteurs du type comportant un ou plusieurs ligands de l'ion magnésium Mg^{2+} pour former au moins un complexe électriquement neutre au pH de la lumière gastro-intestinale et administrable(s) dans un organisme humain ou animal et présentant, pour être associé dans une solution monométallique à un ou plusieurs sels de magnésium, une concentration en ligand(s) adaptée à la concentration choisie en ion Mg^{2+} pour assurer un pourcentage d'ions magnésium Mg^{2+} sous forme de complexe électriquement neutre au moins égal à 10 % en concentration molaire pour un pH compris entre 6,5 et 8, à l'exclusion des citrate, glutamate et aspartate de magnésium administrés sous leur forme stoechiométrique. De plus, entrent dans le cadre de l'invention les compositions pharmaceutiques et diététiques contenant du magnésium en tant que seul élément métallique actif et au moins un agent-vecteur de type défini ci-dessus.

Parmi d'autres modes de réalisation de l'invention, appartiennent les agents-vecteurs définis ci-dessous :

- Agent-vecteur du type comportant un ou plusieurs composés suivants ou leurs sels d'addition administrables dans un organisme humain ou animal, et agissant en tant qu'apporteur de ligand(s) de l'ion Mg^{2+} : acide tartrique, phosphate de pyridoxal, acide α -glycérophosphorique, acide β -glycérophosphorique, acide maléique, acide malonique, acide éthylmalonique, acide malique, acide iminodiacétique, acide kojique, tiron et tropolone, à l'exception du α -glycérophosphate de magnésium administré sous la forme d'un sel stoechiométrique d' α -glycérophosphate acide double et d'un mélange de $\alpha\beta$ -glycérophosphates de magnésium et de calcium administrés sous forme stoechiométrique. A titre de variante, l'agent-vecteur comporte au moins deux composés pris dans la liste ci-dessus à laquelle s'ajoutent l'acide tartrique, l'acide glutamique, l'acide aspartique et l'acide phosphorique.

- Agent-vecteur du type comportant au moins deux des composés suivants ou leurs sels d'addition administrable dans l'organisme : acide malique, acide maléique, acide α -glycérophosphorique, acide β -glycérophosphorique, acide phosphorique et acide malonique.

- Agent-vecteur du type comportant de l'acide phosphorique en association avec l'un des acides maléique et malique sous la forme acide ou sous la forme de sels d'addition administrables dans l'organisme.

- Agent-vecteur du type comportant de l'acide maléique en association avec l'un des acides malique et malonique sous la forme acide ou sous la forme de sels d'addition administrables dans l'organisme.

- Agent-vecteur du type comportant un des acides maliques et maléique en association avec un des acides kojique, iminodiacétique, tiron et tropolone sous la forme acide ou sous la forme de sels d'addition administrables dans l'organisme.

D'autres compositions pharmaceutiques ou diététiques entrant dans le cadre de l'invention sont constituées à partir d'un ou plusieurs agents-vecteurs ci-dessus définis en association ou non avec un autre composé ou sel apporteur de magnésium (pour former préalablement ou postérieurement à leurs administrations au moins un complexe électriquement neutre avec l'ion Mg^{2+}) et/ou à partir des complexes électriquement neutres de l'ion Mg^{2+} du type $MgLp$ et/ou du type $MgLpHr$. En sont également exclues les compositions déjà commercialisées sous la forme de sels stoechiométriques de magnésium (et dans ce strict rapport stoechiométrique) en tant qu'éléments apporteurs de magnésium, notamment l'aspartate, le citrate et le glutamate.

A titre d'exemple non limitatif, l'apport en magnésium est réalisé sous la forme de carbonate de magnésium additionné de soude afin de stabiliser la solution administrable
 5 autour d'un pH de 4/5 pour le confort du sujet-utilisateur. Grâce à l'élimination du bioxyde de carbone sous forme gazeuse, la quantité nécessaire d'agent neutralisant reste faible ce qui diminue d'autant la concentration en ion Na⁺ dans la solution administrable
 10 (l'ion sodium n'agissant pas à titre d'élément métallique actif de la composition ainsi préparée). Une telle composition est recommandée pour des sujets soumis à un régime sans sodium.

15 Préférentiellement les compositions selon l'invention sont conditionnées sous forme de préparations administrables dans l'organisme par voie orale ou parentérale. En ce qui concerne l'administration par voie orale, les compositions pharmaceutiques et diététiques selon l'invention peuvent
 20 apparaître sous forme de solutions aqueuses prépréparées, éventuellement à diluer, ou sous forme de compositions à dissoudre dans un verre d'eau.

Un exemple de solution préparée pour 100 cm³ est donné dans la formule ci-dessous :

25

FORMULE POUR 1 DOSE

Acide (DL)-malique :	1,05 g	# 7,83 mmol
Magnésium (MgCl ₂) :	0,10 g	# 4,11 mmol
NAOH qsp pH 5 :	0,28 g	# 7,0 mmol
30 Saccharose :	2,00 g	
Jus de fruit :	40 cm ³	
Eau qsp :	100 cm ³	
pH final	=	4,5

35 Les concentrations optimales du ligand CL ont déjà été données au Tableau 4 pour les divers ligands étudiés pour

un apport d'ion Mg^{2+} de 100 mg dans 100 cm³ soit $CMg = 0,04 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (apport correspondant environ au tiers du besoin journalier en magnésium d'un sujet humain adulte, 300 mg/j). Pour le ligand (DL)-malate, cette concentration optimale CL est de $0,076 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

En ce qui concerne les intervalles de concentration recommandés pour ces ligands, il faut remarquer que les concentrations maximales sont imposées par des limites de solubilité et/ou de toxicité des produits. Par contre, les concentrations minimales de ligand ont été obtenues par simulation comme correspondant à au moins 10% en concentration molaire d'ions Mg^{2+} complexés sous forme neutre et pour la dose minimum de magnésium considérée comme efficace soit 25 mg pour 200 cm³ maximum ($CMg = 0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Ces concentrations minimum sont données en $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ dans le Tableau 12 ci-dessous :

	I	I	I	I
20	I Vecteur	I	I Concentration minimum	I
	I Glutamate	I	I 0,0150	I
	I Aspartate	I	I 0,0200	I
	I Citrate	I	I 0,0050	I
25	I Tartrate	I	I 0,0088	I
	I Phosphate	I	I 0,0010	I
	I Phosphate de pyridoxal	I	I 0,0025	I
	I α -Glycérophosphate	I	I 0,0020	I
	I β -Glycérophosphate	I	I 0,0011	I
30	I $\alpha\beta$ -Glycérophosphate	I	I 0,0011	I
	I Maléate	I	I 0,0021	I
	I Malonate	I	I 0,0017	I
	I Ethylmalonate	I	I 0,0025	I
	I L-Malate	I	I 0,0020	I
35	I D-Malate	I	I 0,0020	I
	I DL-Malate	I	I 0,0020	I

53

I Iminodiacétate	I	0,0030	I
I Kojate	I	0,0060	I
I Tropolonate	I	0,0040	I
I Tironate	I	0,0010	I

5

Par ailleurs, mais toujours dans le cadre de l'invention, de nouveaux complexes relativement stables de l'ion Mg^{2+} ont été présentés et mis en évidence expérimentalement, plus particulièrement les complexes, notamment ceux électriquement neutres, du type $MqLp$ ou du type $MqLpHr$ où M représente l'ion Mg^{2+} , H représente le proton et L représente un ligand choisi dans le groupe suivant : tartrate, phosphate de pyridoxal, maléate, malonate, éthylmalonate, malate (L-malate, D-malate, DL-malate), iminodiacétate, kojate, tropolonate et tironate. Il est entendu que l'utilisation de ces complexes comme constituant de médicament, en particulier de médicament applicable à la magnésothérapie humaine et vétérinaire et/ou comme constituant de préparations diététiques destinées aux suppléments dans le cadre de régimes diététiques humain ou animal, entre dans le cadre de l'invention.

REVENDEICATIONS

1. Agent-vecteur facilitant l'absorption d'une dose
5 efficace de magnésium dans un organisme humain ou animal,
en tant que seul élément métallique actif, caractérisé en
ce qu'il comporte un ou plusieurs ligands de l'ion
magnésium Mg^{2+} pour former au moins un complexe
10 électriquement neutre au pH de la lumière gastro-
intestinale et administrable(s) dans l'organisme et en ce
qu'il présente, pour être associé dans une solution
monométallique à un ou plusieurs sels de magnésium, une
concentration en ligand(s) adaptée à la concentration
choisie en ion Mg^{2+} pour assurer un pourcentage d'ions
15 magnésium sous forme de complexe électriquement neutre au
moins égal à 10% en concentration molaire pour un pH
compris entre 6,5 et 8, à l'exclusion des citrate,
glutamate et aspartate de magnésium administrés sous leur
forme stoechiométrique.

20

2. Agent-vecteur selon la revendication 1, caractérisé en
ce que, par administration orale chez le rat, en
association avec un sel témoin de magnésium du type sel
ionique fortement dissociable notamment le chlorure de
25 magnésium, il favorise la réduction de la quantité de
magnésium excrété par voie fécale et/ou urinaire par
rapport aux quantités correspondantes résultant de
l'administration par voie orale du seul sel témoin de
magnésium.

30

3. Composition de pharmacie ou de diététique humaine ou
vétérinaire, caractérisée en ce qu'elle contient du
magnésium en tant que seul élément métallique actif et
comporte au moins un agent-vecteur selon l'une des
35 revendications précédentes, à l'exclusion des citrate,
glutamate et aspartate de magnésium administrés sous leur

forme stoechiométrique.

4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'agent-vecteur est associé à un composé ionique administrable dans un organisme humain ou animal, facilement dissociable en solution aqueuse et susceptible de libérer l'ion Mg^{2+} en vue de sa complexation.
5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'agent-vecteur est associé à du carbonate de magnésium accompagné éventuellement d'un composé neutralisant en quantité suffisante pour stabiliser autour de 4/5 le pH de la solution administrable correspondante.
6. Composition selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 25 mg d'élément métallique magnésium, administrables dans 200 cm^3 maximum d'une solution aqueuse et correspondants à une concentration minimum de 0,005 $mol \cdot dm^{-3}$, associés à un agent-vecteur dont la concentration assure un pourcentage d'ions magnésium sous forme de complexe électriquement neutre au moins égal à 10 % en concentration molaire.
7. Utilisation d'un agent-vecteur selon l'une des revendications 1 et 2 et/ou d'une composition selon l'une des revendications 3 à 6 à la magnésothérapie humaine ou vétérinaire et/ou aux suppléments magnésiennes dans le cadre de régimes diététiques humain et animal.
8. Agent-vecteur facilitant l'absorption du magnésium dans un organisme humain ou animal et destiné à être administré soit en tant que seul apporteur de magnésium, soit en association avec un autre composé apporteur de magnésium, caractérisé en ce qu'il contient un ou plusieurs des composés suivants ou de leurs sels d'addition administrables dans l'organisme, et agissant en

tant qu'apporteur de ligand de l'ion Mg^{2+} : acide tartrique, phosphate de pyridoxal, acide α -glycérophosphorique, acide β -glycérophosphorique, acide maléique, acide malonique, acide éthylmalonique, acide malique, acide iminodiacétique, acide kojique, tiron et tropolone, à l'exception du α -glycérophosphate de magnésium administré la forme d'un sel stoechiométrique d' α -glycérophosphate acide double et d'un mélange de α -glycérophosphates de magnésium et de calcium administrés sous forme stoechiométrique.

9. Agent-vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il contient au moins deux des composés suivants ou leurs sels d'addition administrables dans l'organisme : composés appartenant à la liste donnée dans la revendication 8, acide citrique, acide glutamique, acide aspartique et acide phosphorique.

10. Agent-vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il contient au moins deux des composés suivants ou leurs sels d'addition administrables dans l'organisme : acide malique, acide maléique, acide α -glycérophosphorique, acide β -glycérophosphorique, acide phosphorique et acide malonique.

11. Agent vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il contient de l'acide phosphorique en association avec l'un des acides malique et maléique sous la forme acide ou sous la forme de sels d'addition administrables dans l'organisme.

12. Agent-vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il contient de l'acide maléique en association avec l'un des acides malique et malonique sous la forme acide ou sous la forme de sels d'addition administrables dans l'organisme.

13. Agent-vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il contient un des acides malique et maléique en association avec un des acides kojique, iminodiacétique, tiron et tropolone sous la forme acide ou sous la forme de sels d'addition administrables dans l'organisme.

14. Composition de pharmacie ou de diététique humaine ou vétérinaire, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un agent-vecteur selon l'une des revendications 8 à 13, éventuellement associé avec un autre composé ou sel apporteur en magnésium pour former préalablement ou postérieurement à son administration avec l'ion Mg^{2+} au moins un complexe électriquement neutre.

15

15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'agent-vecteur est associé à du carbonate de magnésium éventuellement accompagné d'un composé neutralisant en quantité suffisante pour stabiliser autour de 4/5 le pH de la solution administrable correspondante.

16. Composition selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 25 mg d'élément métallique magnésium, administrables dans 200 cm^3 maximum d'une solution aqueuse correspondant à une concentration minimum de 0,005 $mol \cdot dm^{-3}$, associés à un agent-vecteur dont la concentration minimum correspondante exprimée en $mol \cdot dm^{-3}$ est définie dans le tableau ci-après :

	Agent-vecteur	:	Concentration minimum
35	Tartrate	:	0,0088
	Phosphate de pyridoxal:		0,0025

	α -glycérophosphate	:	0,0020
	$\alpha\beta$ -glycérophosphate	:	0,0011
	β -glycérophosphate	:	0,0011
	Maléate	:	0,0021
5	Malonate	:	0,0017
	Ethylmalonate	:	0,0025
	Malate	:	0,0020
	Iminodiacétate	:	0,0030
	Kojate	:	0,0060
10	Tropolonate	:	0,0040
	Tironate	:	0,0010

15 17. Composition selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisée en ce que l'agent-vecteur contient de l'acide (DL)-malique ou un de ses sels administrables dans l'organisme, la concentration en ligand (DL)-malate étant de préférence égale à 0,076 mol.dm⁻³ pour une concentration de magnésium égale à 0,04 mol.dm⁻³.

20 18. Composition selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisée en ce que l'agent-vecteur contient de l'acide $\alpha\beta$ -glycérophosphorique ou un de ses sels administrables dans l'organisme, la concentration en ligand $\alpha\beta$ -glycérophosphate étant de préférence égale à 0,048 mol.dm⁻³ pour une concentration de magnésium égale à 0,04 mol.dm⁻³.

30 19. Composition de pharmacie ou de diététique humaine ou vétérinaire, caractérisée en ce qu'elle comporte l'ion citrate et/ou l'ion glutamate et/ou l'ion aspartate à titre de ligand d'au moins 25 mg d'ion Mg²⁺ administrables dans une solution aqueuse de 200 cm³ environ, correspondant à une concentration de 0,005 mol.dm⁻³, pour former un complexe électriquement neutre de l'ion Mg²⁺, selon une concentration minimale de 0,005 mol.dm⁻³ pour l'ion citrate seul, de 0,015 mol.dm⁻³ pour

l'ion glutamate seul et de $0,020 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pour l'ion aspartate seul, à l'exception des citrate de magnésium, glutamate de magnésium et aspartate de magnésium administrés sous leur forme stoechiométrique, la concentration du ligand seul, citrate, glutamate et aspartate étant de préférence égale à $0,16 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pour une concentration d'ion Mg^{2+} égale à $0,04 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

20. Composition de pharmacie ou de diététique humaine ou vétérinaire, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 25 mg d'ion Mg^{2+} , en tant que seul élément métallique, administrables dans une solution aqueuse de 200 cm^3 environ correspondant à une concentration de $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ et associés à l'ion phosphate selon une concentration minimale de $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pour former un complexe électriquement neutre de l'ion Mg^{2+} , la concentration en ligand phosphate étant de préférence égale à $0,16 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pour une concentration d'ion Mg^{2+} égale à $0,04 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

21. Composition selon l'une des revendications 14 à 20, caractérisée en ce qu'elle comporte du carbonate de magnésium accompagné éventuellement d'un composé neutralisant en quantité suffisante pour stabiliser autour de $4/5$ le pH de la solution administrable correspondante.

22. Composition selon l'une des revendications 3 à 6 et 14 à 21, caractérisée en ce qu'elle est conditionnée sous forme de préparation administrable dans l'organisme par voie orale ou par voie parentérale.

23. Complexes, notamment complexes électriquement neutres, de l'ion magnésium Mg^{2+} du type MqLp et/ou du type MqLpHr où M représente l'ion Mg^{2+} , H représente le proton et L représente un ligand choisi dans le groupe suivant: tartrate, phosphate de pyridoxal, maléate, malonate, éthylmalonate, malate, iminodiacétate, kojate, tropolonate

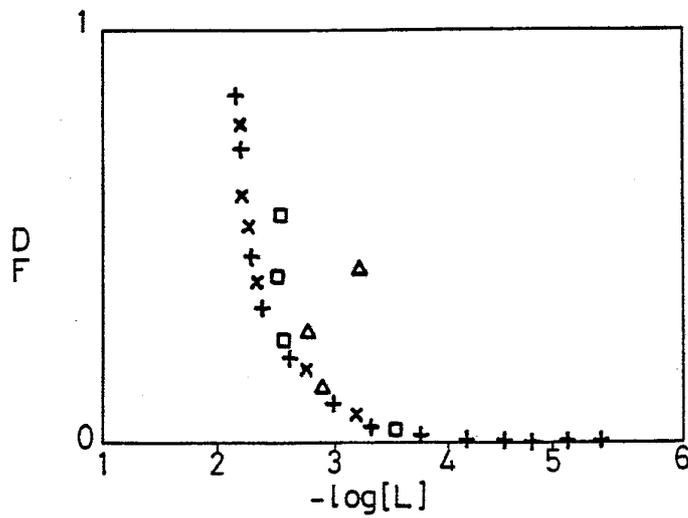
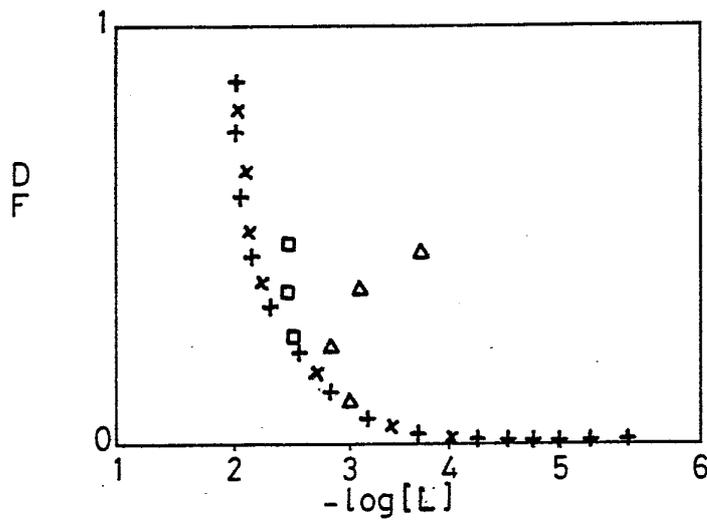
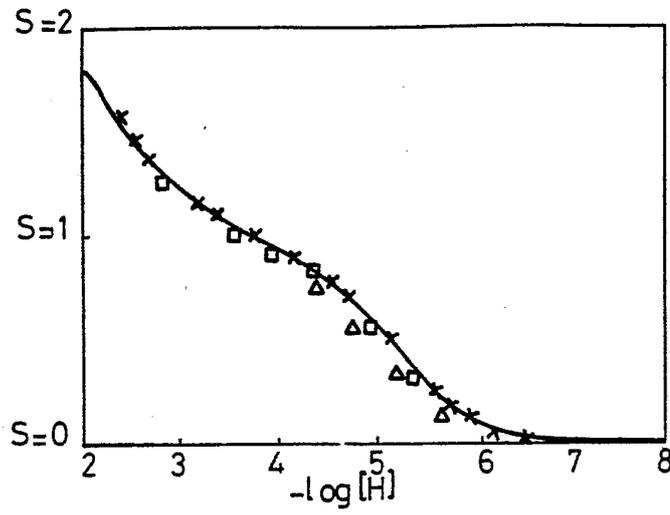
et tironate.

24. Utilisation d'un agent-vecteur selon l'une des
revendications 9 à 13 et/ou d'une composition selon l'une
5 des revendications 14 à 22 et/ou d'un complexe ingérable
selon la revendication 23 à la magnésothérapie humaine ou
vétérinaire et/ou aux supplémentations magnésiennes dans
le cadre de régimes diététiques humain et animal.

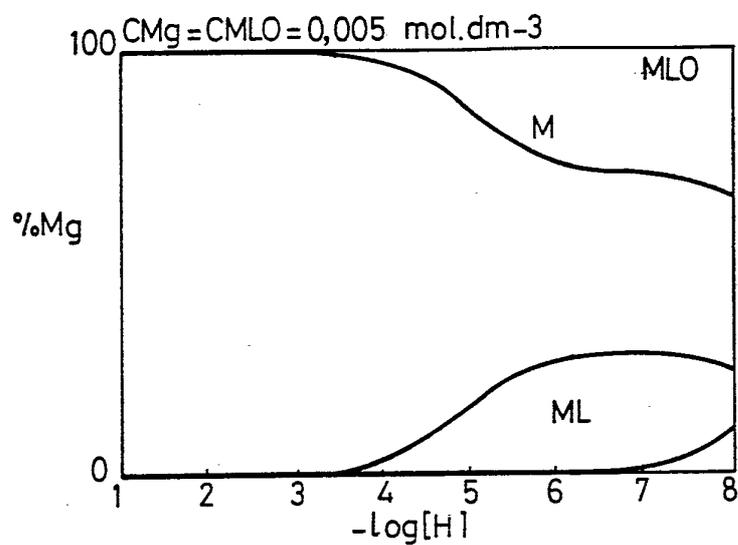
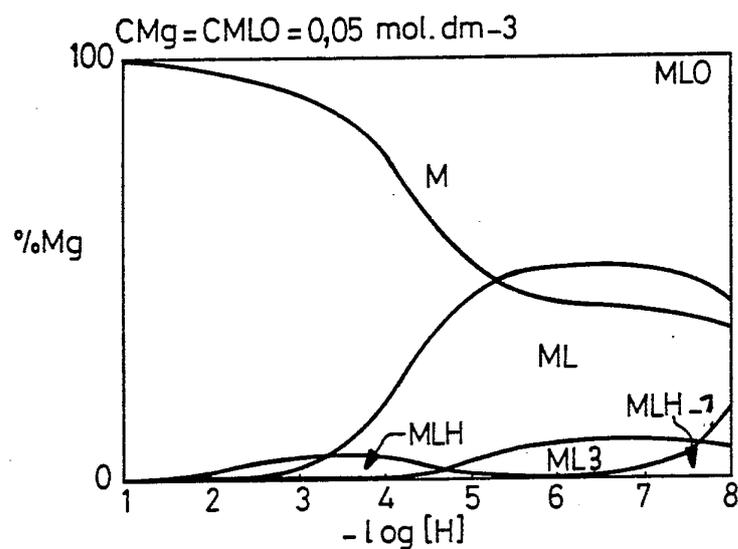
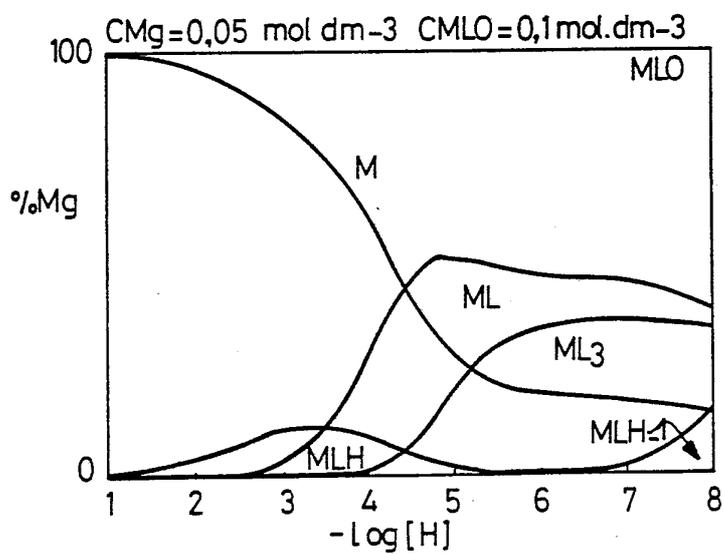
10

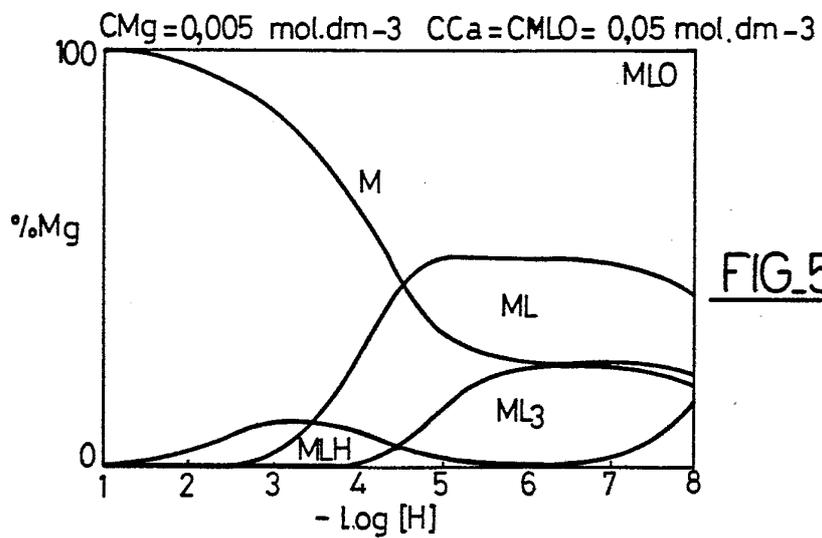
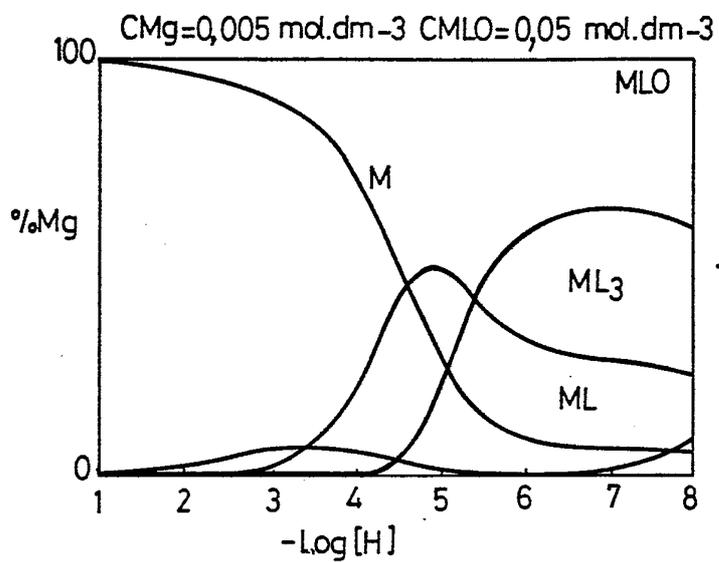
15

1/12

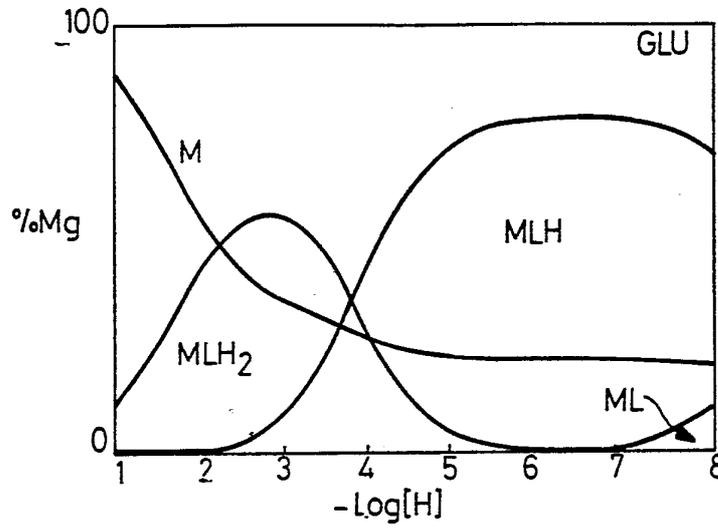
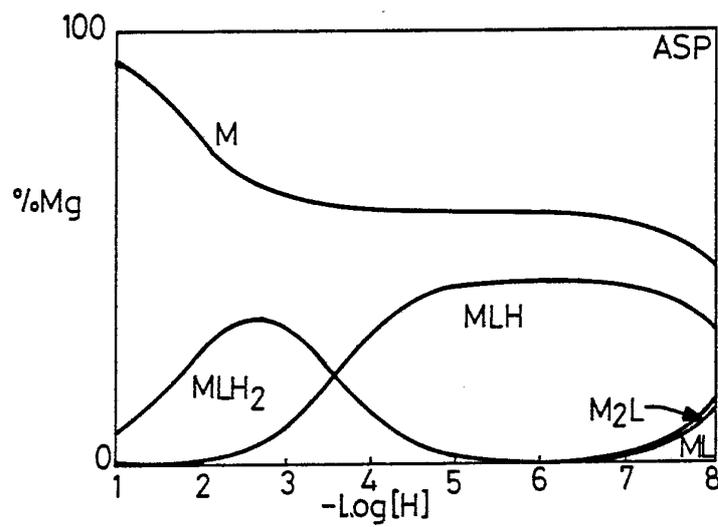
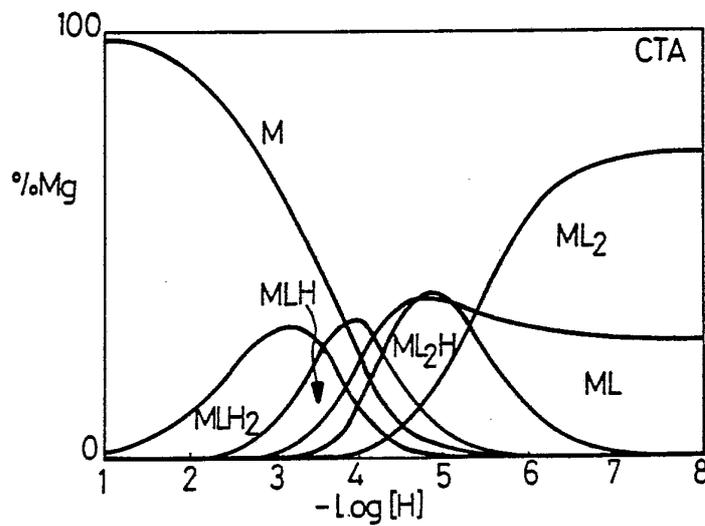


2 / 12

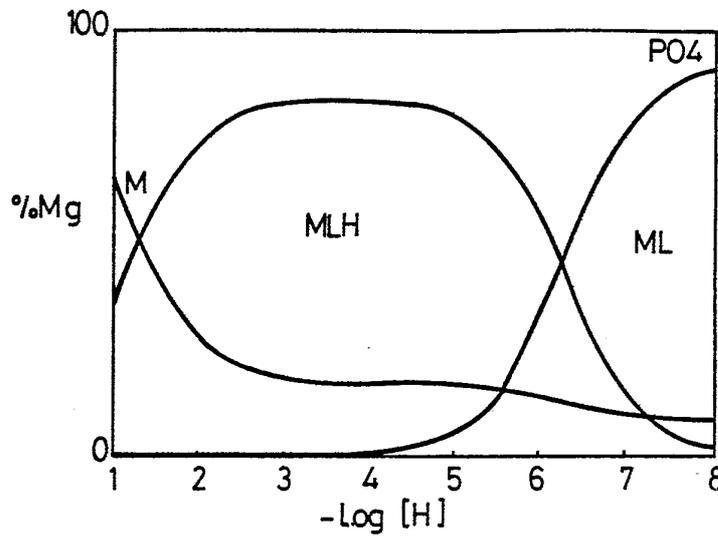
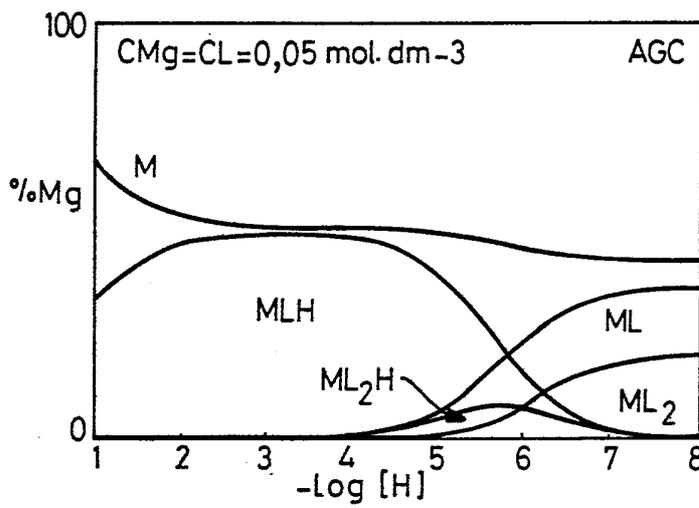
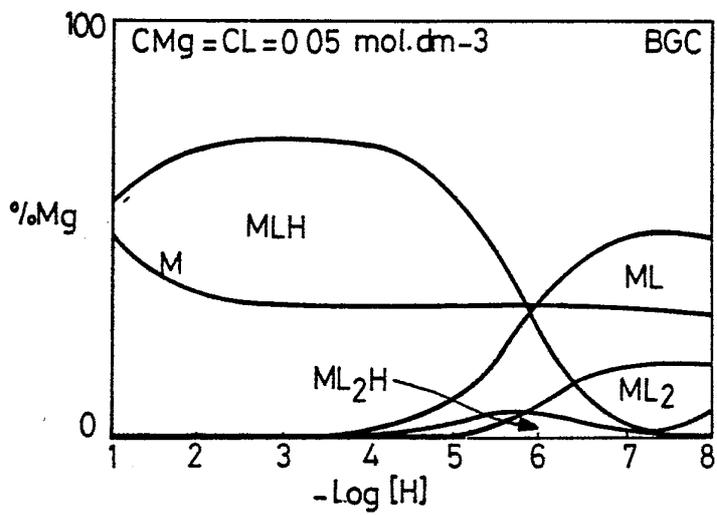
FIG_4aFIG_4bFIG_4c



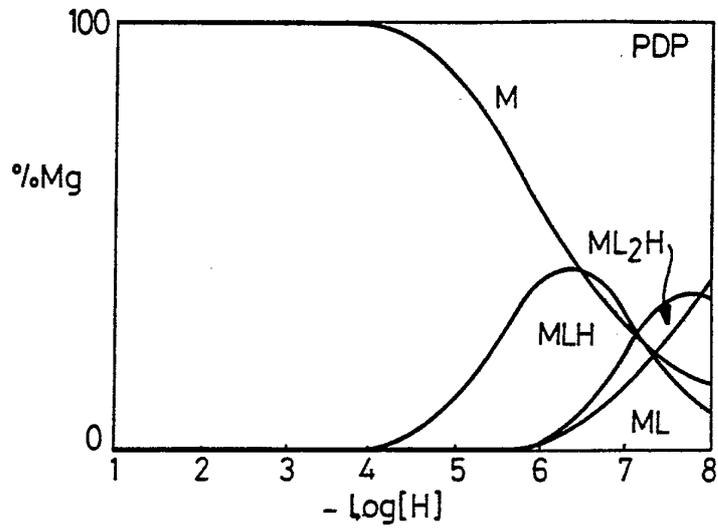
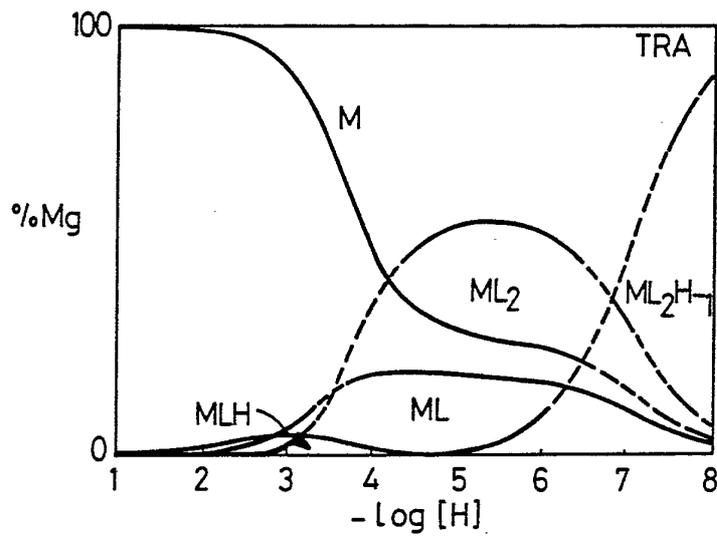
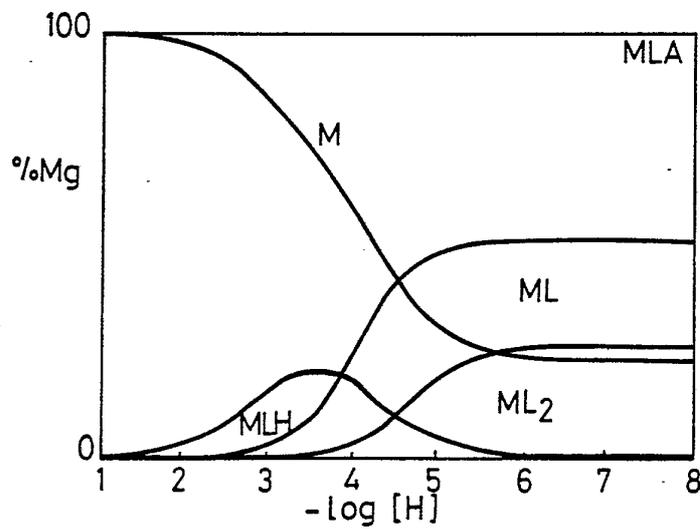
4/12

FIG_6FIG_7FIG_8

5 / 12

FIG_9FIG_10FIG_11

6/12

FIG_12FIG_13FIG_14

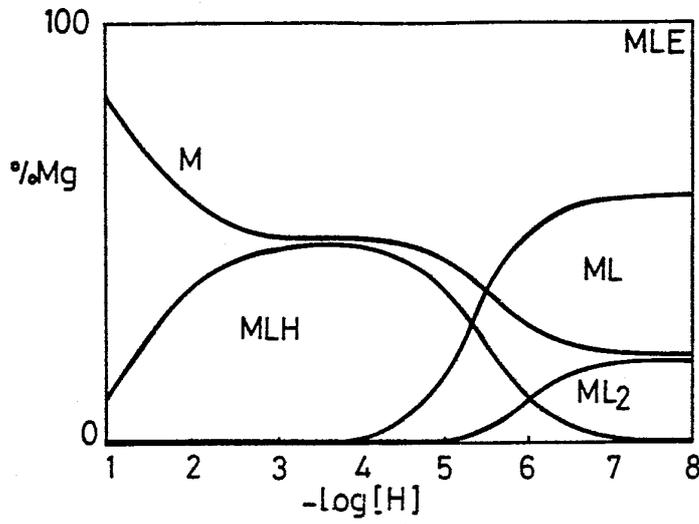


FIG. 15

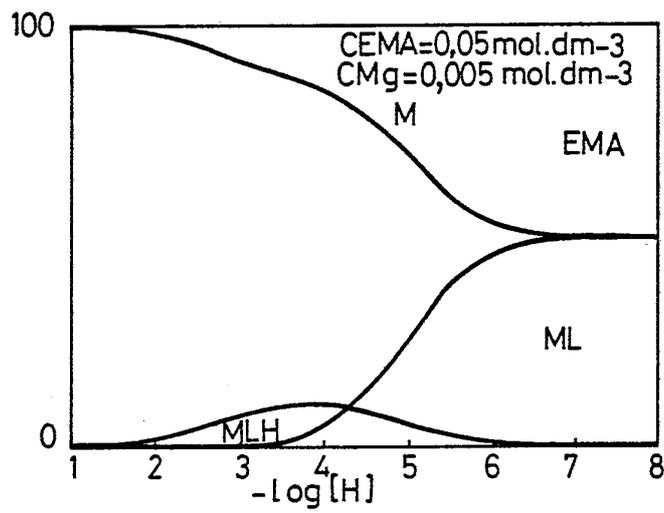


FIG. 16

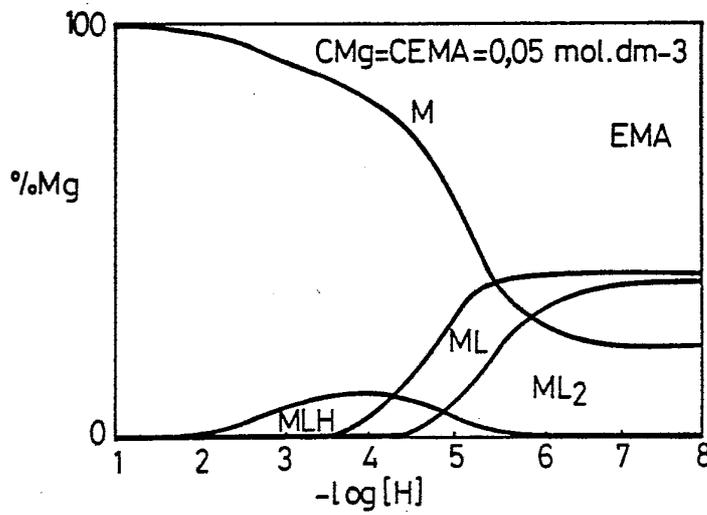
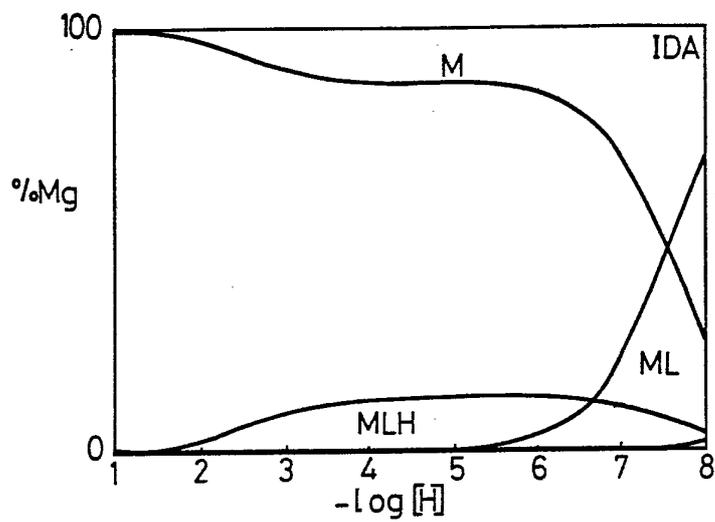
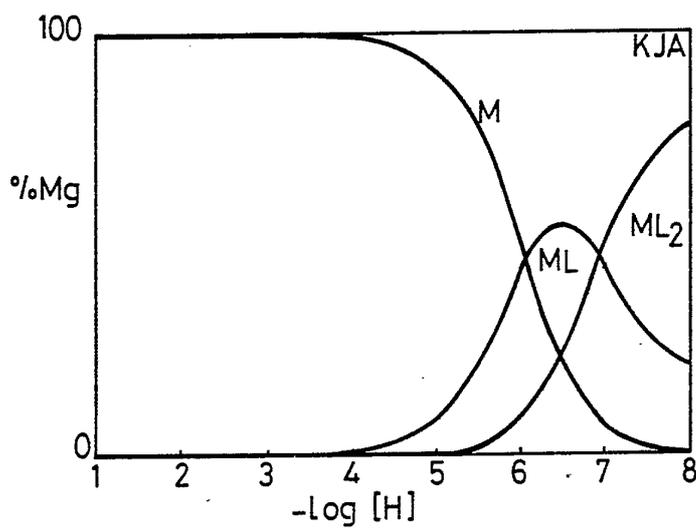
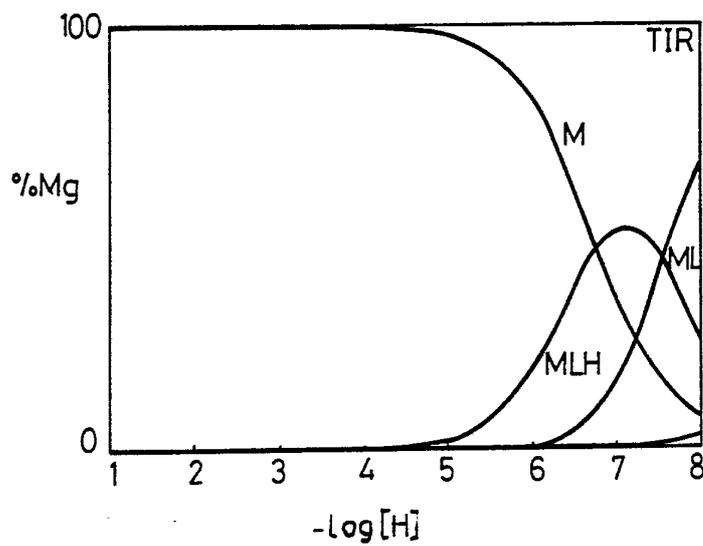
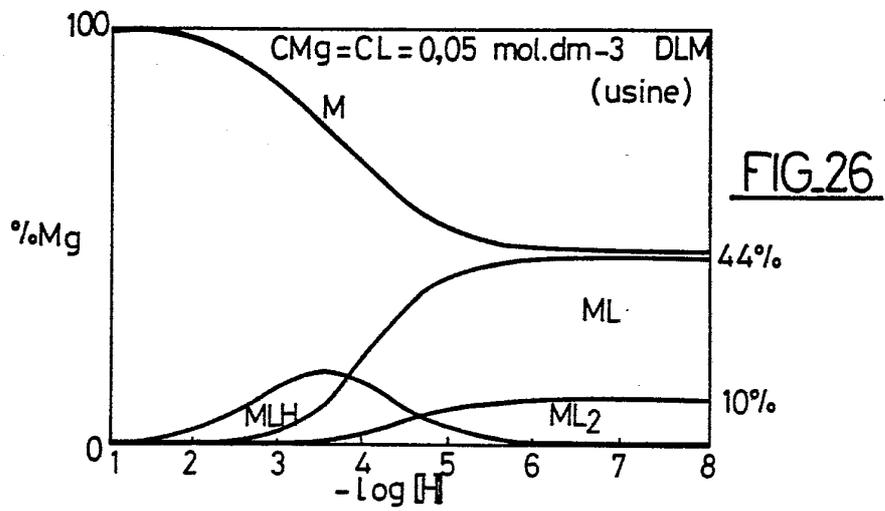
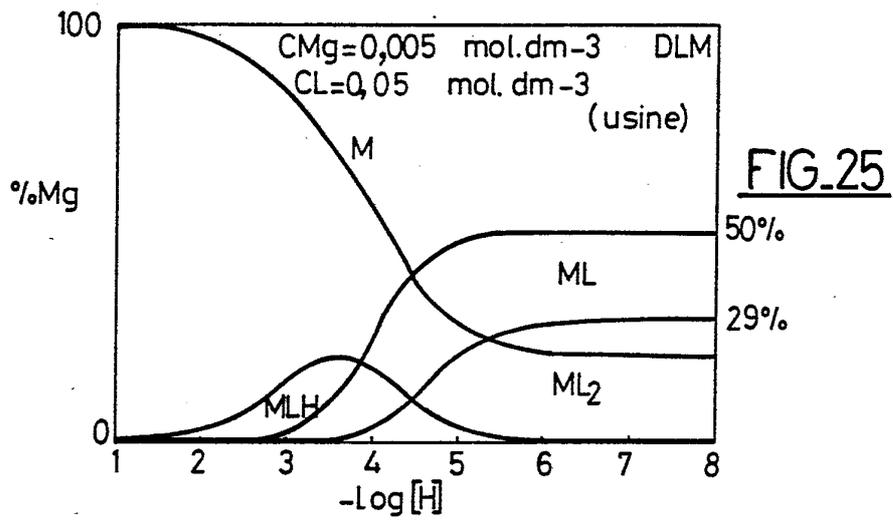
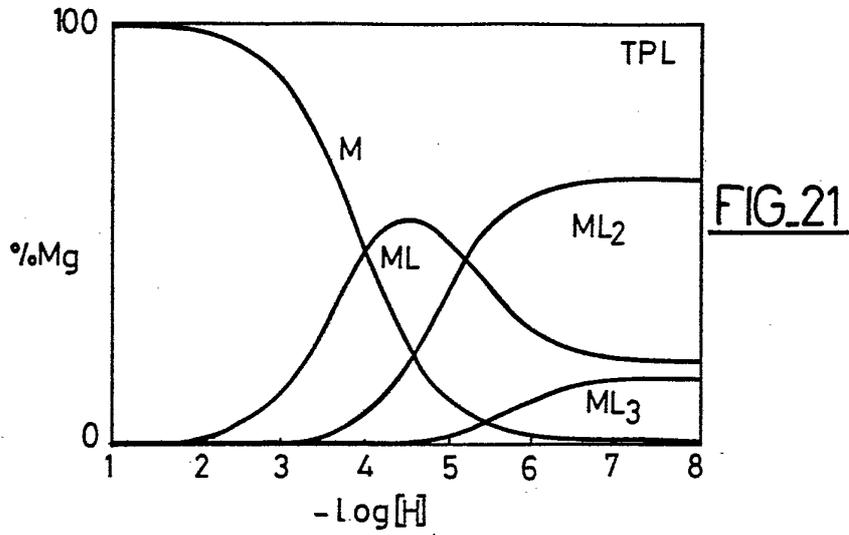


FIG. 17

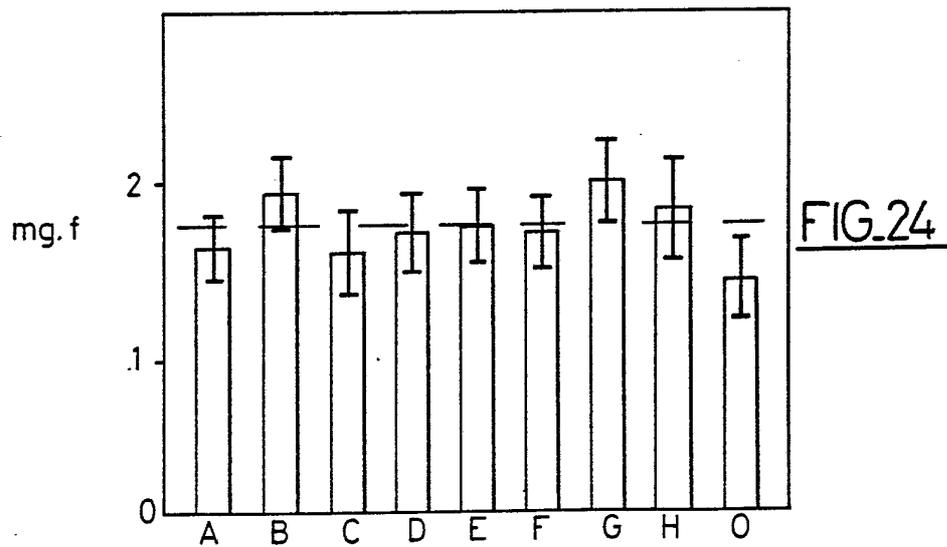
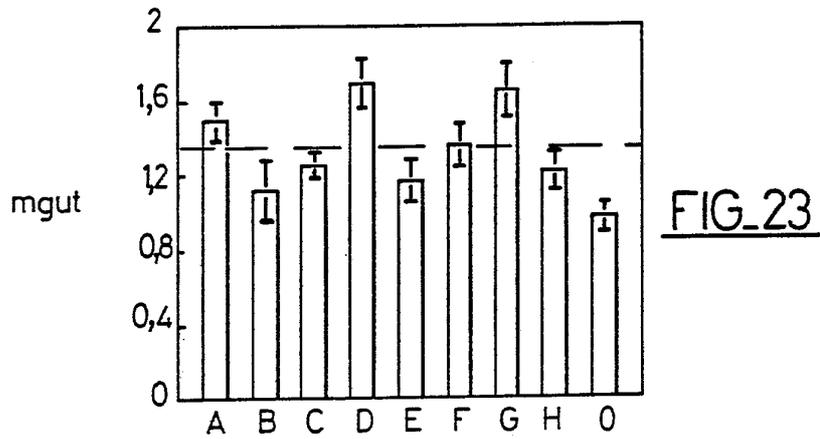
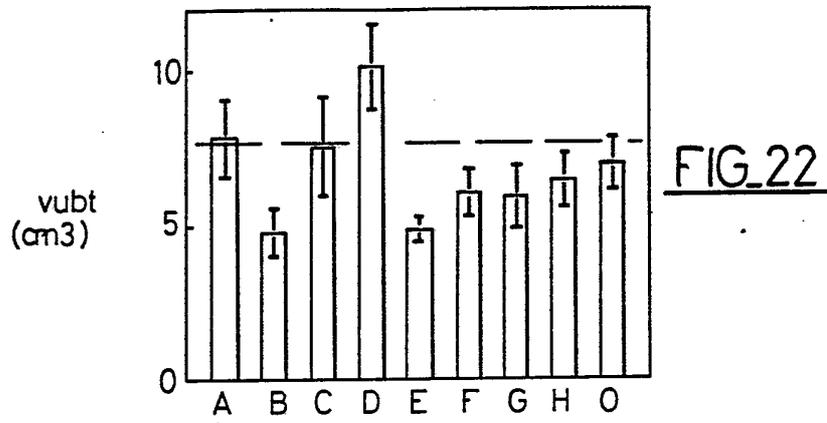
8 / 12

FIG. 18FIG. 19FIG. 20

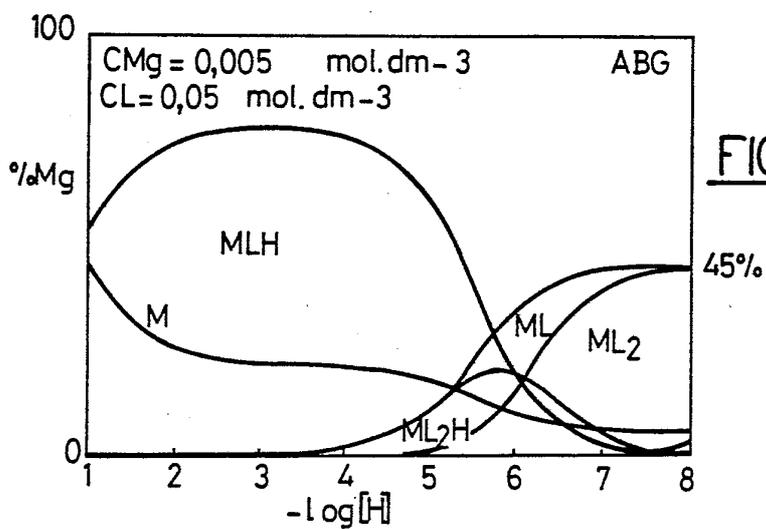
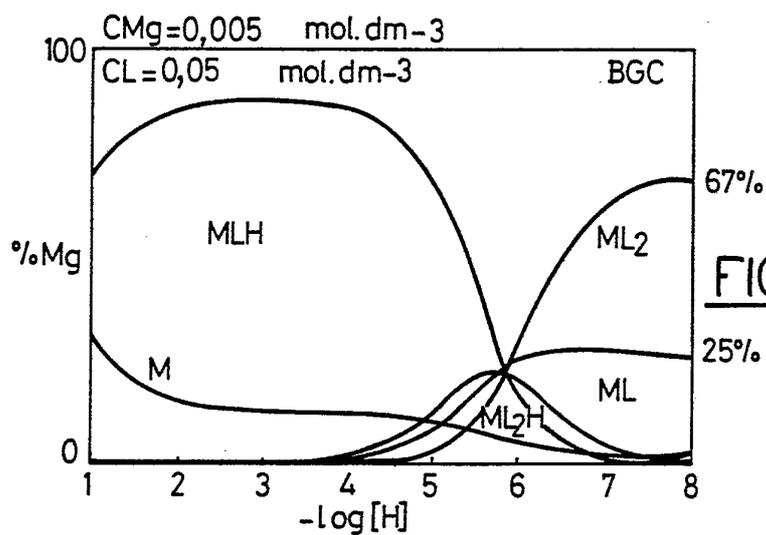
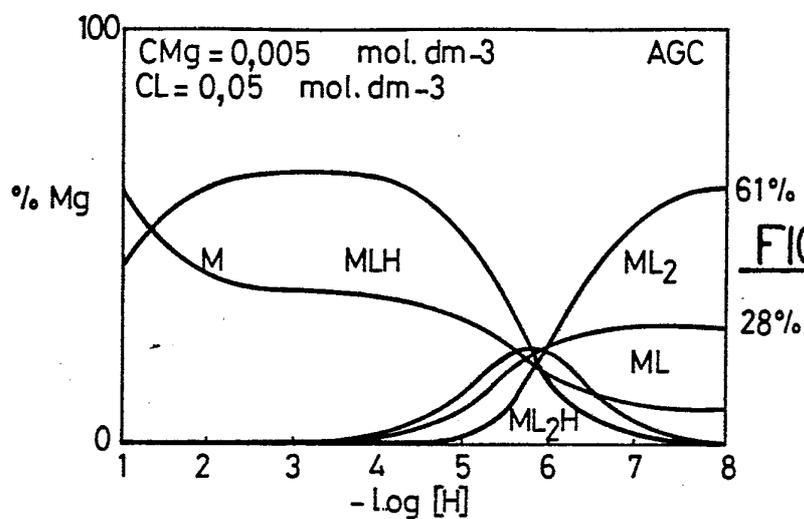
9/12

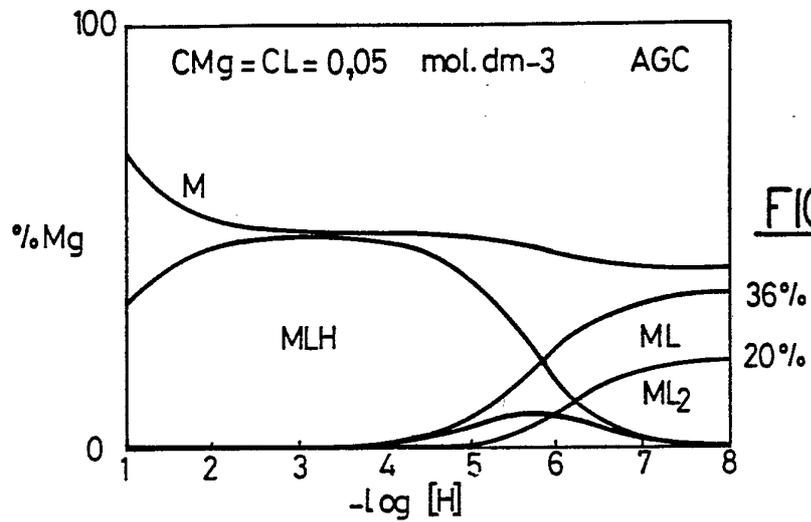


10 / 12

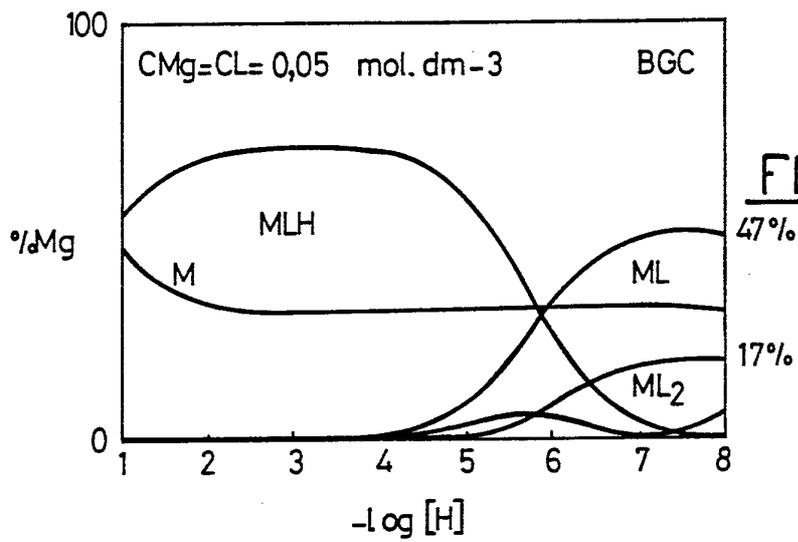


11 / 12

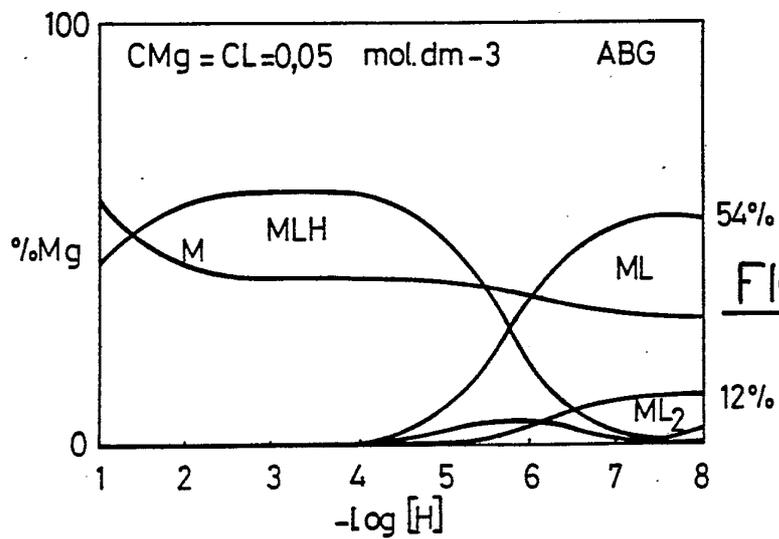




FIG_28a



FIG_28b



FIG_28c