

Germanium
Huître
Branchies
Lysosomes
Noyaux

Germanium
Oyster
Gills
Lysosomes
Nuclei

Concentration naturelle de germanium dans les noyaux et les lysosomes des cellules branchiales de l'huître *Crassostrea gigas*

Christiane BALLAN-DUFRANÇAIS, Anne-Yvonne JEANTET et
Michel TRUCHET

Équipe de Cytophysologie Analytique, Groupement de Recherche "Ecotoxicologie et chimie marine" du Centre National de la Recherche Scientifique (GDR 1117 CNRS), Université Pierre et Marie Curie, 12 rue Cuvier, 75005 Paris, France.

Reçu le 04/07/96, révisé le 14/01/97, accepté le 21/01/97.

RÉSUMÉ

Une recherche systématique du germanium a été entreprise dans les branchies de l'huître *Crassostrea gigas*. Les animaux ont été récoltés à diverses périodes de l'année et sur une longue durée, en provenance de sept sites de la Manche et de l'Atlantique. Certains sites sont des milieux naturels protégés, d'autres sont susceptibles d'être pollués par des rejets industriels.

Les cellules des huîtres ne présentent jamais de lésions visibles à l'échelle ultrastructurale. Les lysosomes ont un contenu opaque et hétérogène et contiennent fréquemment du germanium décelé par microanalyse par sonde électronique. Le noyau, de morphologie classique, peut contenir du germanium détectable au niveau de la chromatine condensée ou du nucléole. Quelles que soient la période et la localisation, les teneurs en cet élément restent du même ordre. Une pollution du milieu marin ou une contamination des échantillons lors de leur préparation paraissent également improbables.

Le rôle physiologique du germanium est actuellement inconnu, mais cette bioaccumulation pourrait résulter d'un mécanisme physiologique normal lié à celui, encore mal identifié, des métaux nucléaires.

ABSTRACT

Natural concentration of germanium in the gill cell nuclei and lysosomes of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg (Mollusca, Bivalve).

A systematic search for germanium was undertaken on oyster gills. Molluscs were collected at different times of the year in seven different areas in the Channel and the Atlantic Ocean. Some of these areas are protected; others may be polluted by industrial wastes.

Oyster cells never present any signs of damage at the ultrastructural level. Lysosomes have heterogeneous densities and frequently contain germanium, detected by electron probe microanalysis. Nuclei, which are classical in aspect, may contain germanium, especially in the dense chromatin and nucleolus. Irrespective of period and locality, the amounts of the detected element are of the same order. It seems unlikely that germanium originates from pollution of the marine environment or contamination of the samples.

The physiological role of germanium is at present unknown. The bioaccumulation observed could nevertheless be the result of a normal physiological process involving nucleic metals.

Oceanologica Acta, 1997, 20, 4, 659-664.

INTRODUCTION

Le germanium, élément du groupe IV B de la table périodique existe à l'état de traces dans les sédiments, les plantes et les animaux; il ne forme que 0,0007 % pondéral (7ppm) de la lithosphère. Dans l'eau de mer, les concentrations moyennes en germanium sont encore plus faibles: 0,006 mg.L⁻¹ (6ppt) (Azam et Volcani, 1981).

Proche du silicium par ses propriétés chimiques, il n'est, contrairement à ce dernier, généralement pas considéré comme essentiel à la vie et peu de travaux le concernent. Il a toutefois été utilisé comme analogue du silicium pour préciser les mécanismes de formations minérales chez les spongiaires ou les diatomées. Chez les spongiaires, le germanium inhibe la formation et l'allongement des spicules intracytoplasmiques en s'y incorporant (Elvin, 1972; Davie *et al.*, 1983) tandis que chez les diatomées, il pourrait, selon la concentration, empêcher les divisions cellulaires en intervenant comme inhibiteur compétitif du transport de Si (Azam et Volcani, 1981). De plus il interagit avec le silicium sur la radula des patelles, où il provoque des effets toxiques (Rinkevitch, 1986).

Un deuxième champ de recherches s'est ouvert récemment. En effet, sous forme de GeO₂ ou sous forme de dérivé (sesquioxyde), le germanium est couramment utilisé en Orient pour ses activités antimicrobiennes, antitumorales, immunostimulantes ou revigorantes (Schein *et al.*, 1980; Furst, 1987; Aso *et al.*, 1989). Une utilisation abusive a conduit à des troubles importants chez l'homme au niveau rénal, musculaire, nerveux et sanguin (Nagata *et al.*, 1985; Okuda *et al.*, 1987; Sanai *et al.*, 1990). Des études ont alors été réalisées chez le rat sur les effets néphrologiques (Higuchi *et al.*, 1989) de cet élément ainsi que sur les myopathies (Higuchi *et al.*, 1991; Chieng *et al.*, 1992) et sur les conséquences neurologiques (Matsumuro *et al.*, 1993).

Alors que de nombreux éléments métalliques comme le plomb ou le cadmium polluent le milieu marin côtier, rien n'avait été signalé, à notre connaissance, au sujet du germanium. C'est de manière fortuite que nous l'avons découvert dans les lysosomes des cellules branchiales de l'huître comestible *Crassostrea gigas* lors de l'étude d'animaux soumis à une intoxication expérimentale au plomb (Amiard *et al.*, 1995), grâce à la grande sensibilité de notre méthode de microanalyse ponctuelle (Ballan *et al.*, 1980).

Cette observation nous a conduits à entreprendre la recherche systématique du germanium chez cet animal en fonction de l'environnement côtier.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Prélèvements

Les huîtres (*Crassostrea gigas* Thunberg), d'une taille de 2 à 8 cm, ont été prélevées à différents endroits des côtes de l'Atlantique et de la Manche de 1984 à 1994 (tab. 1).

Certaines huîtres provenaient de l'estuaire de la Charente (Banc Bourgeois), d'autres mollusques ont été collectés en

Tableau 1

Résultats globaux de l'analyse du germanium dans les lysosomes et les noyaux de la branchie d'huîtres de diverses provenances et à différentes périodes.

Global results of germanium analysis in lysosomes and nuclei of oyster gills from various areas at various periods

Provenance	Date de fixation	Nombre d'animaux	Taille (cm)	Présence de germanium	
				Lysosomes	Noyaux
Plouharnel	14/4/85	3	8	+	+
Écloserie (Vendée)	7/10/92	5	2	+	
Banc Bourgeois (Charente)	29/6/93	10	3	+	+
Talmont (Gironde)	23/5/84	4	5	+	
La Fosse (Gironde)	29/6/94	4	3	+	+
Brest	25/4/84	2	6	+	+
Écloserie (Calvados)	1/12/89	2	2,5	+	+

Gironde (Talmont, La Fosse), à Brest, à Carnac (parcs à huîtres de Plouharnel) et dans deux écloseries, l'une dans le Calvados (Barfleur) et l'autre en Vendée (Bouin). Il s'agit donc d'huîtres provenant de milieux naturels protégés ou de milieux susceptibles d'être pollués par des rejets industriels.

Étude ultrastructurale

Les fragments de branchies ont été fixés dans du glutaraldéhyde à 3 % dans du tampon cacodylate de sodium 0,2M additionné de saccharose 0,35M pendant une heure et demie puis rincés dans du tampon cacodylate additionné de saccharose 0,5M. Le matériel a été post-fixé dans du tétroxyde d'osmium à 2 % dans de l'eau puis inclus dans de l'Epon-Araldite et coupé à 50 nm. L'examen ultrastructural de coupes de 50 nm a été effectué sur microscope électronique Phillips 200 à 80 kV.

Microanalyse par sonde électronique

La fixation utilisée est la même que pour l'étude ultrastructurale mais sans post-fixation par le tétroxyde d'osmium. Les coupes ultrafines (80-100 nm) ont été recueillies sur des grilles de titane (Fullam) et carbonées. La microanalyse par sonde électronique (EPMA) a été effectuée sur un CAMECA MBX (Camebax) équipé de quatre spectromètres à dispersion de longueur d'onde (W.D.S.). Le diamètre de la sonde, approximativement de 500 nm, est obtenu avec une intensité de 150 nA et une tension de 45 kV. Le cristal utilisé pour la recherche de la raie K α 1 du germanium est un LiF (fluorure de lithium). Les mesures d'intensités (en coups) ont été recueillies automatiquement avec des temps de comptage de 100 s. Les intensités calculées (Nc) ont été déterminées en appliquant la formule:

$$Nc = [Np] - [Nb]$$

où Np est la moyenne de deux valeurs correspondant au nombre d'impulsions obtenues au pic et Nb la valeur

moyenne entre le bruit de fond de part et d'autre du pic. Les intensités calculées n'ont été retenues que lorsque les valeurs étaient significatives (intervalle de confiance $Nc \pm 2\sigma$ avec une déviation standard s estimée $s = \sqrt{Np + Nb}$) et un intervalle de confiance de 95 %.

La recherche systématique du germanium dans les cellules branchiales a été faite dans les huîtres des différentes provenances (tab. 1). En un point donné (Banc Bourgeois), l'analyse a été effectuée systématiquement sur les dix animaux récoltés pour savoir si toutes les huîtres contenaient du germanium (tab. 1). Pour des animaux de trois localités différentes (Vendée, Banc Bourgeois, Plouharnel) 9 à 11 lysosomes, pris au hasard chez chaque animal, ont été comparés pour déterminer d'éventuelles variations dans les teneurs (tab. 2). Enfin, le Tableau 3 fournit les valeurs obtenues dans les noyaux pour des animaux de provenances diverses.

RÉSULTATS

Les huîtres des diverses provenances sont toujours en très bon état à l'examen visuel. De plus, les branchies ne présentent aucune lésion ultrastructurale (figs. 1, 2). L'aspect des cils ou des microvillosités apicales est toujours normal de même que celui des organites du hyaloplasme, noyau, mitochondries, reticulum endoplasmique, dictyosomes. Les lysosomes, à contenu opaque et hétérogène, sont rares dans les divers types cellulaires et plus nombreux dans les cellules latéro-frontales. Le germanium est fréquemment décelé par microanalyse par sonde électronique dans ces structures endomembranaires. En outre, les noyaux peuvent contenir

Tableau 2

Microanalyse par sonde électronique des lysosomes. Valeurs trouvées chez trois animaux de provenances différentes lors de la recherche du germanium; intensités en coups/100 s (ns = non significatif).

Electron probe microanalysis of lysosomes. Values found in three animals of different origin. Intensities for germanium in counts/100 s (ns = not significant).

Plouharnel	Ecloserie Vendée	Banc Bourgeois
ns	60 ± 35	25 ± 18
47 ± 28	ns	ns
ns	35 ± 24	16 ± 15
ns	45 ± 24	59 ± 28
49 ± 27	ns	ns
56 ± 29	31 ± 22	51 ± 32
53 ± 26	31 ± 21	93 ± 40
35 ± 25	21 ± 19	ns
47 ± 28	ns	46 ± 35
	32 ± 22	41 ± 26
	36 ± 22	18 ± 17

cet élément au niveau de la chromatine condensée ou du nucléole.

Le germanium a été trouvé dans toutes les localités où nous l'avons cherché (tab. 1). L'analyse systématique au Banc Bourgeois a montré que toutes les huîtres récoltées contenaient du germanium dans les lysosomes (tab. 2) ainsi que dans les noyaux, mais que tous les lysosomes et tous les noyaux n'en contenaient pas.

La provenance des animaux n'a pas influé sur les teneurs (tab. 2, 3) qui restent toujours du même ordre et très faibles (inférieures à un coup par seconde), quels que soient le mois et l'année du prélèvement.

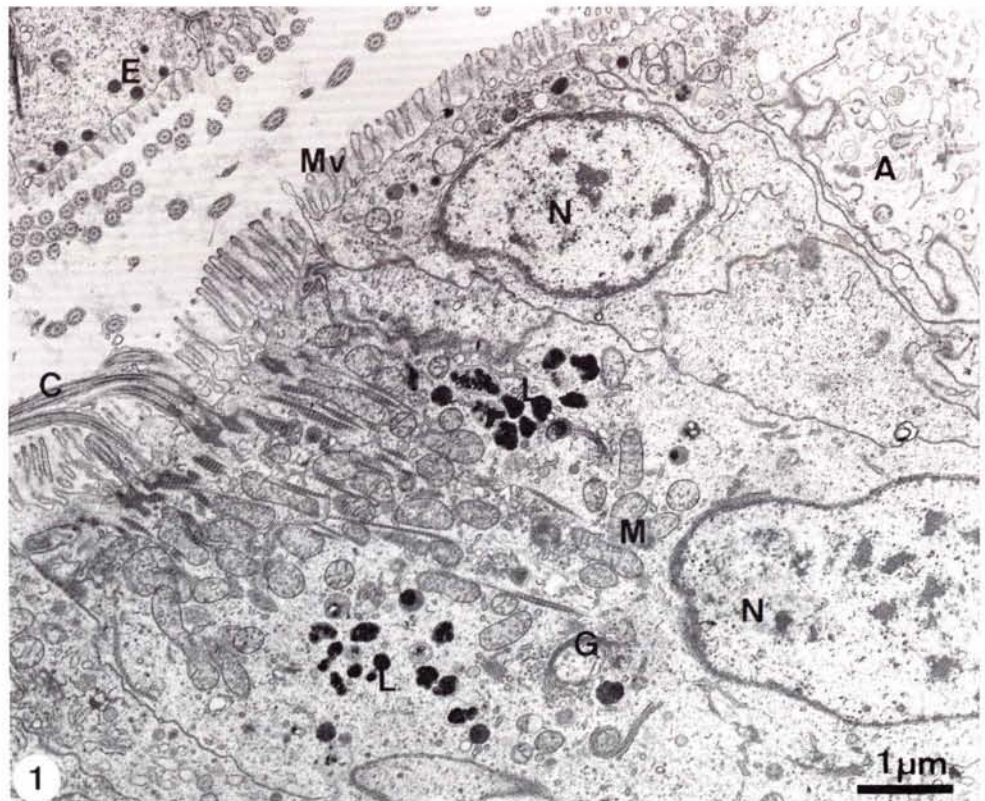


Figure 1

Epithélium branchial d'huître provenant du banc Bourgeois (Charente). Noter la présence de petits lysosomes dans des cellules en très bon état morphologique.

Branchial epithelium of an oyster from the Banc Bourgeois (river Charente, France). Note the abundance of small lysosomes and the good morphology of the cells.

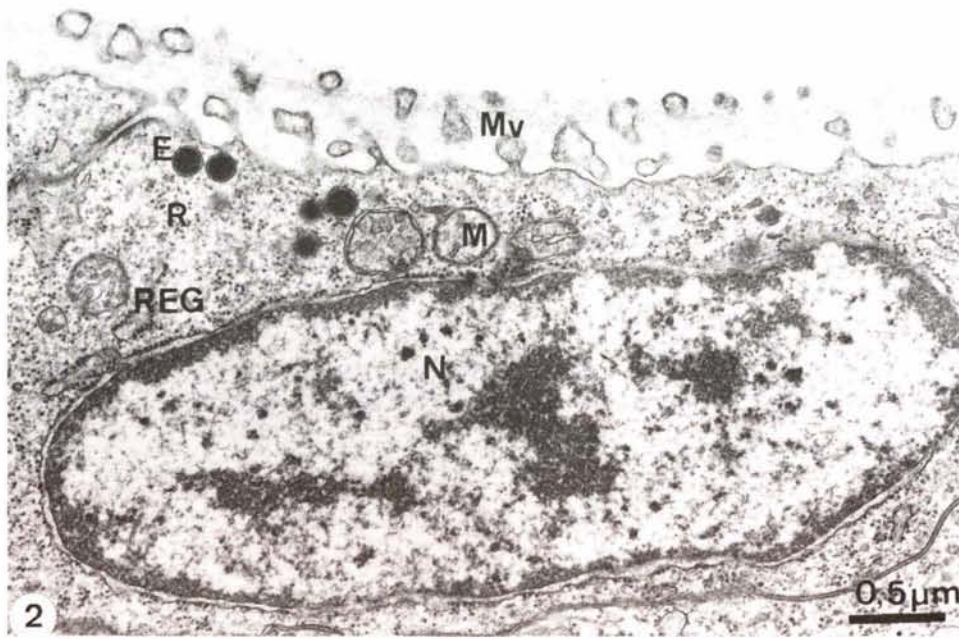


Figure 2

Détail de la région nucléaire d'une cellule branchiale d'huître provenant de La Fosse (Gironde). Le noyau, bien conservé, peut contenir du germanium.
 A: amoebocytes; C: cils; E: endosomes; G: appareil de Golgi; L: lysosomes; R: ribosomes; REG: reticulum endoplasmique granulaire; M: mitochondries; Mv: microvillosités; N: noyau.

Nuclear zone of gill cell of an oyster from La Fosse (Gironde, France). The nucleus, well preserved, may contain germanium. A: hemocytes; C: cilium; E: endosome; G: Golgi apparatus; L: lysosome; R: ribosome; REG: granular endoplasmic reticulum; M: mitochondria; Mv: microvilli; N: nucleus.

DISCUSSION

Une pollution du milieu marin peut être envisagée pour certaines des zones où les animaux ont été prélevés, étant donné l'utilisation de cet élément dans les semi-conducteurs (Meyerson, 1994) mais aucune donnée à ce sujet n'existe dans la littérature. Compte-tenu de la diversité de provenance des animaux étudiés, estuaires ou écloséries, et de la longue durée sur laquelle nous avons prélevé, une pollution généralisée du milieu marin paraît très improbable (tab. 1). Inversement, une contamination des échantillons lors de leur préparation n'expliquerait pas que de nombreux noyaux et lysosomes soient dépourvus de germanium (tab. 2, 3).

La détection de cet élément dans certains noyaux et certains lysosomes, à une concentration suffisante pour que la microanalyse par sonde électronique donne une réponse positive (de l'ordre de 100 ppm dans la plage analysée),

pourrait donc correspondre à un mécanisme physiologique normal; il n'existe cependant pas, actuellement, de mécanisme physiologique connu pour le germanium. Il serait concentré dans certaines plantes médicinales dont le *Ginseng radix* (Hino *et al.*, 1980), ce qui expliquerait l'utilisation paramédicale qui en a été faite au Japon sous forme de dioxyde (GeO₂). Cette pharmacopée a conduit à des intoxications chroniques ou aiguës. Dans les divers organes atteints, on note un dysfonctionnement mitochondrial. Ces organites présentent des altérations morphologiques et contiennent des dépôts denses (Sanai *et al.*, 1990; Higuchi *et al.*, 1991). L'analyse de ceux-ci par microsonde électronique en dispersion d'énergie (EDS) dans les cellules rénales n'y décèle toutefois pas de germanium (Higuchi *et al.*, 1991).

Chez *Crassostrea gigas*, les mitochondries sont en parfait état et ne contiennent pas de dépôts denses, ce qui indique une non-toxicité du germanium chez l'huître et conforte notre hypothèse d'une fonction physiologique normale.

La bioaccumulation de métaux inhabituels ou réputés très toxiques a déjà été rencontrée chez certains animaux marins, sans qu'un rôle physiologique puisse être précisé. C'est ainsi que le murex accumule des quantités considérables de cadmium dans des types cellulaires déterminés et selon un cycle qui paraît saisonnier (Bouquegneau *et al.*, 1984).

La localisation de germanium dans les lysosomes de *Crassostrea* ne paraît pas non plus spécifique de ces mollusques, car il a déjà été signalé dans des nodules histiocytaires de poissons, à l'aide d'une autre méthode basée sur la spectrométrie de masse (Truchet, 1982).

Cette bioaccumulation peut résulter, comme pour d'autres métaux, du catabolisme d'enzymes en fin de vie ou constituer un stockage d'épuration du milieu intérieur en cas de surcharge (Jeantet *et al.*, 1985; Martoja *et al.*, 1988; Amiard *et al.*, 1989), éventuellement sous forme de métallothionéines (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1980).

Tableau 3

Microanalyse par sonde électronique des noyaux. Valeurs trouvées chez plusieurs animaux de provenances différentes lors de la recherche du germanium; intensités en coups/100 s (ns = non significatif).

Electron probe microanalysis of nuclei. Values found for germanium in animals of different origin; intensities in counts/100 s (ns = not significant).

Plouharnel	Brest
26 ± 23	54 ± 29
ns	26 ± 24
45 ± 23	ns
48 ± 27	36 ± 24
ns	ns
35 ± 26	33 ± 25
36 ± 24	ns

La présence de germanium dans le noyau est plus délicate à interpréter car l'impact des métaux nucléaires sur les mécanismes physiologiques et génétiques de la cellule est encore peu connu (Sissoeff *et al.*, 1976; Sarkar, 1994; Truchet, 1995). Il pourrait être un cofacteur de nucléoenzymes, ce qui rattacherait cette accumulation nucléaire à celles de fer, nickel, cuivre ou zinc, également décelés par microanalyse X et pour lesquels une telle interprétation a été proposée (Quintana *et al.*, 1987). Mais une liaison aux acides nucléiques ne peut être exclue. En effet, s'il est chimiquement proche du silicium, le germanium appartient aux métaux du groupe B, comme l'aluminium dont la liaison aux ADN a été établie (Matsumoto *et al.*, 1976), vraisemblablement aux groupements phosphates (Martin, 1994) mais peut-être aussi avec les histones (Jeantet *et al.*, 1992). Le rôle joué par l'aluminium dans le noyau est encore inconnu, mais dans le cas du cadmium, chez les vertébrés, une dynamique de passage par le noyau a été corrélée à la synthèse de métallothionéines et l'action directe du métal sur l'activité nucléaire a été envisagée (Bryan and Hidalgo, 1976). Lors d'une synthèse provoquée de métallothionéines chez la Drosophile (Lauverjat *et al.*, 1989), l'accumulation nucléaire de cadmium a été retrouvée (Ballan-Dufrançais, inédit) mais une relation

éventuelle avec l'activité protéosynthétique n'a pas encore été recherchée.

En conclusion, il nous paraît peu probable que cette bioaccumulation de germanium résulte d'une pollution du milieu marin. Il s'agirait plutôt d'un mécanisme physiologique normal de concentration à partir de l'eau de mer, mécanisme qui demande maintenant à être approfondi, notamment au niveau du métabolisme des acides nucléiques.

Remerciements

La préparation des échantillons a été assurée par Annie Anglo et Lydia Massot; certains échantillons ont été aimablement fournis par Claude Amiard-Triquet et Jean-Claude Amiard.

Les observations au microscope électronique ont été effectuées dans le cadre du Centre Interuniversitaire de Microscopie Electronique (CIME) des universités P. et M. Curie (Paris VI) et D. Diderot (Paris VII).

Les analyses à l'échelle ultrastructurale ont été faites au Service commun de Microanalyse appliquée à la biologie, CNRS, INSERM, CHU, 94000 Créteil, France.

RÉFÉRENCES

- Amiard J.C., C. Amiard-Triquet, C. Ballan-Dufrançais, B. Berthet, A.Y. Jeantet, R. Martoja, M. Truchet (1989). Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism level of lead and copper transferred to the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg directly from water or via food. *Proc. 21 Eur. Mar. Biol. Symp. Gdansk.* Polish Acad. Sc. Inst. Oceanol. 521-529.
- Amiard J.C., H. Ettajani, A.Y. Jeantet, C. Ballan-Dufrançais, C. Amiard-Triquet (1995). Bioavailability and toxicity of sediment-bound lead to a filter-feeder bivalve *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Biometals* **8**, 280-289.
- Azam F., B.E. Volcani (1981). Germanium-silicon interactions in biological systems. In: T.L. Simpson B.E. Volcani eds. *Silicon and siliceous structures in biological systems*. Springer-Verlag, New-York, Heidelberg, 43-67.
- Aso H., F. Susuki, T. Ebina, N. Ishida (1989). Antiviral activity of carboxyethyl germanium sesquioxide (Ge¹³²) in mice infected with influenza virus. *J. Biol. Response Mod.* **8**, 180-189.
- Ballan-Dufrançais C., J. Ruste, A.Y. Jeantet (1980). Quantitative Electron Probe Microanalysis on Insect Exposed to Mercury. I Methods. An Approach on the Molecular Form of the Stored Mercury. Possible Occurrence of Metallothionein-Like Proteins. *Biol. Cell.* **39**, 317-324.
- Bouquegneau J.M., M. Martoja, M. Truchet (1984). Heavy metal storage in Marine Animals Under Various Environmental Conditions. In: *Toxins, Drugs, and Pollutants in Marine Animals*. Bolis *et al.* eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984, 147-160 (Proc. *Int. Congr. Marine Physiol.*, Taormina, Sicile, 1983).
- Bryan S.E., H.A. Hidalgo (1976). Nuclear ¹¹⁵Cadmium: Uptake and Disappearance correlated with Cadmium-binding Protein Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **68**, 858-866.
- Chien-Ming W., M. Taro, T. Masakazu, G. Yu-Ichi, N. Ikuya (1992). An experimental model of mitochondrial myopathy: germanium-induced myopathy and coenzyme Q10 administration. *Muscle and Nerve* **15**, 1258-1264.
- Davie E.I., T.L. Simpson, R. Garrone (1983). Experimental germanium incorporation into siliceous sponge spicules. *Biol. Cell.* **48**, 191-202.
- Elvin D.W. (1972). Effect of germanium upon development of siliceous spicules of some fresh-water sponges. *Exp. Cell Res.* **72**, 551-553.
- Furst A. (1987). Biological testing of Ge. *Toxicol. Ind. Health.* **3**, 167-204.
- Higuchi I., S. Izumo, N. Kurimaya, M. Suchara, M. Nakagawa, M. Fukunaga, M. Osame, S. Ontsubo, K. Miyata (1989). Germanium myopathy: clinical and experimental pathological studies. *Acta Neuropath.* **79**, 300-304.
- Higuchi I., K. Takahashi, K. Nakahara, S. Izumo, M. Nakagawa, M. Osame (1991). Experimental germanium nephropathy. *Acta Neuropath.* **82**, 55-59.
- Hino Y., N. Ota, S. Sakao, S. Shimomura (1980). Determination of germanium in medicinal plants by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization. *Chem. Pharmac. Bull.* **28**, 2687-2691.
- Jeantet A.Y., C. Ballan-Dufrançais, J.L. Martin (1985). Recherche des mécanismes de détoxification du cadmium par l'huître *Crassostrea gigas* (Mollusque Bivalve). II. Sites intracellulaires d'accumulation du métal dans les organes absorbants et excréteurs. *C.R. Acad. Sci.* **301**, 177-182.
- Jeantet A.Y., C. Ballan-Dufrançais, C. Petter, M. Truchet (1992). Mécanismes de détoxification cellulaire, concentration nucléaire d'aluminium et protection de l'hépatocyte après surcharge expérimentale chez le rat. *C.R. Acad. Sci.* **315**, 379-386.
- Lauverjat S., C. Ballan-Dufrançais, M. Wegnez (1989). Ultrastructural study and electron-probe microanalysis of the midgut in

- a cadmium-resistant strain of *Drosophila melanogaster*. *Biol. Metals* **2**, 97-107.
- Martin R.B.** (1994). Aluminium: A neurotoxic Product of Acid Rain. *Acc. Chem. Res.* **27**, 204-210.
- Martoja R., C. Ballan-Dufrançais, A.Y. Jeantet, P. Gouzerh, J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, B. Berthet, J.P. Baud** (1988). Effets chimiques et cytologiques de la contamination expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg par l'argent administré sous forme dissoute et par voie alimentaire. *J. Can. Sc. halieut. aquat.* **45**, 1827-1841.
- Matsumoto H., E. Hirasawa, H. Torikai, E. Takahashi** (1976). Localization of absorbed aluminium in pea roots and its binding to nucleic acids. *Plant Cell Physiol.* **17**, 127-137.
- Matsumuro K., S. Isumo, I. Higuchi, A.T. Ronquillo, K. Takahashi, M. Osame** (1993). Experimental germanium dioxide induced neuropathy in rats. *Acta Neuropath.* **86**, 547-553.
- Meyerson B.** (1994). Des circuits électroniques au silicium-germanium. *Pour la Science* **199**, 64-69.
- Nagata N., T. Yoneyama, K. Yanagida, K. Ushio, S. Yanagihara, O. Matatsuba Y. Eishi** (1985). Accumulation of germanium in the tissues of a long term user of germanium preparation died of acute renal failure. *J. Toxicol. Sc.* **10**, 33-341.
- Okuda S., S. Kiyama, Y. Oh Yukinori, K. Shimamatsu, N. Oochi, K. Kobayashi, F. Nanhisi, S. Fujimi, K. Onoyama, N. Fujishima** (1987). Persistent renal dysfunction induced by chronic intake of germanium containing compounds. *Cur. Ther. Res.* **41**, 265-275.
- Quintana C., A. Olmedilla, N. Antoine, A. Ollacarizqueta** (1987). The occurrence of metals Al, Fe, Ni, Cu, Zn in the nuclei of animals cells: an ultrastructural, *in situ*, X-ray microanalytical study. *Biol. Cell.* **61**, 115-119.
- Rinkevich B.** (1986). Does germanium interact with radular morphogenesis and biomineralisation in the limpet *Lottia gigantea*? *Comp. Biochem. Physiol.* **83**, 137-141.
- Sanai T., S. Okuda, K. Onoyama, N. Oochi, Y. Oh, K. Kobayashi, K. Shimamatsu, S. Fujima, M. Fujishima** (1990). Germanium dioxide induced nephropathy. A new type of renal disease. *Nephron* **54**, 53-60.
- Sarkar B.** (1994). Genetic response to metals. Ed. Lavoisier, Cachan (France).
- Schein P.S., M. Slavik, T. Smythe** (1980). Phase 1 clinical trial of spirogermanium. *Cancer Treat. Rep.* **64**, 1051-1506.
- Sissoef I., J. Grisvard, E. Guille** (1976). Studies on metal ions-DNA interactions: specific behaviour of reiteratives sequences in higher plant and animal tissues. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **31**, 165-199.
- Truchet M.** (1982). Étude de deux nouvelles méthodes d'analyse histologique: analyse élémentaire par émission ionique secondaire et analyse moléculaire par diffusion Raman; méthodologie et exemple d'application. *Thèse Doctorat État*, Université P. et M. Curie, Paris, France, 145-223.
- Truchet M.** (1995). L'aluminium est-il en cause dans la maladie d'Alzheimer? *Can. Med. Assoc. J.* **153**, 741.
-