

LES ESTERS PHOSPHORÉS DES MUSCLES DU LOMBRIC

par

C. REY

Laboratoire de Biologie générale, Faculté des Sciences, Université de Liège (Belgique)

Ce travail constitue une contribution à l'étude de la biochimie comparée des esters phosphorés des muscles d'Invertébrés, encore peu connus à ce point de vue.

TECHNIQUE

Matériel expérimental

Les Vers (*Lumbricus terrestris* L.) sont conservés en milieu humide à 2° C pendant plusieurs jours. Le tube musculo-cutané, prélevé en chambre froide, débarrassé des premiers segments du corps et des viscères, est lavé avec du liquide de Ringer pour Grenouille, exempt de phosphore, puis pesé. Les préparations obtenues sont conservées humides en boîte de Pétri, pendant plusieurs heures (6 à 12) à 2° C. Cette phase de récupération est indispensable dans le cas de l'étude des muscles au repos.

Pour l'étude de muscles stimulés, les préparations immergées dans du liquide de Ringer sont téтанisées à la température du laboratoire au moyen d'une bobine de Ruhmkorff (tension aux bornes du primaire: 8 volts) et de fines électrodes d'argent chlorurées.

Préparation et fractionnement des extraits

Parmi les différents procédés de fixation essayés, le broyage direct dans l'acide trichloracétique congelé s'est révélé le meilleur: la congélation brusque par immersion dans l'air liquide provoque une très vive contraction tandis que les muscles congelés progressivement en boîte de Pétri jusqu'à -20° C sont visiblement contracturés.

Les muscles reposés, ou stimulés, sont donc broyés directement dans un mortier, refroidi à -20° C, en présence d'un volume connu (± 2 vol/g muscle) d'une solution d'acide trichloracétique à 10%, elle-même congelée à -20° C. Après réchauffement à 2° C et centrifugation à 14,000 t/min pendant 10 min à 2° C, la fraction surnageante est recueillie et divisée en deux portions (A et B).

L'extrait A est débarrassé des ions Ca^{++} et Mg^{++} libres par addition d'acide éthylènediamine-tétraacétique. Nous avons pu réduire à 12.5 mg/g de muscle la quantité de ce réactif à ajouter à nos extraits, soit le quart de la quantité ajoutée par CALDWELL¹ à des extraits musculaires de Grenouille et de Tortue. L'extrait est ensuite amené le plus rapidement possible au pH 8-9 par addition d' NH_4OH conc. pour prévenir l'hydrolyse du phosphagène.

L'extrait B est fractionné suivant la méthode de BALDWIN ET YUDKIN², en précipitant, par le réactif de FISKE ET SUBBAROW³ ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$), les adénosine tri- et di-phosphate, l'orthophosphate et l'hexosediphosphate. Après centrifugation, la fraction surnageante contient le phosphagène, sa base guanidique (la lombricine), l'AMP et les hexosemonophosphates. Les ions Ca^{++} et Mg^{++} libres sont ensuite éliminés par addition de 120 mg d'oxalate de soude par ml de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$.

Méthode chromatographique

Nous avons eu recours à la technique décrite par CALDWELL¹ pour l'étude des composés phosphorés de muscles de Vertébrés. Toutefois, nos recherches nous ont amené à y apporter quelques modifications.

Nous avons obtenu des séparations plus nettes en utilisant le papier Whatman No. 1, de préférence au Whatman No. 4, utilisé par CALDWELL¹. Avant emploi, le papier doit être purifié (cf. HANES ET ISHERWOOD⁴). Nous avons éliminé les ions alcalino-terreux par lavage avec HCl 2 N, plus efficace que l'acide acétique 2 N. Les ions de métaux lourds qui interfèrent surtout

dans le cas des solvants acides ne sont pas entraînés par ce lavage. Les chromatographies effectuées dans le solvant butanol tert./ac. picrique sont précédées d'une migration préalable du solvant propanol/ammoniacal ainsi que nous l'a suggéré CALDWELL. Il y a formation de complexes solubles, en milieu ammoniacal. Les compositions des deux solvants utilisés sont les suivantes: 60 ml propanol $n = 25$ ml ammoniacal $D = 0.910$ — 15 ml eau et 80 ml alcool butylique tert. — 4 g acide picrique — 20 ml eau.

Les expériences sont effectuées à la température du laboratoire (20°C environ); les variations n'excèdent pas $\pm 1^{\circ}\text{C}$ grâce à l'utilisation d'une enceinte thermostatique. La solution à analyser est déposée sur le papier au moyen d'une micropipette de $\pm 30\text{ mm}^3$, par apports répétés et séchage simultané dans un courant d'air froid.

Après équilibration du papier avec les vapeurs du solvant pendant 2 heures environ, le solvant est introduit dans la nacelle. Après 15 h de migration (solvant basique) ou 8 h (solvant acide), le chromatogramme est séché dans un courant d'air froid.

Les chromatogrammes sont examinés en lumière ultra-violette avant d'être traités chimiquement. Plusieurs procédés de révélation ont été utilisés:

- (1) le réactif molybdique de HANES ET ISHERWOOD⁴;
- (2) la réaction à la ninhydrine. Le papier sur lequel est pulvérisée une solution de ninhydrine à 0.2 % est placé dans une étuve à 90°C pendant 10 min. Les taches sont fugaces sur les chromatogrammes imprégnés d'acide picrique;
- (3) la réaction à l' α -naphtol hypobromite (réaction de SAKAGUCHI) pour la détection des dérivés guanidiques monosubstitués (ROCHE, NGUYEN VAN THOI ET HATT⁵). Cette réaction n'est pas applicable aux chromatogrammes provenant du solvant butanol tert./ac. picrique, car l'acide interfère.

Les valeurs de R_F citées dans ce texte et non précédées de la mention " R_F absolu" ont été établies en fonction de l'orthophosphate.

La mise au point de la technique a été contrôlée au moyen des produits commerciaux suivants: Orthophosphate Na_2HPO_4 Merck; Adénosine-triphosphate de sodium (ATP de Na) chromatographé, Sigma Chemical Product; Adénosine-diphosphate de barium (ADP), Sigma Chemical Product; Acide adénylique (du muscle) A_5P (AMP), Schwarz Laboratories; Phosphocréatine, sel de sodium (PC), Sigma Chemical Product; Hexose diphosphate de barium (HDP), Schwarz Laboratories; Fructose-6-phosphate de barium (F6P), Schwarz Laboratories.

Nous avons, en outre, étudié les substances suivantes: Glucose-6-phosphate de barium (G6P), Sigma Chemical Product; Glucose-1-phosphate de potassium (G1P), Schwarz Laboratories; Inosine-triphosphate de barium (ITP), Sigma Chemical Product; Inosine-monophosphate de barium (IMP), Sigma Chemical Product.

Les sels de Ba ont été transformés en sels de Na par dissolution en milieu acide, précipitation du barium par Na_2SO_4 en excès, centrifugation et neutralisation par NaOH.

Dans le cas de l'ADP, l'ITP et l'IMP, ces manipulations ont lieu à 2°C pour éviter toute hydrolyse. Les solutions de sels de K ou Na ont été conservées à -20°C et chromatographiées à plusieurs reprises. Les quantités déposées sur le chromatogramme ont varié de 2 à 30 γ .

Dosage du phosphore

Les régions du chromatogramme que l'on désire analyser, ainsi qu'un témoin de même surface prélevé sur le même chromatogramme, sont découpées et minéralisées par 0.7 ml d'un mélange de H_2SO_4 conc. (3 vol) et HClO_4 60 % (4 vol), en chauffant très doucement pendant une heure sur rampe à gaz. Le liquide décoloré, dilué par addition de 5 ml d'eau, est porté à 95°C pendant 20 min environ pour hydrolyser le pyrophosphate éventuellement présent. La teneur en P est déterminée par la méthode colorimétrique de BERENBLUM ET CHAIN⁶. L'absorption est mesurée à 750 m μ au spectrophotomètre Beckman. La récupération du phosphore sur les chromatogrammes est de 93 % au moins. Le papier Whatman No. 1 contient 0.02 à 0.03 γ P/cm². Nous avons préféré la minéralisation par le mélange sulfuro perchlorique couramment employé pour la minéralisation des chromatogrammes (HANES ET ISHERWOOD⁴; EGGLESTON ET HEMS⁷; KREBS ET HEMS⁸) à celle par l'acide sulfurique utilisée par CALDWELL¹. Celle-ci est plus lente, elle nécessite l'introduction de grandes quantités de sulfate de potasse et favorise les pertes de phosphore en élevant la température de minéralisation.

RÉSULTATS

A. Composés phosphorés commerciaux

La chromatographie, dans les deux solvants, des différents produits commerciaux dont nous disposons nous a permis de déterminer leurs R_F et de contrôler leur degré de pureté. Les valeurs obtenues sont comparées à celles de CALDWELL¹ dans le

de P n'est libéré que par une hydrolyse prolongée (8 h) en milieu sulfurique 6 N, en tube scellé à 110° C. Des extraits de muscles au repos, enrichis en phosphagène et en lombricine par fractionnement, ont été chromatographiés et la localisation de ces deux composés a été déterminée au moyen des trois procédés de révélation précédemment décrits.

Les essais décrits ci-dessous ont été appliqués à différents extraits.

Trois taches d'un extrait fractionné par le réactif de FISKE ET SUBBAROW, ainsi qu'une tache d'orthophosphate, ont été chromatographiées simultanément dans chacun des deux solvants. L'examen du chromatogramme en lumière ultra-violette, avant révélation, ne permet de déceler aucune absorption autre que celle de l'acide trichloracétique ($R_F = 4$ environ). Par contre, différentes taches sont observables après révélation suivant les trois procédés indiqués; leurs R_F sont donnés dans le Tableau II. La relation existant entre ces taches a été établie par la chromatographie à deux dimensions du même extrait fractionné. Les taches de R_F 0.7–1.5–2.4 dans le solvant propanol/ammoniaque correspondent respectivement à celles de R_F 0.18–0.55 — > 1 dans le solvant butanol tert./ac. picrique.

TABLEAU II

	HANES ET ISHERWOOD	Ninhydrine	α -Naphtol
l'propanol/ammon.	0.7	0.7	—
	—	1.5	1.5
	—	2.4	—
Butanol tert./ac. picrique	0.18*	0.18*	—
	—	0.55	—
	—	> 1	—

* il y a une trainée indiquant un début d'hydrolyse.

La présence de phosphore non décelable par le réactif de HANES ET ISHERWOOD⁴ (P difficilement hydrolysable de la lombricine) a été vérifiée après chromatographie d'un extrait fractionné, dans le solvant basique; les différentes zones du chromatogramme ont été analysées depuis la ligne de départ jusqu'à la tache de R_F 2.4. Seules les zones de R_F 0.7 et 1.5 contiennent du phosphore.

L'une de ces préparations a été soumise à une hydrolyse de 2 h à 100° C en milieu HCl N. Trois taches de cette préparation ont été chromatographiées et révélées de la même manière que pour le premier de ces essais.

On observe la disparition de la tache de R_F 0.7, la présence de celles de R_F 1.5 et 2.4, l'apparition de P inorganique due à l'hydrolyse du phosphagène et celle d'une nouvelle tache de $R_F \pm 1.1$ révélée seulement par l' α -naphtol hypobromite. Cette dernière tache correspond vraisemblablement au phosphoguanidoethanol, l'un des produits d'hydrolyse acide de la lombricine, l'autre étant la sérine (voir NGUYEN VAN THOI ET ROBIN¹⁰) dont le R_F (dl sérine) est de 2.4. La lombricine aurait donc subi une hydrolyse partielle.

La confrontation de ces essais nous a permis d'attribuer aux deux dérivés guanidiques, les R_F suivants:

Bibliographie p. 307.

	<i>Prop./amm.</i>	<i>Butanol/tert.</i>
Phosphagène	0.7	0.18
Lombricine	1.5	0.55

Le phosphagène a le même R_F que l'ATP dans les deux solvants; la lombricine a le même R_F que les hexosemonophosphates dans le solvant acide et est à peine séparée de ceux-ci dans le solvant basique.

C. Extraits musculaires

(a) Nous examinerons tout d'abord les résultats obtenus dans le cas des muscles au repos. Après chromatographie dans le solvant propanol/ammoniaque et révélation par le réactif de HANES ET ISHERWOOD⁴, 2 taches bien distinctes apparaissent. La première correspond au mélange ATP + phosphagène et la seconde à ADP + orthophosphate. Il n'y a pas d'hexosemonophosphates visibles et la lombricine n'est pas révélée. Par examen en lumière U.V., avant la révélation, on peut repérer l'ATP et l'ADP et des traces d'AMP sont parfois observées. Les chromatogrammes à deux dimensions de ces mêmes extraits, révélés de la même façon, montrent trois taches distinctes: ATP + phosphagène, ADP et orthophosphate; la tache d'ADP est faible; la lombricine et les hexosemonophosphates ne sont pas révélés.

L'analyse quantitative d'un chromatogramme à deux dimensions permet donc de doser le mélange ATP + phosphagène, l'ADP, l'orthophosphate, la zone correspondant à la lombricine + hexosemonophosphates et les zones correspondant à l'AMP et à l'HDP.

Pour connaître les valeurs respectives de l'ATP et du phosphagène, il est nécessaire d'isoler le phosphagène, à partir de chaque extrait étudié, par précipitation des phosphates insolubles par le réactif de FISKE ET SUBBAROW³ (CaCl_2 — $\text{Ca}(\text{OH})_2$, voir préparation du phosphagène). L'extrait fractionné ainsi obtenu, qui contient le phosphagène, la lombricine, l'AMP et les hexosemonophosphates, est chromatographié dans le solvant propanol/ammoniaque. Le phosphagène est ainsi séparé des autres composés de l'extrait fractionné. Il n'est pas possible de doser séparément la lombricine et les hexosemonophosphates.

CALDWELL¹ a observé, dans des extraits de muscles de Tortue, plusieurs substances phosphorées qu'il n'a pas identifiées et dont il indique les R_F . C'est peut-être l'une d'elles que nous avons trouvée en quantité très faible dans les extraits de Lombric. Comme la "Unknown E" de CALDWELL, cette substance (x) est révélée par le réactif de HANES ET ISHERWOOD⁴ et a des R_F de 0.5 dans le propanol/ammoniaque et 0.10 dans le butanol/ac. picrique. Cette substance n'absorbe pas les rayons U.V.

(b) Des extraits de muscles normaux stimulés électriquement pendant 20 min ont ensuite été étudiés. L'aspect des chromatogrammes obtenus ne diffère pas de celui d'un chromatogramme d'extrait de muscles au repos. Cependant la tache d'ATP + phosphagène est plus faible. La lumière U.V. révèle la présence d'AMP.

(c) Quelques extraits ont été réalisés à partir de muscles stimulés 20 et 40 min après intoxication d'une heure à l'acide monobromacétique neutralisé au pH 7.2 (conc.: 1.10^{-4} ; temp.: 20° C). Une nouvelle tache apparaît sur les chromatogrammes, celle de l'HDP. Une faible tache au niveau des hexosemonophosphates a parfois

été observée. La sensibilité de détection des esters phosphorés par le réactif de HANES ET ISHERWOOD diffère considérablement selon les composés. Les composés stables, qui résistent bien à l'hydrolyse acide, tels que l'AMP, le F6P et le G6P sont difficilement décelables en faibles quantités.

Les résultats de l'analyse quantitative de ces différents extraits sont groupés dans le Tableau III. Ils sont exprimés en γ de P/g de muscle frais et comprennent tous les atomes de P de la substance envisagée. Le taux du phosphore total des extraits est assez constant. La moyenne s'établit à 1287 γ de P/g de muscle avec un pourcentage de récupération du P sur les chromatogrammes de 93% au moins.

TABLEAU III

	Muscles au repos				Après 20 min de stimulation électrique			Stimulation électrique après intoxication	
	1	2	3	4	5	6	7	8*	9**
Phosphagène	380	410	353	377	167	148	113	84	66
ATP	251	235	306	243	264	285	255	249	211
ADP	54	56	28	39	39	58	67	78	75
Orthophosphate	175	216	184	217	262	334	381	315	375
Lombricine + monoesters	278	262	285	291	400	391	415	416	487
HDP	—	—	—	—	—	—	—	69	98
AMP	—	—	9	—	—	46	32	46	38
κ	—	17	23	9	19	12	0	0	0
Total:	1138	1196	1188	1176	1151	1274	1263	1257	1350
PO ₄ total après minéralisation de l'extrait	1160	1253	1277	1221	1237	1370	1327	1307	1435
% de P retrouvé	98 %	94 %	93 %	96 %	93 %	93 %	95 %	96 %	94 %

* muscles intoxiqués et stimulés pendant 20 min. ** *idem* pendant 40 min.

Résultats exprimés en γ de P/g de muscle frais.

Les valeurs indiquées comprennent tous les atomes de phosphore de la substance envisagée.

Les extraits 1, 2, 3, 4 ont été effectués sur des muscles au repos. La répartition du phosphore est semblable à celle observée dans les muscles de Vertébrés. Les extraits 5, 6 et 7 ont été réalisés à partir de muscles stimulés électriquement pendant 20 min. On remarque une diminution importante du taux de phosphagène et une augmentation correspondante des teneurs en orthophosphate et en lombricine. Malgré l'apparition d'AMP dans ces extraits, il semble cependant que les teneurs des composés adényliques (ATP, ADP, AMP) aient été peu modifiées. Dans le cas des muscles intoxiqués à l'acide monobromacétique pendant une heure, puis stimulés pendant 20 min (extrait 8) et 40 min (extrait 9), on observe une accentuation très nette des phénomènes de fatigue et en outre une accumulation d'hexosediphosphate provoquée par l'intoxication. L'augmentation du taux d'ADP indique une légère modification du système adénylique. Toutefois, la teneur en ATP est encore remarquablement élevée.

Il est intéressant de comparer les valeurs que nous avons obtenues pour le Lombric avec celles connues pour d'autres Invertébrés.

Dans le muscle de Lombric au repos, nous avons dosé 1400 γ d'ATP/g de muscle frais (moyenne calculée pour les expériences 1, 2, 3, 4). Chez d'autres Inverté-

brés, les valeurs sont du même ordre de grandeur (*Pecten*, muscle strié: 1050 γ , LOHMANN¹¹; *Unio*: 1300 γ , Anodonte: 1700 γ , HÉRIOT¹²; Escargot: 1200 γ , MARTINI et coll.¹³; Ecrevisse: 1050 à 1550 γ , LOHMANN¹¹; Homard: 1200 γ , HÉRIOT¹²; Holothurie: 320 γ , LOHMANN¹¹).

Pour le phosphagène, nous avons trouvé 190 γ de P labile/g de muscle frais. BALDWIN ET YUDKIN² trouvent 137 γ chez la *Néréis*; NEEDHAM, NEEDHAM, BALDWIN ET YUDKIN¹⁴ dosent 452 γ chez la Pieuvre, 61 γ chez une étoile de mer, 60 γ de P de phosphocréatine + 60 γ de P de phosphoarginine chez le Balanoglosse. Chez l'Escargot, MARTINI et ses coll.¹³ dosent 30 γ de P de phosphagène, valeur relativement très basse.

Les manifestations de la fatigue musculaire sont essentiellement les mêmes que chez les Vertébrés. La persistance d'un taux appréciable en ATP après stimulation observée par CALDWELL¹ dans des expériences similaires sur des muscles de Tortue et de Grenouille a été attribuée par cet auteur à l'intervention de la myokinase. Les expériences de stimulation après intoxication révèlent une accumulation d'hexose diphosphate, résultant du blocage de la glycogénolyse au niveau de la triosephosphate deshydrogénase. Les processus de la glycogénolyse chez le Lombric et les Vertébrés sont donc semblables. Les muscles d'Invertébrés ne diffèrent des muscles de Vertébrés, en ce qui concerne leur composition en esters phosphorés, que par une teneur moindre en ATP et nettement plus faible en phosphagène.

RÉSUMÉ

La technique chromatographique sur papier au moyen des solvants propanol *n*/ammoniaque et butanol tertiaire/ac. picrique, utilisée par CALDWELL¹ pour l'étude des composés phosphorés des muscles de Vertébrés, a été adaptée à l'étude d'extraits trichloracétiques de la musculature de Lombric.

Le comportement du phosphagène de Lombric et de sa base guanidique: la lombricine a été déterminé dans ces deux solvants: après chromatographie à deux dimensions des extraits le phosphagène se situe au niveau de l'ATP et la lombricine au niveau des hexosemonophosphates.

Des extraits totaux et fractionnés des muscles de Lombric au repos et stimulés, normaux et intoxiqués ont été analysés. La répartition du phosphore dans le muscle au repos est semblable à celle observée chez les Vertébrés. La teneur en ATP est comparable à celle des autres Invertébrés. Les muscles stimulés électriquement présentent une forte diminution du taux de phosphagène et la persistance d'un taux élevé en ATP.

SUMMARY

The technique of paper chromatography with the solvents *n*-propanol/ammonia and tertiary butanol/picric acid, used by CALDWELL¹ in studying the phosphoric composition of vertebrate muscles, has been adapted to the study of trichloroacetic extracts of earthworm musculature.

The behaviour of the phosphagens of the earthworm and of its guanidine base lombricine has been determined in these two solvents; after two-dimensional chromatography of the extract the phosphagen is situated at the level of the ATP and the lombricine at the level of the hexosemonophosphates.

Analysis has been carried out on whole and fractionated muscles of the earthworm, at rest, stimulated, normal and poisoned. The distribution of phosphorus in the muscle at rest is similar to that observed in the vertebrates. The ATP content is comparable to that of other invertebrates. Muscles stimulated electrically show a great decrease in the proportion of phosphorus and the maintenance of a high proportion of ATP.

Bibliographie p. 307.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Technik der Papierchromatographie mit Hilfe der Lösungsmittel *n*-Propanol/Ammoniak und tertiär-Butanol/Pikrinsäure, welche von CALDWELL¹ zur Untersuchung der Phosphorverbindungen von Wirbeltiermuskeln benützt wurde, ist auf das Studium der trichloressigsäuren Extrakte der Regenwurmmuskulatur angewandt worden.

Die Beweglichkeit des Regenwurm-Phosphagens und der Guanidinbase Lombrizin wurde in diesen beiden Lösungsmitteln untersucht: nach zweidimensionaler Chromatographie der Extrakte situiert sich Phosphagen auf der Höhe von ATP und Lombrizin auf der Höhe der Hexosemonophosphate.

Vollständige und fraktionnierte Extrakte aus ruhenden und stimulierten, normalen und vergifteten Regenwurmmuskeln wurden analysiert. Die Phosphorverteilung in dem ruhenden Muskel ist derjenigen ähnlich, die bei Wirbeltieren beobachtet worden war. Der ATP-Gehalt gleicht dem der anderen Wirbellosen Tiere. Elektrisch stimulierte Muskel zeigen eine starke Verringerung des Phosphagengehaltes und den Fortbestand eines hohen ATP-Gehaltes.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. C. CALDWELL, *Biochem. J.*, 55 (1953) 458.
- ² E. BALDWIN ET J. YUDKIN, *Proc. Roy. Soc. (London) B*, 136 (1949) 615.
- ³ C. H. FISKE ET Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 81 (1929) 629.
- ⁴ C. S. HANES ET F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
- ⁵ J. ROCHE, N. v. THOAI ET J. L. HATT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 71.
- ⁶ I. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.
- ⁷ L. V. EGGLESTON ET R. HEMS, *Biochem. J.*, 52 (1952) 156.
- ⁸ H. A. KREBS ET R. HEMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 172.
- ⁹ N. v. THOAI, J. ROCHE ET Y. ROBIN *Compt. rend. soc. biol.*, 147 (1953) 1670.
- ¹⁰ N. v. THOAI ET Y. ROBIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 76.
- ¹¹ K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, 203 (1928) 164.
- ¹² A. HÉRION, inédit.
- ¹³ E. MARTINI, N. SILO ET A. GRECO, *Bull. soc. ital. biol.*, 21 (1946) 152.
- ¹⁴ D. M. NEEDHAM, J. NEEDHAM, E. BALDWIN ET J. YUDKIN, *Proc. Roy. Soc. (London) B*, 110 (1932) 260.

Reçu le 4 juillet 1955