

L'INFLUENCE DE L'HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE ET FERMENTAIRE SUR LA STRUCTURE DE LA CORTISONE ET DES CORTICOÏDES URINAIRES

par

E. DEMEY, R. VIVARIO, C. HEUSGHEM (*), M. TARTE, M. VLIERS
et H. VAN CAUWENBERGE

Les hormones stéroïdes sont éliminées dans l'urine conjuguées aux acides sulfuriques et glucuronique. Leur hydrolyse pose un problème analytique important. Il est en effet indispensable, avant de les fractionner et de les doser, de les libérer de leurs complexes. Jusqu'à présent, on se contentait, à défaut de méthodes éprouvées, d'extraire une fraction corticoïde des urines acidifiées au pH 1 (HEARD, SOBEL et VENNING (1), TALBOT (2), et DAUGADHAY (3)). Dans ces conditions, une partie des stéroïdes glucurono- et sulfo-conjugués, échappait à l'extraction.

En raison de leur spécificité, les glucuronidases et sulfatases diastatiques constituent des moyens précieux d'hydrolyse des stéroïdes conjugués; elles présentent cependant certains inconvénients pour les déterminations en série. VANEK et DEVIS (4) ont étudié récemment une méthode pratique d'hydrolyse des corticoïdes de l'urine par l'action de l'acide chlorhydrique à l'ébullition. Cette méthode présente *a priori* des avantages évidents autant par les nouveaux aspects qu'elle ouvre dans la chimie des stéroïdes que par son utilité pour la détermination clinique des corticoïdes urinaires.

Nous avons cru utile d'étudier la répercussion éventuelle de ce traitement chimique sur la structure des corticoïdes dont certaines fonctions sont fragiles. On connaît par exemple les artefacts qu'engendre l'acide chlorhydrique sur la molécule des 17-cétostéroïdes (DORFMAN (5)).

Nous rapportons ici les résultats d'une étude analytique de l'influence qu'exercent comparativement l'acide chlorhydrique à l'ébullition et l'hydrolyse fermentaire sur les différentes fonctions chimiques de la molécule de cortisone.

(*) Associé du F. N. R. S.

Nous faisons en outre état des résultats des dosages, par différentes méthodes, de corticoïdes urinaires hydrolysés par les 2 processus envisagés.

I. — INFLUENCE DE L'ÉBULLITION HCl SUR LES FONCTIONS RÉACTIONNELLES DE LA MOLÉCULE DE CORTISONE

A) MATÉRIEL UTILISÉ.

Notre étude a porté sur trois échantillons d'hormones :

1° Cortisone pure, substance de référence.

2° Cortisone en solution, amenée à pH 1 par HCl, N., puis extraite par le CHCl_3 et ensuite isolée par évaporation sous vide du solvant.

3° Cortisone en solution, portée à l'ébullition 8 minutes en présence de 10 p. 100 (en volume) d'Hcl concentré, extraite à CHCl_3 , puis isolée par évaporation du solvant.

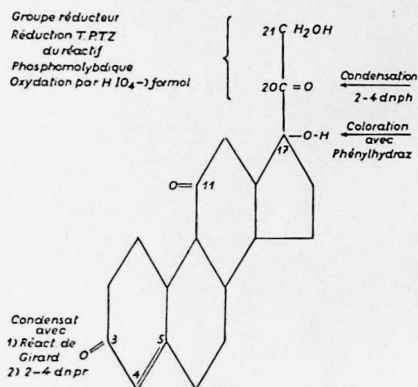


FIG. I.

Formule de 17-hydroxy-11-déhydro-corticostérone.

B) TECHNIQUES.

Les procédés suivants ont été employés :

1° Pour la fonction cétone en 3- conjuguée à une double liaison :

— condensation avec le réactif T de Girard suivie d'un dosage polarographique (WOLFF *et al.*, 6).

2° Pour la fonction CO en 20- :

— condensation avec la 2-4-dinitrophénylhydrazine et dosage colorimétrique de l'hydrazone obtenue (GORNALL et MACDONALD, 7).

3° Pour l'hydroxyle en 17- voisin d'une cétone en 20- :

dosage par la phénylhydrazine sulfurique. Nelson et Samuels (8).

4° Pour la mesure du pouvoir réducteur :

a) le réactif de Heard-Sobel (liqueur phosphomolybdique);

b) le bleu de tétrazolium : formation de formasan par réduction de tétrazolium (CONEY *et al.*, 9).

5° Pour la fonction formaldéhydogène : microdiffusion de formol après oxydation périodique de l'hormone, à l'aide des cellules de Conway (DEMEY *et al.*, 10).

RÉSULTATS

A) *La fonction cétone en 3- conjuguée à une double liaison.* — Le réactif T de Girard se condense avec la cétone en position 3 pour donner un complexe identifiable par la mesure du potentiel auquel il est réduit (-1.1 V.). On les dose par polarographie en mesurant la vague de réduction ionique qui est proportionnelle à la concentration du complexe dans la solution.

Pour les 3 échantillons étudiés, nous avons obtenu des vagues de réduction de hauteurs identiques au potentiel de -1.1 volt. On peut donc conclure que la fonction 3-CO est restée intacte dans la molécule de cortisone après ébullition chlorhydrique.

B) *La fonction cétone en 20-.* — Le réactif de Girard permet de doser la fonction CO en 3-, mais ne donne aucune indication quant à la fonction CO en 20-; l'hydroxyle en 17- empêchant la condensation de la cétone en 20- avec le réactif de Girard dans les conditions opératoires utilisées.

La 2-4-dinitrophénylhydrazine a été employée pour tester les 2 fonctions C=O en 3- et en 20- de la molécule de cortisone. La 2-4-dinitrophénylhydrazine, suivant les conditions décrites par GORNALL et MACDONALD (5), se condense tant avec la cétone en 3- conjuguée à une double liaison, qu'avec la cétone de la chaîne latérale, pour donner une hydrazone colorée. Les valeurs colorimétriques obtenues pour les hydrazones formées à partir de quantités identiques de cortisone, soumises ou non à l'action de l'acide chlorhydrique chaud, ont été identiques.

Nous pouvons dès lors conclure qu'après ébullition chlorhydrique, la cétone en 3- subsiste et qu'il existe en position 20- une fonction capable de réagir avec la 2-4-dinitrophénylhydrazine. Il convient de faire certaines restrictions quant à la nature de cette dernière fonction car, ainsi que les

résultats ultérieurs l'ont montré, rien ne permet d'affirmer qu'il s'agit d'une fonction cétone.

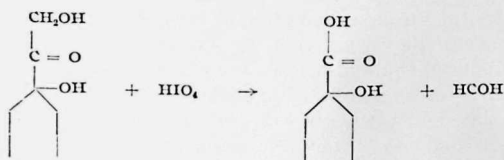
C) *L'hydroxyle en 17- voisin d'une cétone en 20.* — La réaction décrite par NELSON et SAMUELS (8) utilise pour le dosage des 17-hydroxystéroïdes la coloration jaune produite avec ces corticoïdes par la phénylhydrazine sulfurique. En comparant les différents résultats obtenus, nous observons que l'ébullition chlorhydrique diminue d'environ 20 p. 100 la possibilité de réaction de la cortisone avec la phénylhydrazine. Nous devons donc admettre que, dans une certaine mesure, la fonction 17-hydroxyle est transformée par l'ébullition chlorhydrique, résultats qui confirment ceux obtenus précédemment par DEVIS (4).

D) *Le pouvoir réducteur de la chaîne latérale en 17.* — Le pouvoir réducteur de la cortisone avant et après ébullition chlorhydrique a été testé par 2 méthodes :

Utilisant la méthode de HEARD-SOBEL, on constate que le pouvoir réducteur de la cortisone envers le réactif phosphomolybdique est légèrement augmenté (DEVIS, 1). Alors que, vis-à-vis du chlorure de triphényltétrazolium, l'ébullition chlorhydrique provoque une perte de 50 p. 100 du pouvoir réducteur de l'hormone envers ce réactif.

Cette discordance dans les pouvoirs réducteurs dus à la chaîne latérale de la cortisone vis-à-vis de réactifs différents, nous incite à penser qu'il y a une modification de la structure de cette chaîne.

E) *La fonction formaldéhydrique.* — Il a été établi que l'action de l'acide periodique sur la chaîne latérale de la cortisone produit une scission de cette chaîne avec libération de formol.



Nous avons dosé le formol libéré par l'acide periodique à partir de cortisone pure et de cortisone ayant subi l'action de l'acide chlorhydrique à chaud. Nous avons constaté qu'après ébullition avec de l'HCl, le pouvoir formaldéhydrique de la cortisone a pratiquement disparu. Ces résultats suggèrent une modification au cours du traitement chlorhydrique de la molécule au niveau des carbones 20 et 21.

Conclusion. — Au terme de l'étude analytique entreprise, il semble bien que l'hydrolyse chlorhydrique, si elle ne modifie pas les fonctions 3-CO et 20-CO de la cortisone, provoque néanmoins une dégradation de sa chaîne latérale qui se traduit par une diminution du pouvoir réducteur vis-à-vis du bleu de tétrazolium et une perte quasi totale du pouvoir formaldéhydogène.

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS * OBTENUS DANS LES ANALYSES QUANTITATIVES DES DIFFÉRENTES FONCTIONS DE LA CORTISONE AVANT ET APRÈS ÉBULLITION CHLORHYDRIQUE

	CORTISONE T	EXTR. A pH 1	EXTR. APRÈS ÉBULL. HCl
$\Delta_3C = 0$	<i>Dosage Girard — Polarographie</i>		
	20 40	20 41	23 40
$\Delta_3C = 0$ $20 C = 0$	<i>Dosage colorimétrique — 2-4-dinitrophénylhydrazine</i>		
	10 20	10 20,6	10 21
17-OH	<i>Dosage phénylhydrazine sulfurique</i>		
	10 20		7 14
Pouvoir réducteur: O	a) <i>Dosage colorimétrique par liq. phosphomolybdique</i>		
	20		23
CH ₂ OH C = O 	b) <i>Dosage colorimétrique au T. P. T. Z.</i>		
	50 100		21 43
Fonction formaldéhydogène CH ₂ OH C = O C — OH / \	<i>Oxydation périodique — dosage formol</i>		
	20 40		0,64 2

(*) µg cortisone.

II. — ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES TRANSFORMATIONS SUBIES PAR LA MOLÉCULE DE CORTISONE LORS DE L'ÉBULLITION CHLORHYDRIQUE

La technique décrite par BUSH (11) a été utilisée pour étudier le comportement chromatographique de la cortisone et des produits de dégradation obtenus par l'hydrolyse chlorhydrique. Les solvants benzène

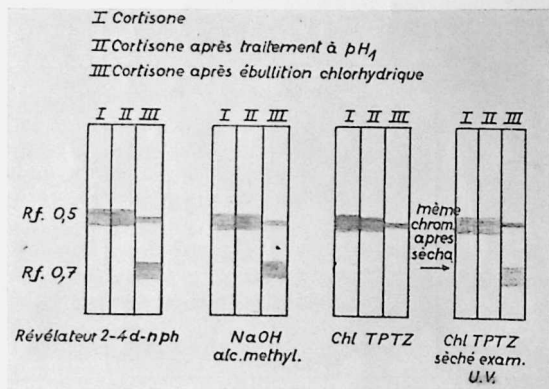


FIG. 2. — Papyrographie de la cortisone dans diverses conditions.

pour la phase mobile et alcool méthylique 50 p. 100, eau 50 p. 100 pour la phase stationnaire ont été employés. Dans ce système, la cortisone pure possède un Rf. de 0,5.

Divers révélateurs réagissant sur différentes fonctions de la molécule ont permis de déceler la position des stéroïdes sur le papyrogramme :

1° La 2-4-dinitrophénylhydrazine réagit dans les conditions opératoires avec la fonction Δ_4 3-CO (DEMEY *et al.*, 12).

2° La solution de NaOH-CH₃OH donne, après séchage à l'étuve, une fluorescence avec les substances possédant également cette Δ_4 3-CO.

3° Le chlorure de triphényltétrazolium en solution NaOH-CH₃OH donne sur le papier humide des taches bleues caractéristiques des réducteurs et, après séchage du papier, une fluorescence jaune avec les substances cétoniques en 3.

Des essais chromatographiques effectués, il résulte que l'hydrolyse chlorhydrique produit la transformation de la quasi-totalité de la cortisone en une substance qui

- possède dans le système chromatographique (BUSH) un Rf. de 0,7,
- garde une fonction $\Delta_4 3 \text{C}=\text{O}$ intacte,
- n'est pas réductible au bleu de tétrazolium,
- se situe au point de vue polarité, parmi la gamme des stéroïdes étudiés par BUSH, plus bas que la cortisone et plus haut que la corticostérone.

III. — EXAMEN SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DANS L'INFRAROUGE DE LA CORTISONE PURE ET DE LA CORTISONE APRÈS ÉBULLITION CHLORHYDRIQUE

Les spectres ont été pris dans la région 4 000-650 centimètres /minutes au moyen d'un appareil Perkin-Elmer 21, équipé d'un prisme de NaCl. Ces substances ont été étudiées en phase solide, en utilisant la technique des pastilles de KBr de STIMSON (13) et SCHIEDT (14).

Les résultats se présentent comme suit :

1° Le contour de la région spectrale 1 300-800 centimètres /minutes est profondément modifié quand on passe de la cortisone pure au produit résultant de l'action de HCl. Ceci prouve d'une façon irréfutable que l'action de HCl à chaud sur la cortisone s'accompagne d'une modification chimique de cette dernière substance.

2° L'examen des régions 1 600-1 750 centimètres /minutes (caractéristique des liaisons $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{O}$) et 3 200-3 600 centimètres /minutes (caractéristique des fonctions OH) permet de préciser quelque peu cette indication. Toutefois, il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de donner une interprétation certaine des modifications spectrales observées :

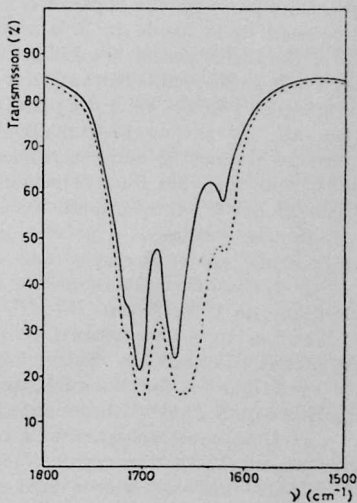


FIG. 3. — Spectre infrarouge de la cortisone et de la cortisone traitée par HCl.

a) Région 3 200-3 600 centimètres/minutes (fonctions OH). Il apparaît dans cette région spectrale des modifications apparemment contradictoires : quand on passe de la cortisone à son produit de dégradation, le maximum d'absorption (correspondant aux fonctions OH) est décalé d'environ 60 centimètres/minutes vers les hautes fréquences, ce qui montre que l'une au moins des fonctions OH de la cortisone a été modifiée. Mais d'autre part, l'intensité de l'absorption n'a guère varié, observation qui s'accorde mal avec la disparition pure et simple d'une fonction OH. Ceci nous conduit à admettre que, au cours de la réaction, une des fonctions OH de la cortisone a disparu, mais a été remplacée par une autre fonction OH. Cette hypothèse permet d'interpréter et le décalage de la position du maximum d'absorption et la constance approximative de l'intensité de l'absorption. Nous préciserons cette hypothèse après examen des autres modifications spectrales.

b) Région 1 600-1 750 centimètres/minutes (liaisons C=C et C=O). La bande correspondant à la liaison C=C en 4, et les 3 bandes correspondant aux liaisons C=O en 3, 11 et 20, n'ont pas subi de modification décelable (tant en position qu'en intensité). Par contre, il apparaît une nouvelle bande, relativement intense, vers 1 660 centimètres/minutes (la position de cette nouvelle bande n'est pas mesurable avec une bonne précision parce qu'elle apparaît comme un épaulement sur l'aile de basse fréquence de la bande due à la fonction C=O en 3). La valeur même de cette fréquence permet d'attribuer cette nouvelle bande avec une quasi-certitude à une double liaison (C=C ou C=O). D'autre part, son intensité, relativement élevée, rend peu plausible son attribution à une liaison C=C. (En effet, les travaux de JONES (15) ont montré que les liaisons C=C des stéroïdes donnent généralement naissance à des bandes de faible intensité.) Nous pouvons donc attribuer cette bande à un groupement C=O (groupement C=O qui, d'ailleurs, n'est pas nécessairement cétonique).

Si nous résumons à présent les points essentiels de la discussion, cette étude spectroscopique nous conduit aux conclusions suivantes :

1° L'ébullition chlorhydrique est accompagnée d'une modification chimique de la cortisone.

2° Les trois groupements cétoniques et la double liaison C=C ne paraissent pas modifiés.

3° L'une des fonctions OH disparaît (les tests chimiques montrent d'ailleurs qu'il s'agit de la fonction OH en 21).

4° Il apparaît au cours de la réaction une autre fonction OH et un groupement C=O.

Toutes ces conclusions sont vérifiées si l'on admet l'hypothèse très simple que l'ébullition chlorhydrique de la cortisone s'accompagne d'une oxydation transformant le groupement terminal CH_2OH en groupe

COOH (disparition d'un OH; apparition d'un groupe C=O et d'un nouveau groupe OH, réunis ici dans le même groupement fonctionnel COOH).



Toutefois, nous insistons tout particulièrement sur le fait que cette interprétation ne doit être considérée, à l'heure actuelle, que comme une *hypothèse de travail*.

Remarquons enfin qu'il existe une bonne concordance entre les résultats obtenus par spectrophotométrie I. R. et ceux que fournit l'étude analytique :

- 1° Conservation de la cétone en 3 conjuguée à la double liaison en 4.
- 2° Conservation de la cétone en 20.
- 3° Disparition du groupe OH en 21.

Enfin, les variations observées dans l'étude du pouvoir réducteur de la chaîne latérale peuvent s'interpréter si l'on admet que le voisinage du groupement COOH modifie, d'une façon différente suivant les réactifs, le pouvoir réducteur de la fonction C=O en 20.

Notons également que la réaction proposée ici ne rend pas compte de la disparition partielle du groupement hydroxyle en 17. Cette disparition partielle résulte probablement d'une réaction secondaire que nous n'avons pas étudiée jusqu'à présent.

IV. — APPLICATIONS BIOLOGIQUES

Des recherches analogues aux précédentes ont été entreprises avec de la cortisone ayant subi l'action enzymatique des sucs digestifs d'*Helix Pomatia*. Aucune altération de ses fonctions chimiques et de son comportement chromatographique n'a pu être mise en évidence.

Dans le but de comparer l'influence de diverses techniques d'hydrolyse sur la libération des stéroïdes urinaires, les urines de 24 heures de 10 sujets, normaux du point de vue endocrinien et au repos au lit, sont récoltées sur cyanure de mercure (1 cm³ à 1 %).

Ces urines furent soumises à divers procédés d'hydrolyse en vue du dosage des stéroïdes réducteurs suivant la méthode de HEARD-SOBEL et VENNING, et des 17-hydroxycorticostéroïdes suivant une technique personnelle dérivée de celle de NELSON et SAMUELS (16).

Des parties aliquotes des 5 premières urines furent soumises aux 3 types d'hydrolyse suivants :

1° Hydrolyse à pH 1 (H_2SO_4) à température ordinaire, suivie d'extractions immédiates par le mélange éther-chloroforme (4-1).

2° Hydrolyse par l'acide chlorhydrique 8 minutes à 100° (VANEK et DEVIS).

3° Hydrolyse par le suc digestif d'*Helix Pomatia* (48 h à 37° C, pH 5,8) (HENRY et THEVENET (17)).

Pour les 5 autres urines, un essai supplémentaire a été réalisé. Après extraction à pH 7, des corticoïdes libres, les urines furent soumises à une hydrolyse chlorhydrique à chaud comme au 2°.

Les résultats des dosages de corticoïdes sont détaillés ci-après.

TABLEAU I

CAS	STÉROÏDES RÉDUCTEURS			17-HYDROXYSTÉROÏDES		
	pH 1	HCl à chaud	S. H. P.	pH 1	HCl à chaud	S. H. P.
1	2 445	5 700	5 850	88	276	608
2	1 155	2 800	11 000	143	880	1 540
3	6 698	13 600	14 960	578	accident	2 210
4	1 875	5 250	6 000	67	450	1 350
5	1 024	3 200	3 360	40	1 112	1 200

TABLEAU II

CAS	STÉROÏDES RÉDUCTEURS					17-HYDROXYSTÉROÏDES			
	pH 1	HCl à chaud	pH 7	2° extr. HCl à chaud	S. H. P.	pH 1	HCl à chaud	Extr. pH 7 + HCl à chaud	S. H. P.
A	1 760	4 460	3 400	1 000	5 700	140	400	400	5 200
B	2 525	12 500	4 625	6 875	14 800	132	1 375	850	1 562
C	1 950	10 500	1 080	7 800	13 680	150	1 080	450	2 625
D	1 920	7 800	1 512	accident	9 360	108	370	340	3 360
E	1 640	5 960	1 240	3 780	7 860	68	346	374	996

On peut constater à la lecture de ces tableaux que :

1° Dans tous les cas, la valeur tant des stéroïdes réducteurs que des 17-hydroxycorticostéroïdes est plus élevée après hydrolyse fermentaire ou chlorhydrique qu'après hydrolyse à pH 1.

2° Les chiffres les plus élevés sont obtenus après hydrolyse par le suc digestif d'*Helix Pomatia*, spécialement en ce qui concerne les 17-hydroxycorticostéroïdes pour lesquels on peut observer des valeurs 10 fois plus élevées.

3° Dans les échantillons qui ont subi directement l'hydrolyse chlorhydrique à chaud, les valeurs de stéroïdes réducteurs et des 17-hydroxycorticostéroïdes sont souvent supérieures à la somme des chiffres fournis par les échantillons qui ont subi l'extraction directe à pH 7 suivie d'une hydrolyse chlorhydrique à chaud.

4° L'hydrolyse chlorhydrique à chaud paraît altérer plus la fonction 17-hydroxyle que la fonction réductrice des corticoïdes.

5° Il n'y a pas de relation constante entre les valeurs trouvées après hydrolyse fermentaire et celles fournies par l'hydrolyse chlorhydrique à chaud.

6° Il n'existe aucun parallélisme entre les valeurs trouvées après hydrolyse à pH 1 et celles fournies par l'hydrolyse chlorhydrique à chaud ou hydrolyse fermentaire.

CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ

1° L'hydrolyse chlorhydrique à l'ébullition, si elle ne modifie pas la fonction 3-CO et 20-CO de la cortisone provoque néanmoins une dégradation de sa chaîne latérale qui se traduit par une diminution du pouvoir réducteur vis-à-vis du bleu de tétrazolium et une perte quasi-totale du pouvoir formaldéhydogène. L'altération qu'elle produit dans la molécule a ses répercussions dans le comportement chromatographique et le spectre I. R. du stéroïde.

2° L'hydrolyse enzymatique par le suc digestif d'*Helix Pomatia* ne paraît pas altérer la structure chimique de la cortisone. Elle ne modifie point ses fonctions chimiques ni son comportement chromatographique.

3° Les essais d'hydrolyse effectués sur les urines confirment les observations antérieures et montrent que l'on doit donner la préférence à l'hydrolyse fermentaire pour obtenir une hydrolyse complète et conserver l'intégrité structurale des produits libérés.

(Université de Liège, Laboratoire de chimie médicale (Pr VIVARIO), de Chimie générale (Pr DOR), Laboratoire de la Clinique Médicale A. (Pr ROSKAM), Centre pour l'Étude de la cortisone subsidié par le Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HEARD (R. D.), SOBEL (H.), VENNING (E. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **165**, 699.
- [2] TALBOT (W.-B.), SALTZMAN WIXOM. — *B. C.* 1945, **160**, 535.
- [3] DAUGHADAY (W.-H.), JAFFÉ (H.) et WILLIAMS (R.-H.). — *Clin. Endocrinol.*, 1948, **8**, 616.
- [4] VANEK (R.) et DEVIS (R.). — *Ann. Endocrinol.*, 1954, **15**, 201.
- [5] DORFMAN (R.). — *Recent Progress in Hormone Research*, 1948, **2**, 190.
- [6] MORRIS (O. R.) et WILLIAMS (D. C.). — *Biochem. J.*, 1953, **54**, 470.
- [7] GORNALL (A. G.) et McDONALD (M. P.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, **201**, 279.
- [8] NELSON (D. H.) et SAMUELS (L. T.). — *J. Clin. Endocrinol.*, 1952, **12**, 519.
- [9] COURCY (C. DE), BUSH (I. E.), GRAY (C. H.) et LUNNON (J. B.). — *J. Endocrinol.*, 1953, **9**, 401.
- [10] DEMEY-PONSART (E.), FAIDHERBE (J.), VIVARIO (R.), HEUSGHEM (C.) et VAN CAUWENBERGE (H.). — *Ann. Endocrinol.*, 1954, **15**, 614.
- [11] BUSH (I. E.). — *Biochem. J.*, 1951, **50**, 370.
- [12] DEMEY-PONSART (E.), VIVARIO (R.) et HEUSGHEM (C.). — *Ann. Endocrinol.*, 1954, **15**, 361.
- [13] STIMSON (M. M.) et O'DONNELL (M. J.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 1805.
- [14] SCHIET (U.) et REINWEIN (H.). — *Z. Natur.*, 1952, **7 b**, 270.
- [15] JONES (R. N.), HUMPHRIES (P.), PACKARD (E.) et DOBRINER (K.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 86.
- [16] VIVARIO (R.), VAN CAUWENBERGE (H.), VLIERS (M^{lle} M.) et HEUSGHEM (C.). — *Ann. Endocrinol.*, 1954, **15**, 365.
- [17] HENRY (R.) et THEVENET (H.). — *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1952, **9**, 886.

Le Gérant : Georges MASSON.

Dépôt légal 1955 (4^e trimestre) N^o d'ordre : 2.109 — MASSON et C^{ie}, Éditeurs, Paris

Imprimé par l'Imprimerie Alençonnaise, Maison Poulet-Malassis, Alençon (Orne)

Dépôt légal 1955 (4^e trimestre). — N^o d'ordre : 3.882