



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Comptes Rendus Chimie

www.sciencedirect.com



Preliminary communication/Communication

Activité antiplasmodiale *in vitro* des composés isolés des écorces du tronc de *Vitex thyrsoflora*



In vitro antiplasmodial activity of the isolated compounds from the stem bark of *Vitex thyrsoflora*

Théodora K. Kopa^{a, b, *}, Pierre Tane^a, Hippolyte K. Wabo^a, Michel F. Tala^{a, c}, Alembert T. Tchinda^b, Denis Zofou^d, Tan Ning-Hua^c

^a Département de chimie, faculté des sciences, université de Dschang, B.P. 67, Dschang, Cameroun

^b Institut de recherche médicale et d'études des plantes médicinales (IMPMP), B.P. 6163, Yaoundé, Cameroun

^c Laboratoire de phytochimie et des ressources naturelles à l'ouest de la Chine, Institut botanique de Kunming et Académie chinoise des sciences, Kunming 650204, Yunnan, R.P. de Chine

^d Unité de biotechnologie, université de Buea, B.P. 63, Buea, Cameroun

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 July 2015

Accepted 8 October 2015

Available online 30 January 2016

Keywords:

Vitex thyrsoflora

Verbenaceae

Triterpènes

Steroids

Antiplasmodial activity

Cameroun

Mots clés :

Vitex thyrsoflora

Verbenaceae

Triterpènes

Stéroïdes

Activité antiplasmodiale

Cameroun

R É S U M É

L'étude phytochimique de l'extrait au dichlorométhane des écorces du tronc *Vitex thyrsoflora* Baker (Verbenaceae) a permis d'isoler six composés identifiés à l'acide 20(R),24(E)-3-oxo-9β-lanosta-7,24-diène-26-oïque (**1**), α-amyrine (**2**), β-amyrine (**3**), friedeline (**4**), au palmitate de β-sitostérol (**5**) et au glucoside de β'-sitostérol (**6**). Tous ces composés ont été isolés pour la première fois de cette plante. Leurs structures ont été élucidées sur la base de leurs données spectroscopiques et par comparaison avec celles de la littérature. Le composé **5** a présenté une activité antiplasmodiale significative avec des CI₅₀ de 3,09 et 8,98 μg/mL, contre les souches multi-résistantes Dd2 et K1 de *P. falciparum*, tandis que celle des composés **1** et **4** était modérée. Toutes les molécules testées ont été non cytotoxiques sur la souche de cellule épithéliale de singe (LLC-MK2). Les résultats obtenus peuvent justifier l'utilisation traditionnelle des écorces du tronc de *Vitex thyrsoflora* dans le traitement du paludisme.

© 2015 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

A B S T R A C T

Phytochemical study of *Vitex thyrsoflora* (Verbenaceae), a medicinal plant commonly used in traditional medicine to treat malaria, have allowed to isolate six compounds identified 20(R),24(E)-3-Oxo-9β-lanosta-7,24-dien-26-oic acid (**1**), α-amyrin (**2**), β-amyrin (**3**), friedelin (**4**), β-sitosterol palmitate (**5**) and a sterol glucoside (**6**). All these compounds were isolated for the first time in this plant. Their structures were determined on the basis of their physical and spectroscopic data (IR, MS, UV, NMR) and by comparison of these data with those reported in the literature. Compound 5 showed significant antiplasmodial activity with IC₅₀ of 3,09 and 8,98 μg/mL against multi-resistant strains Dd2 and K1 of *P. falciparum*. All these constituents were isolated from this plant for the first time. The tested compounds were non-cytotoxic on

* Corresponding author. B.P. 6163, Yaoundé, Cameroun.

E-mail address: kothera81@yahoo.fr (T.K. Kopa).

the LLC-MK2 monkey kidney epithelial cells. The results obtained can justify the use of *Vitex thyrsoflora* stem bark in traditional medicine for the treatment of malaria.

© 2015 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Le paludisme est la parasitose la plus répandue dans le monde. Même si les chiffres récents annoncent une diminution globale de mortalité de 25% dans la région africaine par rapport à la situation de 2000, il reste l'un des facteurs de pauvreté très important sur ce continent [1]. Environ 300–500 millions de cas cliniques et de 1,2 à 2,8 millions de décès dus au paludisme surviennent chaque année. Le *Plasmodium falciparum*, espèce responsable du taux de mortalité et de morbidité dû au paludisme en Afrique sub-saharienne, développe des résistances aux traitements actuels tels les ACT [2]. Face à ce phénomène, la recherche de nouveaux antipaludiques est d'un besoin urgent. L'isolement de la quinine et de l'artémisinine à partir des espèces *Cinchona ledgeriana* et *Artemisia annua* respectivement et de plusieurs autres métabolites secondaires ayant des propriétés anti-malariales valide les plantes médicinales comme une source potentielle de médicaments [3]. Les plantes du genre *Vitex* sont connues pour leur utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement du paludisme [4]. Ce genre comprend près de 250 espèces constituées d'arbres ou d'arbustes localisés dans les régions tropicales et subtropicales [5].

Vitex thyrsoflora Baker (Verbenaceae) est un petit arbre glabrescent largement répandu au Cameroun [6]. Dans les régions où ils sont trouvés, leurs écorces du tronc sont utilisées pour le traitement de l'orchite. Au Cameroun, plus précisément dans la région du Littoral, la population locale utilise la décoction des écorces du tronc pour traiter les infections parasitaires, incluant le paludisme [6]. Les écorces des racines sont également utilisées dans le traitement des douleurs de l'estomac et de la stérilité [7]. Les études chimiques antérieures menées sur les feuilles et les fruits de cette plante ont conduit à l'isolement de la 20-hydroxyecdysone [7]. Toutefois, les recherches effectuées sur d'autres espèces du genre *Vitex* ont abouti à l'isolement des iridoïdes [8], des lignanes [9,10], des diterpènes [11,12], des stéroïdes [13], des flavonoïdes et des triterpénoïdes [10]. À notre connaissance, aucune étude phytochimique et biologique n'a été rapportée jusqu'à présent sur les écorce du tronc de cette plante.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles substances antiparasitaires à partir des plantes médicinales du Cameroun [14], nous avons porté nos investigations sur l'étude phytochimique, l'activité antiplasmodiale *in vitro* des extraits et des composés purifiés à partir de *Vitex thyrsoflora* Baker.

2. Méthodologie

2.1. Partie expérimentale

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil de point de fusion X-4-micro et ne sont pas corrigés. Les spectres Infrarouge (IR) ont été enregistrés sur un

spectrophotomètre SHIMADZU FTIR-8400S. Les rotations optiques ont été obtenues avec un polarimètre numérique JASCO P-1020. Les spectres de masse en impact électronique (I.E à 70 eV) ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre de type Jeol JMX AX-500 et d'un spectromètre AX-700. Les spectres de masse à haute résolution en mode électrospray (ESI) ont été réalisés sur un spectromètre Micro masse Time of flight QTOF (Daltonique Bruker). Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre de type Bruker Avance I DRX 500, tandis que les spectres RMN 2D ont été réalisés sur un spectromètre de type Bruker Avance 600. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz (Hz). Les diverses chromatographies de purification ont été réalisées en utilisant comme phase stationnaire le gel de silice de type Merck, dont les particules ont un diamètre compris entre 0,063 et 0,200 mm ou le gel de Séphadex LH-20. Les plaques préfabriquées de silice 60 GF₂₅₄ ont été utilisées pour la chromatographie sur couche mince et révélées à la lumière UV (254 ou 365 nm), ensuite pulvérisées avec l'acide sulfurique à 50% et chauffées à l'étuve.

2.2. Matériel végétal

Les écorces du tronc de *V. thyrsoflora* Baker (Verbenaceae) ont été récoltées en novembre 2009 à Melong (région du Littoral, Cameroun). Elles ont été identifiées par M. Nana Victor par comparaison de l'échantillon à un spécimen authentique de l'Herbier national du Cameroun (N° 34861 HNC).

2.3. Extraction et isolement

Les écorces du tronc de *V. thyrsoflora* ont été découpées, séchées et broyées. La poudre obtenue (6 kg) a été extraite à température ambiante avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1, 3×15 L) pendant 3 jours, pour fournir 170 g d'extrait brut après évaporation sous pression réduite. Une portion de cet extrait (160 g) a été suspendue dans l'eau (1 L) et extraite de nouveau au CH_2Cl_2 ($3 \times 1,5$ L), à l'AcOEt ($3 \times 1,5$ L) et au *n*-BuOH ($3 \times 1,5$ L) pour donner respectivement 70, 20 et 80 g. 60 g de la fraction soluble au CH_2Cl_2 ont été chromatographiés sur colonne de gel de silice, élués au système *n*-hexane/AcOEt (100:0 ; 95:5 ; 90:10 ; 80:20 ; 1:1 ; 0:100) puis AcOEt-MeOH (90:10 ; 80:20 ; 0:10), par polarités croissantes, pour donner 47 fractions de 600 mL. Ces fractions ont été recueillies et combinées sur la base de la CCM analytique pour conduire à cinq fractions majeures A–E (A : 1–6 ; B : 7–10 ; C : 11–16 ; D : 17–35, E : 36–47). La fraction A (10 g), contenant principalement les acides gras, n'a pas été étudiée. La fraction B (2 g) a été purifiée par

chromatographie sur colonne de gel de silice (Φ 30 mm \times L 500 mm) avec le système *n*-hexane/AcOEt (100:0, 99:1, 98:2, 95:5, 90:10, 85:15 et 80:20) pour donner les composés **2** (30 mg) et **3** (45 mg). De même, la fraction C (10 g) a été chromatographiée sur colonne de gel de silice (Φ 60 mm \times L 400 mm) avec un mélange *n*-hexane/AcOEt (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30 et 0:100) pour donner les composés **4** (20 mg) et **5** (36 mg). La fraction D (10 g) a été également séparée par chromatographie à l'aide d'une colonne de gel de silice (Φ 30 mm \times L 500 mm) en utilisant le système de solvant *n*-hexane/AcOEt (100:0, 95:5, 90:10 et 0:100) comme phase mobile. Les sous-fractions éluées avec le système *n*-hexane/AcOEt (95:5) (70 mg) ont été combinées et chromatographiées à nouveau avec le système *n*-hexane/acétone/CH₂Cl₂ (8.5:1:0.5) pour conduire au composé **1** (52 mg) et à un mélange complexe de β -sitostérol, campestérol et stigmastérol (5 g). La fraction E (5,0 g) a précipité dans l'AcOEt et nous avons obtenu après filtration le composé **6** (100 mg).

2.4. Evaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro* et de la cytotoxicité

Les tests de sensibilité aux extraits et composés ont été réalisés sur des plaques de 96 puits selon la méthode décrite par Desjardins et al. [15], avec quelques modifications [14,15]. Les produits à tester ont été préalablement dissous dans 200 μ L de diméthylsulfoxyde (DMSO) et prédilué avec le milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 1000 μ g/mL (extraits bruts et fractions) et 200 μ g/mL (composés purs). Les essais précédents ont montré que les concentrations inférieures ou égales à 0,5% étaient inactives sur le *Plasmodium falciparum*. Toutes les solutions stock ont été stérilisées par passage à travers un microfiltre de 0,2 μ m de diamètre avant leur conservation à -20 °C jusqu'à l'utilisation. Dans les mêmes conditions, une solution stock de dichlorhydrate de quinine à 2 μ g/mL (Rotexmedica, Trittau, Allemagne) a été préparée et utilisée comme contrôle positif. Cependant, le milieu ajusté à 0,5% v/v de DMSO a été utilisé comme contrôle négatif ; ainsi, le DMSO a été au contact des parasites. La parasitémie,

préalablement estimée par microscopie (appréciation qualitative), a été quantifiée au début et à la fin du test par la méthode enzymatique qui repose sur l'activité de la lactate déshydrogénase [14].

La cytotoxicité des extraits et des composés purs a été évaluée contre la souche LLC-MK2 (ATCC) des cellules épithéliales de rein de singe, en utilisant le test de tétrazolium [(3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl))] (MTT) [16,17].

3. Résultats et discussion

L'extrait au dichlorométhane des écorces du tronc de *V. thyriflora* a été chromatographié sur une colonne de gel de silice pour donner plusieurs sous-fractions, qui ont été de nouveau purifiées sur colonne de chromatographie ouverte pour conduire à six composés connus (Fig. 1). Ces derniers ont été identifiés à l'acide 20(R),24(E)-3-*oxo*-9 β -lanosta-7,24-dien-26-oïque (**1**) [18], α -amyrine (**2**) [19], β -amyrine (**3**) [20], friédeline (**4**) [20], palmitate de β -sitostérol (**5**) [21] et au glucoside de β -sitostérol (**6**) [20], tous rapportés ici pour la première fois dans cette plante. Leurs structures ont été élucidées sur la base de leurs données spectroscopiques par comparaison avec celles de la littérature.

Les extraits à l'AcOEt et au CH₂Cl₂ ainsi que les fractions issues de l'extrait au CH₂Cl₂ et quatre des composés isolés (**1**, **3–5**) ont été évaluées pour leur activité antiplasmodiale *in vitro* contre les souches multi-résistantes Dd2 et K1 de *P. falciparum* (Tableau 1). L'extrait à l'AcOEt a présenté une activité antiplasmodiale *in vitro* modérée (15 μ g/mL \leq Cl₅₀ \leq 50 μ g/mL), tandis que l'extrait au CH₂Cl₂ a été actif (5 μ g/mL \leq Cl₅₀ \leq 15 μ g/mL) avec une Cl₅₀ = 14,32 μ g/mL [22]. La fraction E a présenté une activité antiplasmodiale *in vitro* très intéressante (Cl₅₀ < 5 μ g/mL), suivie de la fraction D qui a été active (5 μ g/mL \leq Cl₅₀ \leq 15 μ g/mL). Les fractions A et B ont présenté une activité antiplasmodiale *in vitro* modérée (15 μ g/mL \leq Cl₅₀ \leq 50 μ g/mL) comparée à la fraction C qui a été inactive (Cl₅₀ > 50 μ g/mL). De tous les composés testés, seul le palmitate de β -sitostérol a présenté une activité antiplasmodiale très significative avec les Cl₅₀ de 3,09 et

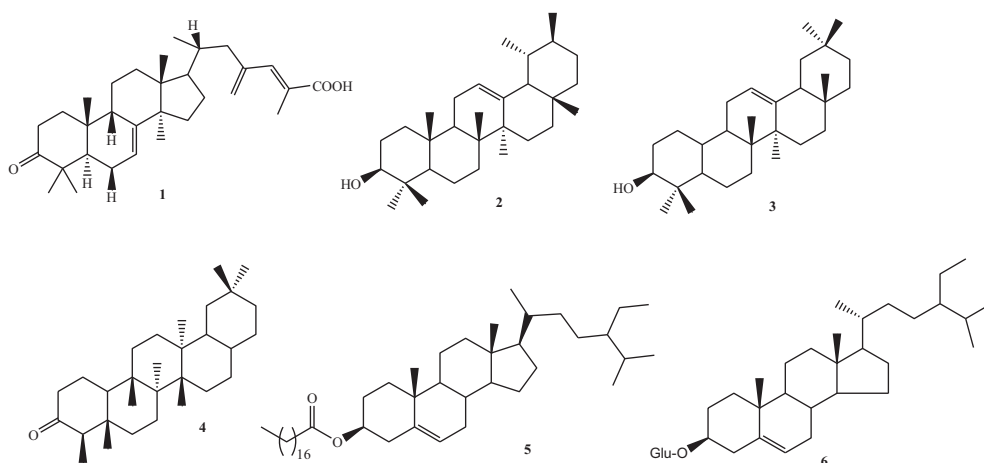


Fig. 1. Structures des composés isolés (1–6).

Tableau I

Activité antiplasmodiale *in vitro* de l'extrait à l'AcOEt, au dichlorométhane, des fractions et de quatre composés (**1**, **3**–**5**) isolés de *V. thyrsoiflora*.

Substances	Activité antiplasmodiale		Cytotoxicité
	Cl ₅₀ sur Dd2 (µg/mL)	Cl ₅₀ sur K1 (µg/mL)	CC ₅₀ sur LLC-MK2 (µg/mL)
Extrait à l'AcOEt	16,75 ± 4,34	–	–
Extrait au CH₂Cl₂	14,32 ± 0,59	–	–
F–A	31,76 ± 1,49	–	–
F–B	46,54 ± 6,67	–	–
F–C	65,53 ± 6,23	–	–
F–D	12,96 ± 2,41	–	–
F–E	3,93 ± 0,04	–	–
L'acide 20(R),24(E)-3-oxo-9β-lanosta-7,24-dien-26-oïque (1)	16,09 ± 2,13	45,58 ± 0,98	>100
β-amyrine (3)	67,56 ± 2,45	78,59 ± 1,85	>100
Friedeline (4)	21,34 ± 3,56	13,66 ± 1,07	>100
Palmitate de β-sitostérol (5)	3,09 ± 0,88	8,98 ± 2,39	>100
Quinine	0,0035 ± 0,002	0,060 ± 0,01	–

Cl₅₀ : Concentration Inhibitrice exprimée en µg/mL ; CC₅₀ : concentration cytotoxique exprimée en µg/mL ; Extrait AcOEt : extrait brut à l'acétate d'éthyle ; Extrait CH₂Cl₂ : extrait brut au chlorure de méthylène ; F–A, F–B, F–C, F–D et F–E : fractions obtenues des extraits bruts.

8,98 µg/mL. L'acide 20(R),24(E)-3-oxo-9β-lanosta-7,24-dien-26-oïque (**1**) et la friedeline (**4**) ont été faiblement actifs avec des Cl₅₀ allant de 16,09 à 21,34 µg/mL, respectivement, tandis que la β-amyrine (**3**) s'est avérée inactive (Cl₅₀ > 50 µg/mL). Selon Bero et al. [22], l'activité antiplasmodiale *in vitro* d'un composé est considérée comme très grande lorsque sa Cl₅₀ < 1 µg/mL. Pour une 2 µg/mL ≤ Cl₅₀ ≤ 11 µg/mL, le composé est actif. Lorsque 11 µg/mL ≤ Cl₅₀ ≤ 50 µg/mL, il est considéré comme faiblement actif. Les composés ayant une Cl₅₀ > 50 µg/mL sont considérés inactifs [22]. Les résultats obtenus démontrent que le composé **5** présente un potentiel considérable et pourrait être exploité comme point de départ pour les héli-synthèses des composés antiplasmodiaux. Re-tester cette molécule en combinaison avec d'autres principes actifs pourrait également accroître son efficacité. La friedeline (**4**) a été précédemment isolée des écorces du tronc de *Endodesmia calophylloides* (Guttiferae) et évaluée pour son activité antiplasmodiale *in vitro* contre la souche chloroquinolé-résistante W2 de *P. falciparum*. Elle a montré une Cl₅₀ de 7,2 µM, illustrant une activité modérée de cette molécule [23]. Néanmoins, les tests effectués ici ont plutôt révélé une activité négligeable sur les souches W2 et K1, ce qui souligne une grande variabilité de l'effet de l'activité de la friedeline en fonction des souches de parasite en présence. Le glucoside de sitostérol (**6**) n'a plus fait l'objet de test dans le présent travail car il a été précédemment évalué *in vitro* et largement exploré par d'autres auteurs. Ledit composé (**6**) a démontré, en culture synchronisée, une activité considérable contre la souche sensible 3D7 (Cl₅₀ = 1,90 µg/mL) et une très faible activité contre la souche résistante à la quinine Dd2 (Cl₅₀ = 5,34 µg/mL) [24] ; tandis qu'elle a été reportée inactive (Cl₅₀ > 10 µg/mL) sur la souche W2 en culture synchronisée [25]. Toutes les molécules testées ont été non cytotoxiques sur la souche de cellules épithéliales de singe, même à 75 µg/mL de

concentration. L'activité antiplasmodiale *in vitro* de cette plante ainsi que celle des composés **1** et **5** sont rapportées ici pour la première fois.

4. Conclusion

Les études menées sur l'extrait au dichlorométhane des écorces du tronc de *Vitex thyrsoiflora* ont conduit à l'isolement de six composés (Fig. 1). Cet extrait a été actif (Cl₅₀ > 10 µg/mL) contre la souche Dd2 de *P. falciparum* résistante à la quinine. Quatre composés isolés dudit extrait ont été évalués pour leur activité antiplasmodiale contre les souches multi-résistantes Dd2 et K1 de *P. falciparum*. L'acide 20(R),24(E)-3-oxo-9β-lanosta-7,24-dien-26-oïque (**1**), la β-amyrine (**3**), et le palmitate de β-sitostérol (**5**) ont été identifiés comme les principes actifs dudit extrait (Tableau I). Les résultats de l'activité antiplasmodiale *in vitro* de l'extrait brut et des composés **1**, **4** et **5** pourraient ainsi justifier l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle pour le traitement du paludisme et suggèrent que ces métabolites soient considérés comme de potentiels candidats d'agents antipaludiques.

Remerciements

Nous sommes reconnaissants envers l'université de Dschang pour le financement de certains consommables, la Fondation internationale pour la science (IFS), Stockholm (Suède), l'Organisation pour l'interdiction des armes chimiques, La Haye, Pays-Bas (FIS OIAC, financement n° F/4901-1 [Prof. Hippolyte K. Wabo] et n° F/5122-1 [Dr Denis Zofou]) et l'Académie chinoise des sciences (CAS) pour leur soutien financier.

Références

- [1] WHO, World Malaria Report, WHO Press, Geneva, 2011, pp. 58–62.
- [2] E.C. Ibezim, O. Uche, Afr. J. Biotech. 7 (2008) 349.
- [3] K. Kaur, M. Jain, T. Kaur, R. Jain, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 3229.
- [4] E. Nyiligira, A.M. Viljoen, F.R. Van Heerden, R.L. Van Zyl, S.F. Van Vuuren, P.A. Steenkamp, J. Ethnopharmacol. 119 (2008) 680.
- [5] D.J. Mabberley, The Plant-Book: A portable Dictionary of the Vascular Plants, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1997, p. 749.
- [6] J.E. Adjanohoun, N. Aboubakar, K. Dramane, M.E. Ebot, J.A. Ekpere, E.G. Enoworock, D. Focho, Z.O. Gbile, A. Kamanyi, K.J. Kamsu, A. Keita, K.T. Mben, C.N. Mbi, A.L. Mbiele, I.L. Mbome, N.K. Mubini, W.L. Nancy, B. Nkongmeneck, B. Satabi, A. Sofowora, V. Tamze, C.K. Wirmum, Traditional Medicinal Pharmacopoeia: Contribution to Ethnobotanical and Floristics Studies in Cameroon, CNPMS (Centre national de production de manuels scolaires), Porto-Novo, 1996, p. 409.
- [7] I. Kubo, Matsumoto, F.J. Hanke, J.F. Ayafor, J. Chromatogr. 321 (1984) 246.
- [8] A. Kuruzum-Uz, K. Stroch, L.O. Demirezer, A. Zeeck, Phytochemistry 63 (2003) 959.
- [9] M. Ono, Y. Nishida, C. Masuoka, J.-C. Li, M. Okawa, T. Ikeda, T. Nohara, J. Nat. Prod. 67 (2004) 2073.
- [10] S. Chenchugari, V.R. Karumanchi, V.S. Gottumukkala, Phytochemistry 66 (2005) 1707.
- [11] M. Ono, M. Yamamoto, T. Yanaka, Y. Ito, T. Nohara, Chem. Pharm. Bull. 49 (2001) 82.
- [12] V.E. Rasamison, L. Ranaivo-Harimanana, S. Cao, E. Pan, Ratovoson, F. Randriantafika, R. Rakotonandrajona, S. Rakotonandrasana, R. Andriantsiferana, D. Kingston, Fitoterapia 81 (2010) 55.
- [13] A. Suksamrarn, C. Sommechai, P. Charulpong, B. Chitkul, Phytochemistry 32 (1995) 473.
- [14] D. Zofou, T.K. Kowa, H.K. Wabo, P. Tane, V.P.K. Titandji, Malar. J. 10 (2011) 1.

- [15] R.E.T. Desjardins, C.J. Canfield, J.D. Haynes, J.D. Chulay, *Antimicrob. Agents Chem.* 16 (1979) 710.
- [16] A.L. Niles, R.A. Moravec, T.L. Riss, *Curr. Chem. Genom.* 3 (2009) 33.
- [17] A.L. Niles, R.A. Moravec, T.L. Riss, *Expert Opin. Drug Discov.* 3 (2008) 655.
- [18] M.F. Da Silva, R.H.P. Francisco, A.I. Gray, J.R. Lechat, P. Waterman, *Phytochemistry* 29 (1990) 1620.
- [19] C.Y. Ragasa, M.C. Lapina, J.J. Lee, E.H. Mandia, J.A. Rideout, *Nat. Prod. Res.* 22 (2008) 820.
- [20] M. Parveen, Z. Khanam, M. Ali, S.Z. Rahman, *Nat. Prod. Res.* 24 (2010) 167.
- [21] Z.I. Zedan, S.A. Amany, A.R. Mahmoud, *Pharm. J.* 16 (2008) 69.
- [22] J. Bero, M. Frédérich, J. Quetin-Leclercq, *J. Pharm. Pharmacol.* 61 (2009) 1401.
- [23] E.T. Ngouamegne, R.S. Fongang, S. Ngouela, F.F. Boyom, M. Rohmer, E. Tsamo, J. Gut, P.J. Rosenthal, *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2008) 374.
- [24] D. Zofou, E.L. Tematio, F. Ntie-Kang, M. Tene, N.M. Ngemenya, P. Tane, V.P.K. Titanji, *PLoS One* 10 (2013) 2013.
- [25] L.R.T. Yamthe, P.V.T. Fokou, C.D.J. Mbouna, R. Keumoe, B.L. Ndjakou, P.T. Djouonzo, A.N. Mfopa, J. Legac, N. Tsabang, J. Gut, P.R. Rosenthal, F.F. Boyom, *Medicines* 2 (2015) 55.