

Étude de l'effet de composés antipaludiques sur *Plasmodium falciparum* par imagerie multispectrale

Yapi Maxime YAPO^{1,2}, Jocelyne Mamaket BOSSON², Kossan Olivier BAGUI¹,
Kigbafori SILUE³ et Jérémie Thouakesseh ZOUEU^{1*}

¹ Institut National Polytechnique Houphouët-Boigny, Unité Mixte de Recherche et d'Innovation en Electronique et en Electricité Appliquées, Laboratoire d'Instrumentation Image et Spectroscopie, BP 1093 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire

² Université Nangui Abrogoua, UFR Sciences Fondamentales et Appliquées, Laboratoire de Physique Fondamentale et Appliquée, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

³ Université Félix Houphouët Boigny, UFR Biosciences, Laboratoire de Zoologie et Biologie Animale, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

* Correspondance, courriel : izoueu@yahoo.fr

Résumé

Dans ce travail, nous avions étudié l'effet de deux antipaludéens (la luméfantrine et l'artésunate) sur le *Plasmodium falciparum* au sein du globule rouge par imagerie multispectrale. Notre approche est basée sur le déplacement du pic de la bande de Sorét de 400 nm vers 435 nm dans le spectre d'absorption du globule rouge lorsque celui-ci est infecté par le parasite. Une scène d'images multispectrales (obtenues à partir d'enregistrements de treize capteurs spectraux couplés à un microscope multimodal et multispectral) de frottis sanguins non marqués est obtenue à partir de culture de *P. falciparum*, à laquelle différentes doses d'antipaludéen ont été ajoutées. Ces images sont ensuite utilisées pour étudier l'effet de ces médicaments sur le parasite. Des résultats importants ont été obtenus ; l'intensité du pic à 435 nm et l'écart d'intensité de pic à 435 nm et à 400 nm ($I(\lambda_{435}) - I(\lambda_{400})$) diminuent suivant les doses croissantes de médicament. La variation de ces paramètres (liés à la quantité relative d'hémozoïne dans la cellule infectée) traduit l'effet de ses médicaments sur l'activité intra-érythrocytaire du parasite. Les résultats obtenus attestent que l'imagerie multispectrale peut servir comme technique de routine dans l'évaluation de nouvelles molécules antipaludiques, notamment issues de la pharmacopée africaine.

Mots-clés : *imagerie multispectrale, Plasmodium falciparum, effet antipaludique, interaction hemozoïne-médicament, bande de Sorét.*

Abstract

Antimalarial drugs effect study against *Plasmodium falciparum* using multispectral imagery

In this work, we studied the effect of 2 antimalarial drugs (lumefantrine and artesunate) against *Plasmodium falciparum* infecting red blood cell (rbc) using multispectral imagery. The criterion of displacement of Soret band from 400 nm to 435 nm in the red blood cell absorption spectra is used to identify the parasite within cell. A scene of multispectral images of free labelled blood smears have been obtained from *P. falciparum*

culture to which we have added different quantities of drug; the images have been recorded from thirteen spectral sensors coupled with a multimodal and multispectral microscope. These images have been used to study the effect of the drugs against *P. falciparum*. Important results are obtained; the intensity of the pic at 435 nm and difference between pics intensity ($I(\lambda_{435})-I(\lambda_{400})$) at 435 nm and at 400 nm decrease as a function of increasing drug concentration. The variation of these parameters which are function of relative quantity of hemozoin testifies the effect of drug. These important results show that the multispectral imagery can be used as routine method for the new antimalarial drug especially provided from african traditional pharmacopeia.

Keywords : *multispectral imagery, Plasmodium falciparum, antimalarial drug effect, hemozoin - drug binding, soret band.*

1. Introduction

Le paludisme est une maladie causée par des parasites du genre *Plasmodium* dont la plus répandue et la plus mortelle est le *Plasmodium falciparum*. Le nombre de cas de paludisme estimés en 2017 dans le monde est de 219 millions. Par ailleurs, les données concernant la période 2015-2017 ne révèlent aucun progrès significatif vers une diminution du nombre de cas de paludisme dans le monde [1]. Le paludisme se présente comme un problème majeur de santé publique causant près d'un demi million de décès chaque année (435 000 décès dont 266 000 enfants moins de 5 ans en 2017). L'Afrique sub-saharienne a enregistré le plus fort taux (93 %) des décès dus au paludisme en 2017 [1]. Face à la menace que représente cette pathologie, la mise au point d'outils nouveaux et la recherche de nouveaux médicaments sont urgemment attendus [2]. Une approche pour le développement de nouveaux antipaludéens est basée sur l'étude de l'inhibition de la formation de l'hémozoïne [3, 4]. L'hémozoïne est le produit du processus de désintoxication par le parasite de l'hème issue de la digestion de l'hémoglobine. Le parasite (trophozoite) ingère et dégrade environ 60-80 % de la quantité initiale d'hémoglobine dans le globule rouge [5]. L'inhibition de cette voie vitale pour le parasite est le mode d'action de plusieurs antipaludéens (comme la luméfantrine et l'artésunate) [6]. Des études ont montré que ces composés interfèrent avec l'aggrégation des molécules d'hème en hémozoïne augmentant la toxicité due à l'hème libre (dans la vacuole digestive) pour le parasite [4 - 6].

Dans ces études, l'évaluation de l'effet des antipaludéens sur la formation de l'hémozoïne s'effectue sur la base du rapport de la quantité relative d'hémozoïne et celle de l'hème libre dans la vacuole digestive du parasite [4, 6] ou en mesurant l'absorbance de la bande de Sorét à 402 nm [5] par la méthode de titration spectrophotométrique. L'effet d'antipaludéen sur le *P. falciparum* peut être aussi évalué par imagerie multispectrale en employant les techniques d'analyses multivariées [7]. L'hémoglobine, cible du parasite dans sa phase érythrocytaire est le constituant principal du globule rouge. Elle est caractérisée par un pic d'absorption à 405 nm ; c'est la bande de Sorét de l'hémoglobine. Il a été montré qu'un globule rouge infecté voit son pic d'absorption être décalé vers 435 nm [8]. L'étude de la variation (en intensité) de ces pics peut servir de moyen d'évaluation de l'effet des antipaludéens sur le *P. falciparum* en utilisant l'imagerie multispectrale. En effet, l'imagerie multispectrale permet d'acquérir pour un même champ, des images en transmission, pour plusieurs longueurs d'ondes [9]. Par analyse spectrale, il est possible de caractériser et identifier les constituants de ces images multispectrales [7, 10]. Dans ce présent travail, nous proposons une méthode d'évaluation de l'effet d'antipaludéens basée sur la mesure des pics d'absorption du globule rouge à 400 nm et 435 nm. Pour cela, une méthode d'identification des globules rouge infectés (GRi) dans une image multispectrale en transmission par application d'une fonction de contaste couplée à l'analyse de leur spectre d'absorption sera réalisée. Ensuite les spectres d'absorption de ces (GRi) traités à différents doses d'antipaludéens (luméfantrine, artésunate) seront utilisés afin d'étudier la variation des pics d'absorption à 400 nm et 435 nm.

2. Matériel et méthodes

2-1. Préparation de l'échantillonage

Les échantillons ont été préparés et fournis par le Centre Suisse de Recherche Scientifique de Côte d'Ivoire (CSRS). Ils correspondent à la culture du *P. falciparum* à laquelle différentes doses de médicament ont été ajoutées. Les concentrations (C_2 ; C_3 ; C_4 ; C_5 ; C_6 ; C_7 ; C_8 ; C_9 ; C_{10}) des médicaments sont obtenues en diluant respectivement par 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 32 ; 64 ; 128 ; 256; 512 la concentration initiale C_1 . Ensuite, un prélèvement a été effectué pour réaliser les frottis. Ces échantillons sont faits sans marqueur afin préserver les propriétés optiques spécifiques des composants du globule rouge pour l'analyse .

2-2. Procédure d'acquisition d'images multispectrales

Le système d'acquisition de données a été décrit largement dans plusieurs cas d'études sur le paludisme [7 - 10]. Les données sont acquises pour les trois modes de géométries (Transmission , Réflexion et Diffusion) avec 13 longueurs d'onde suffisantes pour étudier les propriétés optiques des cellules biologiques [11]. Le mode Transmission été utilisé pour étudier l'effet du médicament, car il révèle mieux la présence des substances à l'intérieur de la cellule [7].

2-3. Prétraitement des images

Les images acquises par le système sont traitées selon la procédure décrite dans les études faites précédemment [7 - 11]. Pour chaque longueur d'onde, la procédure en transmission est :

- Capture de l'image transmise par l'échantillon sur la lame ($S_{xy\lambda}$);
- Capture de l'image de la lame vide ($R_{xy\lambda}$), mesure dite de référence;
- Capture de l'image en obstruant le passage de la lumière ($B_{xy\lambda}$), mesure dite du bruit de fond.

L'image finale $IT_{xy\lambda}$ s'obtient comme défini dans *l'Équation 1* :

$$IT_{xy\lambda} = \frac{S_{xy\lambda} - B_{xy\lambda}}{R_{xy\lambda} - B_{xy\lambda}} \quad (1)$$

2-4. Fonction de contraste

Un pixel dans une image multispectrale capturée par un microscope peut être considéré comme un mélange de signatures optiques de plusieurs chromophores [7]. Il est donc possible d'extraire les paramètres optiques de ce mélange correspondant aux quantités relatives à ces éléments. L'un des avantages de l'imagerie multispectrale réside dans le fait que plusieurs constituants différents peuvent être caractérisés et identifiés simultanément par leurs signatures spectrales [10]. Parmi les paramètres quantitatifs tels que la taille de cellules, la forme, la texture, l'analyse des spectres obtenus par imagerie multispectrale est un facteur important pouvant être utilisé en plus, pour permettre la détection et l'identification appropriées de cellules dans les images. Dans cette étude la fonction de contraste $f(x,y)$ définie par [12] a été utilisée pour détecter la présence du parasite à l'intérieur de la cellule hôte selon *l'Équation 2*. Le mode transmission (trans) qui permet une bonne estimation de l'absorption est choisi. L'intensité des pixels d'une image multispectrale en transmission est fonction de la concentration du point , de son épaisseur et de son coefficient d'extinction. L'hémoglobine possède une bande d'absorption à 400 nm. La présence de l'hémozoïne à l'intérieur du globule rouge provoque un déplacement du pic à 435 nm [8].

$$f(x, y) = \frac{\log_{10}(I(x, y)_{trans(435)} + 1)}{\log_{10}(I(x, y)_{trans(400)} + 1)} \quad (2)$$

$I(x, y)_{trans(435)}$ étant l'intensité du pixel à 435 nm en mode transmission et $I(x, y)_{trans(400)}$ l'intensité du pixel à 400 nm en mode transmission.

Comme définie, cette fonction de contraste rehausse les pixels des points de l'image à 435 nm.

3. Résultats et discussion

3-1. Représentation RVB des images multispectrales

Les longueurs d'onde utilisées pour les mesures vont de l'ultraviolet au proche infra-rouge (375, 400, 435, 470, 525, 590, 625, 660, 700, 750, 810, 850, 940 nm). Pour avoir les images en vrai couleur (RVB), elles ont été normalisées ; à 625 nm pour le rouge (R), à 525 nm pour le vert (V), et 470 nm pour le bleu (B) (**Figure 1**). Cette **Figure** montre la même région de l'échantillon vue par microscope multispectral sous les trois modes de géométrie (transmission, réflexion et diffusion). Ces images en vraie couleur apparaissent telles comme on les verrait à travers un microscope bioculaire sous lumière blanche. Les globules rouge (Gr) sont observés distinctement séparés les uns des autres. On peut donc comparer les trois modes de géométrie à chaque pixel de l'image. En mode transmission, certains Gr sont perçus comme absorbant plus de lumière que d'autres au niveau de leur centre. Le centre de ces mêmes Gr apparaissent noir en mode réflexion. En mode diffusion, les bordures des hématies donnent lieu à des diffusions très importantes. Lors du cycle érythrocytaire, le *P. falciparum* entre dans le globule rouge et s'y développe. Au stade trophozoïte, le parasite ingère et dégrade environ 60 - 80 % de la quantité initiale d'hémoglobine suivie de la biocrystallisation de l'hème libre en hémozoïne dans sa vacuole digestive [5]s. Les observations faites sur ces images **Figure 1** ont été analysées afin de détecter la présence du parasite à l'intérieur du globule rouge.

3-2. Détection du parasite à l'intérieur du globule rouge

L'imagerie multispectrale offre la possibilité de caractériser et d'identifier différents constituants contenus dans une image par leurs signatures spectrales. En plus de la forme, la taille des objets que donne l'image multispectrale, l'analyse des spectres obtenus peuvent servir à détecter et identifier les globules rouges infectés. Dans le cadre de cette étude, la stratégie adoptée pour différencier les cellules (infectées des non infectées) est l'utilisation d'une fonction de contraste (*par. 0.*) combinée aux spectres d'absorption des chromophores présents dans le frottis sanguin. L'application de cette fonction de contraste sur une image multispectrale permet d'éclairer le chromophore d'intérêt (le parasite) et d'éteindre les autres chromophores. Le parasite étant logé au sein de l'hématie, il est nécessaire de considérer l'intérieur de la cellule hôte. L'application de la fonction de contraste sur l'une des images multispectrales donne la **Figure 2a**. Pour l'analyse cette celle-ci, deux globules rouges ont été choisis ; un globule rouge fléché en rouge et un autre fléché en bleu **Figure 2a**. L'observation de ces deux globules rouge révèle une différence importante ; le globule rouge fléché en bleu montre en son sein une coloration plus chaude (jaune) par rapport aux autres éléments du globule rouge (bleu). Ceci pourrait signaler la présence du parasite à l'intérieur de la cellule hôte. Il s'avère donc nécessaire de pousser plus loin l'analyse en considérant les spectres d'absorption de ces deux globules rouge (Gr). Le tracé de spectres d'absorption de ces deux cellules est présenté par la **Figure 2b**. Le spectre d'absorption du Gr fléché en bleu présente un pic d'absorption à 435 nm plus importante qu'en 400 nm. Ce Gr est donc infecté par le parasite. En effet d'après les travaux de [8] un globule rouge infecté par le *P. falciparum* voit son pic d'absorption à 400 nm être décalé à 435 nm. La fonction de contraste ainsi établie permet donc de détecter la présence du parasite dans le globule rouge conformément aux résultats de [8].

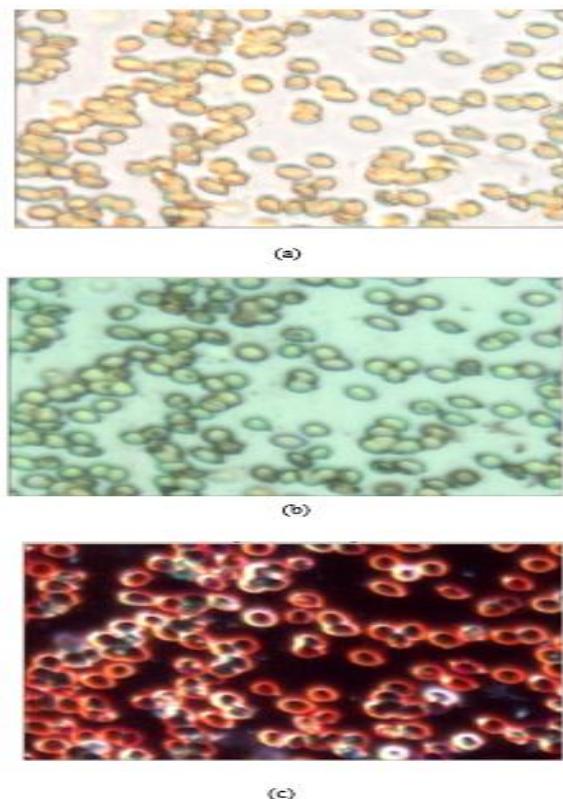


Figure 1 : Réprésentation en RVB d'une image multispectrale en transmission (a), en réflexion (b) et en diffusion (c)

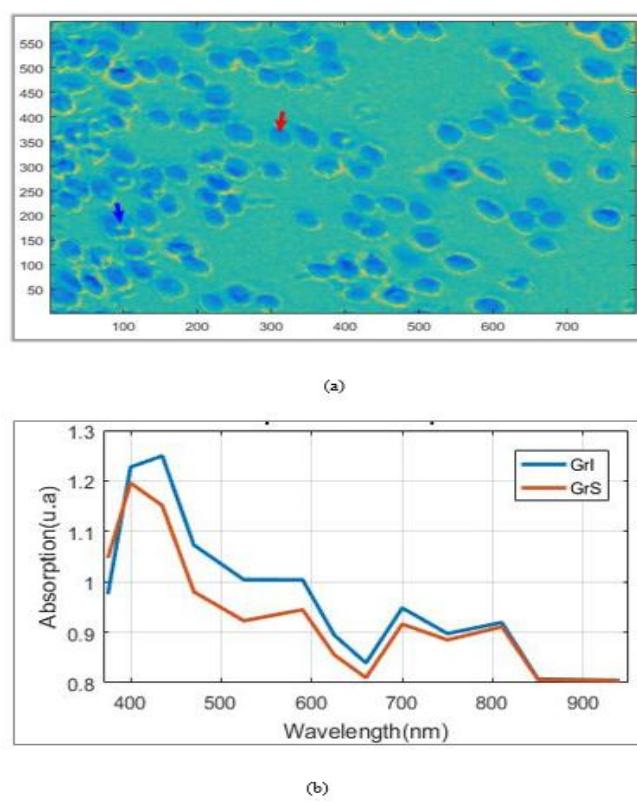


Figure 2 : Image obtenue après application de la fonction de contraste sur une image de frottis sanguin (a) et spectres d'absorption correspondant à deux globules rouge sain (rouge) et infecté (bleu) (b) sur l'image

3-3. Étude de l'effet des médicaments

Les antipaludéens (luméfantrine, artésunate) utilisés dans le cadre de cette étude sont des schizonticides sanguins qui détruisent les parasites intra-érythrocytaires [13]. Cette étape de l'étude consiste à élucider l'effet de ces antipaludéens sur le parasite au sein des globules rouges. Il s'agit d'étudier l'évolution de l'intensité des pics des spectres d'absorption à 400 nm et 435 nm des globules rouges en fonction de la dose du médicament. Après avoir identifié les cellules infectées dans chaque image pour chaque dose du médicament grâce l'application de la fonction de contraste, leur spectre d'absorption est réalisé sur le même graphe **Figure 3 et 4**. Sur certaines images multispectrales de frottis, l'on ne trouve pas de cellules infectées. Cela peut être attribué au choix du champ dans l'acquisition de ces images. Seuls les graphes de cellules infectées ont été tracés.

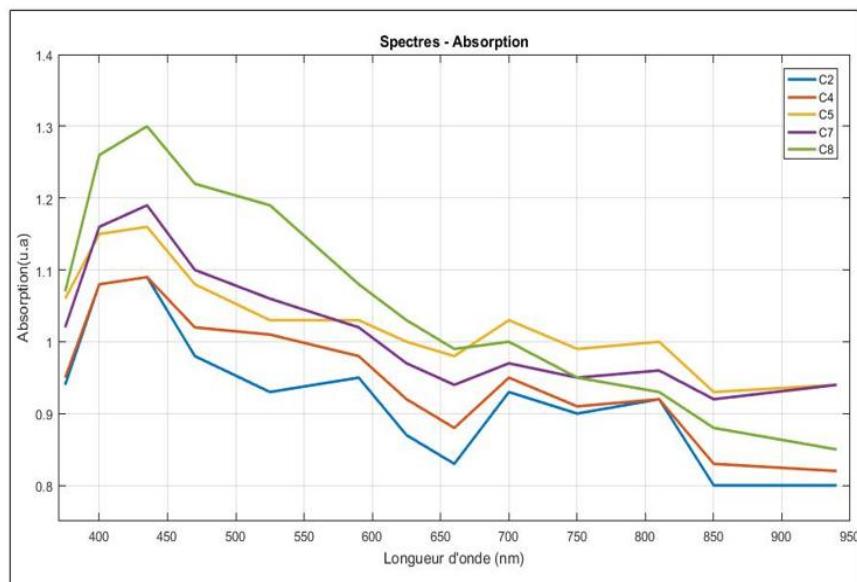


Figure 3 : Spectres d'absorption de 5 globules rouges parasités soumis à différentes concentrations de luméfantrine

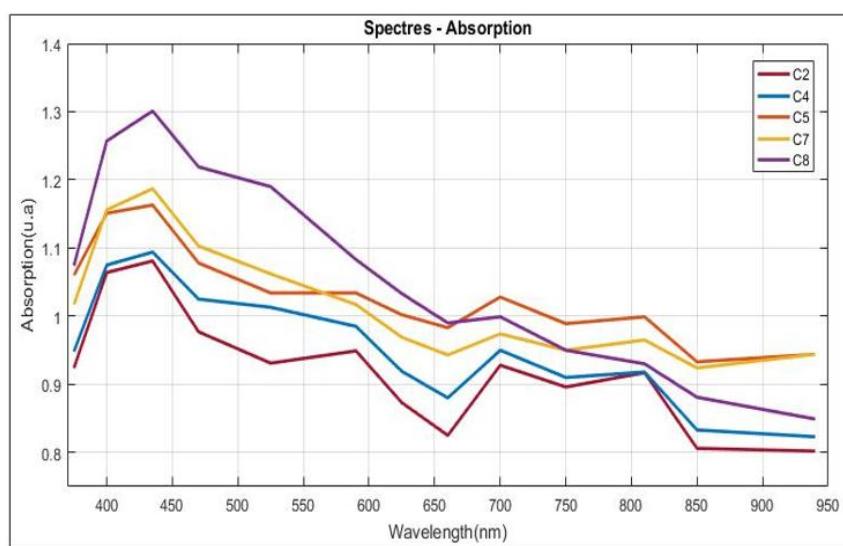


Figure 4 : Spectres d'absorption de 5 globules rouges parasités soumis à différentes concentrations d'Artésunate

L'allure de ces courbes est suivant les doses croissantes des médicaments, tout au moins jusqu'à 560 nm **Figure 3 et 4**. Des pics sont observés autour de 400 nm, 435 nm, 525 nm, 700 nm et à 825 nm dans ces spectres d'absorption **Figure 3 et 4**. On observe une décroissance de l'intensité de la bande de Sorét (à 400 nm) du globule rouge parasité quand la concentration des médicaments augmente. Les longueurs d'onde des Leds utilisés vont de l'ultraviolet au proche infrarouge (375, 400, 435, 470, 525, 590, 625, 660, 700, 750, 810, 850 et 940 nm). L'hémoglobine possède trois bandes caractéristiques autour de 400 nm, 530 nm et 560 nm [14]. L'hémozoïne indicateur de la présence du parasite comporte trois pics caractéristiques situés autour de 415 nm, 560 nm et 660 nm [15]. Un pixel dans une image multispectrale pour le microscope à transmission peut être considéré comme un mélange des spectres de transmission de plusieurs chromophores [12]. Les coefficients dans ce mélange correspondent aux quantités relatives de ces chromophores. En utilisant les techniques d'imagerie multispectrale ces différentes substances présentes dans le globule rouge peuvent être caractérisées et reconnues par leurs signatures spectrales [16]. Le globule rouge parasité est constitué d'hémoglobine et des éléments du parasite (parasite, hémozoïne). Par conséquent les spectres d'absorption sont le résultat du mélange des spectres de l'hémoglobine et du parasite (hémozoïne). Le décalage de la bande de Sorét vers 435 nm est dû à la présence de l'hémozoïne [8] qui a un coefficient d'absorption élevé. L'absorption augmentant avec l'épaisseur, plus la taille de l'hémozoïne est importante plus elle absorbe de la lumière.

L'intensité la plus élevée de la bande de Sorét (à 435 nm) est obtenue avec la plus faible des concentrations (C8) **Figure 4**. Cela suggère une interaction entre le médicament et la formation du biocristal (hémozoïne) [6, 17]. Cette possible formation de complexe entre le médicament et les hème libre issue de la dégradation l'hémoglobine dans la vacuole digestive du parasite entrave la biocristallisation de ces molécules d'hème empêchant ainsi l'hémozoïne existant de continuer de s'agréger [18 - 20]. Les autres pics observés pourraient être attribués à l'hème libre (525 nm) ou autres substances (médicaments). Tous les spectres d'absorption des cellules infectées par le *P. falciparum* présentent un pic à 400 nm et un autre à 435 nm, la plus forte (en intensité). Pour mieux apprécier l'effet des médicaments sur le parasite, il s'est avéré nécessaire d'analyser l'écart d'intensité entre les pics à 435 nm et à 400 nm pour chaque dose de médicament ; $I(\lambda 435) - I(\lambda 400)$. La variation de l'écart d'intensité de pics à 435 nm et à 400 nm pour 5 doses de chaque médicament est illustrée par la **Figure 5**. Ces histogrammes (**Figure 5**) révèle que l'écart d'intensité ($I(\lambda 435) - I(\lambda 400)$) des pics à 435 nm et à 400 nm diminue suivant les doses croissantes de médicaments à l'exception de la dose C5 **Figure 5**. Par ailleurs, une légère différence s'observe au niveau de la plus forte dose (C2) ; l'écart est plus faible pour l'artésunate à cette dose.

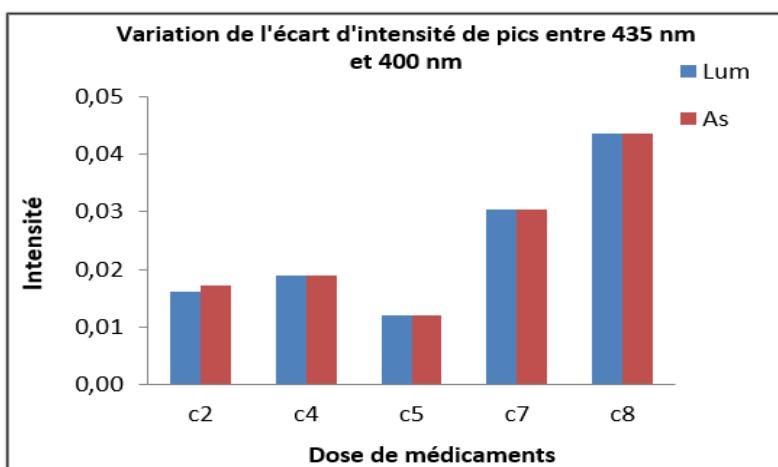


Figure 5 : Évolution de l'écart d'intensité de pics (à 435 nm et à 400 nm) en fonction de la concentration de l'artésunate (As) et de la luméfantrine (Lum)

D'après [8], la présence du parasite à l'intérieur du globule rouge induit le décalage de la bande de Sorét du globule rouge infecté vers 435 nm. Par ailleurs le développement intra-érythrocytaire du parasite est axée sur l'ingestion et la dégradation de l'hémoglobine suivie de la formation de l'hémozoïne à partir des molécules libres de l'hème toxique pour le parasite [19]. Le mécanisme d'action des antipaludéens schizontocides réside en leur association avec les molécules libres de l'hème en se logeant préférentiellement dans les globules rouge infectés [7, 13]. L'effet de ces antipaludéens sur le parasite pourraient se traduire par une inhibition de la biocrystallisation des molécules libres de l'hème en hémozoïne par la formation de complexe des médicaments avec ces molécules [20]. Autrement dit une dose croissante d'antipaludéen aurait pour conséquence une diminution du rapport de la quantité relative d'hémozoïne par celle de l'hème libre [4, 6] révélée par la diminution de l'écart d'intensité ($I(\lambda_{435}) - I(\lambda_{400})$).

4. Conclusion

Par cette étude, nous avions élucider l'effet antipaludique de deux médicaments (luméfantrine, artésunate) à partir d'images multispectrales obtenues par un système imageur développé par notre équipe. Une distinction entre globule rouge infecté et globule rouge sain dans une image multispectrale a été réalisée à partir d'une fonction de contraste couplée à l'analyse de leur spectre d'absorption. Les analyses faites autour des pics de spectres d'absorption des globules rouge infectés et traités par différentes doses des médicaments ont permis de dégager un paramètre mesurant l'écart d'intensité ($I(\lambda_{435}) - I(\lambda_{400})$) de pics à 435 nm et à 400 nm. Ce paramètre lié à la quantité relative d'hémozoïne dans la cellule infectée diminue suivant les doses croissantes de médicament. Ceci traduit l'effet des ces médicaments sur le développement intra-érythrocytaire du parasite. Cette technique peut donc servir de test de propriétés antipaludiques de nouvelles molécules issues de la pharmacopée africaine.

Références

- [1] - OMS, "Rapport sur le paludisme dans le monde 2018", (Novembre 2018), <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/fr/>
- [2] - OMS, "Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030", (Juin 2015), <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/fr/>
- [3] - R. D. SANDLIN, K. Y. FONG, K. J. WICHT, H. M. CARRELL, T. J. EGAN and D. W. WRIGHT, "Identification of β -hematin inhibitors in a high-throughput screening effort reveals scaffolds with in vitro antimalarial activity", *International Journal for Parasitology : Drug and Drug Resistance*, 4 (2014) 316 - 325
- [4] - K.Y. FONG, and D. W Wright, "Hemozoin and antimalarial drug discovery", *Future Med. Chem.*, 5 (12) (2013) 1437 - 1450
- [5] - M. NAVARRO, W. CASTRO and C. BIOT, "Bioorganometallic Compounds with Antimalarial Targets : Inhibiting Hemozoin Formation", *Organometallics*, 31 (2012) 5715 - 5727
- [6] - J. M. COMBRINCK, T. E. MABOTHA, K. K. NCOKAZI, M. A. AMBELE, D. TAYLOR, P. J. SMITH, H. C. HOPPE, and T. J. EGAN, "Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials", *ACS Chem. Biol.*, 8 (2013) 133 - 137
- [7] - O. K. BAGUI, W. YAVO, D. TANO et J. T. ZOUEU, "Etude de l'effet de l'amodiaquine sur les globules rouges infectés par le paludisme dans les images multispectrales", *Afrique SCIENCE*, 10 (4) (2014) 36 - 44, <http://afriquescience.info>

- [8] - J. T. ZOUEU and S. G. T. ZAN, "Trophozoite stage infected erythrocyte contents Analysis by use of spectral imaging LED microscope", *Journal of Microscopy*, 245 (2012) 90 - 99
- [9] - M. BRYDEGAARD, Z. GUAN and S. SVANBERG. "Broad-band multi-spectral microscope for imaging transmission spectroscopy employing an array of light-emitting diodes". *American Journal of Physics*, 77 (2009) 104
- [10] - M. SANGARE, O. K. BAGUI, I. TRAORE, A. H. BABANA, A. BA et J. T. ZOUEU, "Discrimination de différentes sous phénotypes du *Ralstonia Solanacearum* dans une feuille de tabac par imagerie multi-spectrale", *Afrique SCIENCE*, 11 (4) (2015) 95 - 103, <http://afriquescience.info>
- [11] - J. T. Zoueu, S. OUATTARA, A. TOURE, S. SAFIET and S. G. T. ZAN, Spectroscopic approach of multispectral imagine of *plasmodium falciparum* infected human erythrocytes, IEEE proceedings, ICTON Mediterranean Winter Conference, 23 (2009) 1 - 7
- [12] - K. O. BAGUI, "Développement d'outils d'analyse d'images de microscope multispectral et multi modal à diodes électroluminescentes application à l'étude et au diagnostic automatique du paludisme", Thèse unique, Université Nangui Abrogoua, Abidjan, (2015) 149 p.
- [13] - C. D. FITCH, "Antimalarial schizontocides: ferriprotoporphyrin IX interaction hypothesis", *Parasitol. Today*, 2 (1986) 330 - 331
- [14] - S. SVANBERG, Atomic and molecular spectroscopy, 2nd edition, Springer-Verlag, (1992) 66 p.
- [15] - B. K. WILSON and al., "Detection of malarial by product hemozoin utilizing its unique scattering properties", *Opt. Express*, 19 (13) (2011) 12190 - 12196
- [16] - S. DABO-NIANG and J. T. ZOUEU, "Combining kriging, multispectral and multimodal microscopy to resolve malaria-infected erythrocyte contents". *Journal of Microscopy*, 247 (2012) 240 - 251
- [17] - A. LEED, K. DUBAY, L. M. B. URROS, D. SEARS, A. C. DIOS and P. D. ROEPE, "Solution structures of antimalarial drug-heme complexes", *Biochemistry*, 41 (2002) 10245 - 10255
- [18] - G. T. WEBSTER, D. MCNAUGHTON and B. R. WOOD, "Aggregated Enhanced Raman Scattering in Fe(III)PPIX Solutions : The Effects of Concentration and Chloroquine on Excitonic Interactions", *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 6910 - 6916
- [19] - L. M. CORONADO, C. T. NADOVICH and C. SPADAFORA, "Malarial hemozoin : From target to tool", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840 (2014) 2032 - 2041
- [20] - C. R. CHONG and D. J. Jr. SULLIVAN, "Inhibition of heme crystal growth by antimalarials and other compounds : implications for drug discovery", *Biochem. Pharmacol.*, 66 (2003) 2201 - 2212