



HAL
open science

Indocyanine Green : fluorophore ou photosensibilisateur ?

Camille Giraudeau

► **To cite this version:**

Camille Giraudeau. Indocyanine Green : fluorophore ou photosensibilisateur ?. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01898450

HAL Id: hal-01898450

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01898450v1>

Submitted on 18 Oct 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

2014

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 20 Juin 2014,

sur un sujet dédié à :

**INDOCYANINE GREEN : FLUOROPHORE OU
PHOTOSENSIBILISATEUR ?**

***POSSIBILITES REGLEMENTAIRES POUR UNE MISE A DISPOSITION EN USAGE
THERAPEUTIQUE***

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Camille GIRAUDEAU

née le 30 Avril 1987, à Nancy (54)

Membres du Jury

Président	Francine KEDZIEREWICZ, Vice Doyen de la Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, Nancy
Directeur	Céline FROCHOT, Directeur de Recherche au CNRS, Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274 CNRS, Université de Lorraine, Nancy
Juges	Véronique FALK, Maître de Conférence, UMR 7274 CNRS, Université de Lorraine, Nancy Géraldine MENIN, Directeur du Service Affaires Pharmaceutiques et Scientifiques France, Sanofi Pasteur MSD, Lyon

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2013-2014**

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement

Jean-Michel SIMON

Pharmaceutique Hospitalier :

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Raphaël DUVAL

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS	<i>Section CNU*</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
PROFESSEURS DES UNIVERSITES		
Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI ☿	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND ☿	87	<i>Environnement et Santé</i>
Pierre LABRUDE (retraite 01-11-13)	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>
MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>
MAITRES DE CONFÉRENCES		
Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>

ENSEIGNANTS (suite)	<i>Section CNU*</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Caroline GAUCHER	85/86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie</i>
Francine KEDZIEREWICZ	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Faten MERHI-SOUSSI	87	<i>Hématologie</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Christine PERDICAKIS	86	<i>Chimie organique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Gabriel TROCKLE	86	<i>Pharmacologie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIYOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>
Colette ZINUTTI	85	<i>Pharmacie galénique</i>
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
PROFESSEUR AGREGÉ		
Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>

☒ *En attente de nomination*

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : *Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

81 : *Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

82 : *Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

85 : *Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

86 : *Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

87 : *Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

32 : *Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle*

11 : *Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes*

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

De honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

De exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N' ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI DISAPPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble de mon jury :

- Madame Francine KEDZIEREWICZ de m'avoir fait l'honneur d'être la présidente de mon jury de thèse et de m'accompagner dans cette dernière étape qui clôt mes études,
- Madame Céline FROCHOT, ma directrice de thèse, qui m'a accompagnée tout au long de la rédaction de cette thèse, pour sa disponibilité, sa passion pour la recherche, ses connaissances et ses précieux conseils,
- Madame Véronique FALK pour son suivi durant mes deux années à l'ENSIC et pour m'avoir permis de réaliser mon projet professionnel,
- Madame Géraldine MENIN qui, par son implication dans son travail, m'a donné l'envie de m'orienter professionnellement dans le domaine des affaires réglementaires, ainsi que pour sa patience, sa disponibilité, et son soutien sans faille de tous les jours.

Enfin, je remercie, de tout mon cœur, mes parents et mes deux sœurs de toujours me soutenir dans mes choix professionnels et personnels.

«Le bonheur c'est de chercher»

Jules Renard

Sommaire

ABREVIATIONS ET ACRONYMES	- 4 -
LISTE DES FIGURES.....	- 6 -
LISTE DES TABLEAUX	- 7 -
INTRODUCTION.....	- 8 -
INDOCYANINE GREEN (ICG) : GENERALITES	- 9 -
1. Historique.....	- 9 -
2. Aspects Fondamentaux	- 9 -
2.1. Chimie	- 9 -
2.2. Caractéristiques spectrales de l'Indocyanine Green.....	- 10 -
2.3. Utilisation de l'Indocyanine Green en thérapie.....	- 14 -
2.3.1. La thérapie photodynamique (PDT)	- 14 -
2.3.2. L'hyperthermie (HT).....	- 14 -
2.3.3. La photothermie (PHT).....	- 15 -
2.4. Propriétés pharmacocinétiques et comportement <i>in vivo</i> de l' Indocyanine Green.....	- 15 -
2.5. Toxicité.....	- 17 -
3. Fluorophores disponibles en France pour un usage diagnostique	- 17 -
3.1. La Fluorescéine monosodique	- 18 -
3.2. L'Hexvix®	- 19 -
3.3. L'Infracyanine® : vert d'indocyanine monopic.....	- 21 -
4. Perspectives d'utilisations de l'ICG en tant que photosensibilisateur pour la thérapie photodynamique.....	- 22 -
4.1. Définition d'un photosensibilisateur (PS).....	- 22 -
4.2. La thérapie photodynamique	- 22 -
4.2.1. Définitions	- 22 -
4.2.2. Applications.....	- 23 -
4.2.2.1. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).....	- 23 -
4.2.2.2. Les infections bactériennes.....	- 24 -

4.2.2.3.	L'acné.....	- 24 -
4.2.2.4.	Le cancer	- 24 -
4.2.2.5.	Les varices.....	- 24 -
4.2.3.	La thérapie photodynamique couplée avec d'autres thérapies	- 25 -
4.3.	Limites de l'Indocyanine Green en tant que photosensibilisateur et solutions proposées.....	- 25 -
4.3.1.	Limites de l'Indocyanine Green	- 25 -
4.3.2.	Encapsulation de l'Indocyanine Green.....	- 25 -
4.3.3.	Ciblage de l'Indocyanine Green	- 26 -

FLUOROPHORE OU PHOTOSENSIBILISATEUR ? ENCORE UN DEBAT - 27 -

1.	Introduction	- 27 -
2.	Indocyanine Green : Photosensitizer or Chromophore ? Still a Debate.....	- 27 -
3.	Conclusion.....	- 55 -

**POSSIBILITES REGLEMENTAIRES POUR UNE MISE A DISPOSITION EN
USAGE THERAPEUTIQUE DE L' INDOCYANINE GREEN - 58 -**

1.	Introduction	- 58 -
2.	Photosensibilisateurs déjà disponibles sur le marché français.....	- 60 -
2.1.	Photosensibilisateur de 1 ^{ère} génération	- 60 -
2.2.	Photosensibilisateurs de 2 ^{ème} génération.....	- 61 -
2.3.	Photosensibilisateurs de 3 ^{ème} génération.....	- 61 -
3.	Essais cliniques en cours utilisant l'Indocyanine Green comme un agent thérapeutique.....	- 65 -
4.	Possibilités réglementaires.....	- 67 -
4.1.	Extension d'indication	- 67 -
4.1.1.	Définition d'une variation	- 67 -
4.1.2.	Définition d'une extension d'indication.....	- 68 -
4.1.3.	Constitution d'un dossier de demande d'extension d'indication	- 69 -
4.1.3.1.	Documents nécessaires pour la soumission d'une variation de type II	- 69 -
4.1.3.2.	Spécificité requise dans le cadre d'une demande d'extension d'indication : le rapport justifiant la nouvelle indication.....	- 69 -
4.1.4.	Evaluation du dossier de demande d'extension d'indication dans le cadre d'une procédure nationale	- 70 -
4.1.5.	Résultat de l'évaluation du dossier de demande d'extension d'indication dans le cadre d'une procédure nationale	- 71 -
4.1.6.	Conclusion	- 71 -

4.2.	La Recommandation Temporaire d'Utilisation (RTU)	- 71 -
4.2.1.	Le Contexte d'élaboration de la recommandation temporaire d'utilisation : La Loi Bertrand, pour le renforcement de la sécurité sanitaire du médicament et des produits de santé	- 71 -
4.2.2.	Définition de la recommandation temporaire d'utilisation	- 72 -
4.2.3.	Critères d'élaboration des recommandations temporaires d'utilisation	- 74 -
4.2.4.	Spécialités concernées	- 74 -
4.2.5.	Circuit d'élaboration d'une recommandation temporaire d'utilisation.....	- 74 -
4.2.5.1.	Identification du besoin	- 74 -
4.2.5.2.	Instruction d'une recommandation temporaire d'utilisation.....	- 75 -
4.2.6.	Contenu d'une recommandation temporaire d'utilisation	- 76 -
4.2.7.	Les annexes d'une recommandation temporaire d'utilisation.....	- 77 -
4.2.7.1.	Le protocole de suivi des patients.....	- 77 -
4.2.7.2.	La convention.....	- 77 -
4.2.8.	Notification, mise en place et suivi d'une recommandation temporaire d'utilisation	- 78 -
4.2.8.1.	Finalisation et notification.....	- 78 -
4.2.8.2.	Diffusion.....	- 78 -
4.2.8.3.	Surveillance	- 79 -
4.2.9.	Durée	- 79 -
4.2.10.	Modifications, suspension, ou abrogation.....	- 79 -
4.2.11.	Rôle des intervenants	- 80 -
5.	Conclusion.....	- 81 -
	CONCLUSION.....	- 82 -
	REFERENCES.....	- 83 -

Abréviations et acronymes

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

CE : Commission Européenne

CEPS : Comité Economique des Produits de Santé

CHMP : *Committee for Medicinal Products for Human Use*

CMS : *Concerned Member State*

CP : *Centralised Procedure*

CRPV : Centre Régionale de Pharmacovigilance

CTD : *Common Technical Document*

DCP : *Decentralised Procedure*

DG : Directeur Général

DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EMA : *European Medicines Agency*

FDA : *Food and Drug Administration*

HAS : Haute Autorité de la Santé

HT : Hyperthermie

IC : Conversion Interne

ICG : Indocyanine Green

INCA : Institut National du Cancer

ISC : Conversion Inter-Système

MRP : *Mutual Recognition Procedure*

NM : Nanomètres

NP : Procédure Nationale

PDT : Thérapie Photodynamique

PHT : Thérapie Photothermique

PPIX : Protoporphyrine IX

PS : Photosensibilisateur

PSUR : *Periodic Safety Update Report*

PUT : Protocole d'Utilisation Thérapeutique

RCP : Résumé Caractéristiques Produit

RMS : *Reference Member State*

RTU : Recommandation Temporaire d'Utilisation

ROS : *Reactive Oxygen Species*

UNCAM : Union Nationale des Caisses d'Assurance Maladie

5-ALA : Acide 5 aminolévulinique

Liste des figures

Figure 1 : Formule chimique de l'Indocyanine Green (ICG)	- 10 -
Figure 2 : Variation du spectre d'absorption de l'Indocyanine Green en fonction de sa concentration dans l'eau d'après les données de Landsman.....	- 11 -
Figure 3 : Variations du spectre d'absorption de l'Indocyanine Green en fonction de la concentration plasmatique d'après les données de Landsman.....	- 11 -
Figure 4 : Spectre d'émission de fluorescence de l'Indocyanine Green dans l'Ethanol (données personnelles) -	- 12 -
Figure 5 : Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski additionné des réactions avec l'oxygène et espèces oxygénées d'après les données de Lassalle.....	- 13 -
Figure 6 : Diagramme de Perrin-Jablonski d'après les données de Lassalle.....	- 15 -
Figure 7 : Modélisation de l'élimination de l'Indocyanine Green selon une mono-exponentielle décroissante.-	- 16 -
Figure 8 : Modélisation de l'élimination de l'Indocyanine Green selon une bi-exponentielle décroissante comparée à une modélisation mono-exponentielle. Echelle logarithmique en ordonnée.....	- 17 -
Figure 9 : Formule chimique de la Fluorescéine	- 18 -
Figure 10 : Spectre d'absorption et spectre d'émission de fluorescence de la Fluorescéine d'après Biologie et Multimédia.....	- 19 -
Figure 11 : Formule chimique de l'Hexvix [®]	- 19 -
Figure 12 : Structure chimique du 5-ALA.....	- 19 -
Figure 13 : Structure chimique de la PPIX Figure 14 : Structure chimique de l'hème.....	- 20 -
Figure 15 : Biosynthèse de l'hème d'après Xie	- 20 -
Figure 16 : Schéma illustré et simplifié de la thérapie photodynamique d'après les données de Lassalle.....	- 23 -

Liste des tableaux

<i>Tableau I : Définition des différents types de thérapie utilisant l'Indocyanine Green comme principe actif</i>	<i>- 14 -</i>
<i>Tableau II : Publications traitant de l'Indocyanine Green en termes de photosensibilisateur</i>	<i>- 56 -</i>
<i>Tableau III : Principaux photosensibilisateurs ayant une autorisation de mise sur le marché en France</i>	<i>- 63 -</i>
<i>Tableau IV : Essais cliniques en cours dans le monde utilisant l'Indocyanine Green en tant qu'agent thérapeutique.....</i>	<i>- 66 -</i>
<i>Tableau V : Synthèse des rôles des intervenants dans une recommandation temporaire d'utilisation.....</i>	<i>- 80 -</i>

Introduction

Cette thèse est le fruit d'un travail interdisciplinaire dont l'objet d'étude est une molécule chimique appelée Indocyanine Green (ICG). L'ICG a été découverte durant la seconde guerre mondiale et a été utilisée pour la première fois aux Etats-Unis en 1956. Cette molécule est très connue pour ses propriétés de fluorescence qui lui permettent d'être autorisée en tant que médicament en imagerie médicale pour, par exemple, le diagnostic de la fonction hépatique et cardiaque. Cependant, certaines autres propriétés photophysiques sont encore mal connues et des chercheurs tentent de démontrer que l'ICG pourrait également être utilisée en tant que photosensibilisateur (PS) pour des applications en thérapie photodynamique (PDT).

Cette thèse se divise en 3 parties :

- la première partie est consacrée à la description de l'ICG. Elle décrit ses caractéristiques spectrales, ses propriétés pharmacocinétiques et ses utilisations actuelles autorisées en France ;
- la deuxième partie est une revue scientifique que j'ai réalisé pendant cette thèse. Elle consiste en un bilan des recherches effectuées sur l'ICG en tant que photosensibilisateur dans le traitement d'un certain nombre de pathologies, en une analyse des résultats obtenus par les chercheurs et elle dresse d'autres perspectives d'utilisation de cette molécule encore peu connue (Giraudeau *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, 2014) ;
- la dernière partie étudie les possibilités réglementaires pour mettre à disposition, en usage thérapeutique, l'ICG en France. Deux voies réglementaires vont donc être envisagées. La première est la voie classique qui permet à l'autorisation de mise sur le marché (AMM) d'évoluer tout au long de la commercialisation d'un médicament c'est-à-dire une demande de variation pour étendre l'indication du médicament. La seconde est la possibilité d'une recommandation temporaire d'utilisation (RTU). Cette voie est une particularité de la réglementation française qui a été introduite par la Loi du 29 Décembre 2011 concernant le renforcement de la sécurité sanitaire du médicament et des produits de santé.

Enfin, la conclusion de cette thèse vient tirer le bilan de ces réflexions et propose des solutions pour une mise à disposition future en usage thérapeutique de l'ICG. En effet, l'ICG reste une molécule dont toutes les propriétés ne semblent pas totalement comprises, mais avec l'avancée des recherches, elle pourrait bientôt être utilisée pour d'autres applications en médecine comme, par exemple, dans le développement de thérapies ciblées.

Indocyanine Green (ICG) : Généralités

1. Historique

L'ICG a été développée durant la seconde Guerre Mondiale pour une utilisation en tant que colorant dans la photographie. En 1956, elle est approuvée en tant que médicament par la Food et Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis (MOHAMMAD, et al., 2009). En 1957, elle est utilisée pour la première fois en médecine à la clinique Mayo à Rochester aux Etats-Unis. Cette molécule est, dans un premier temps, utilisée pour mesurer le débit cardiaque, le débit hépatique et le volume sanguin circulant. En 1973, son utilisation en médecine est élargie à l'ophtalmologie grâce à l'angiographie à l'ICG (FLOWER, et al., 1973). La mauvaise résolution de scanners infrarouges de l'époque freine l'utilisation à large échelle de cette nouvelle technique. A partir des années 1980, le développement de nouvelles caméras fait quasiment disparaître les difficultés techniques rencontrées au paravant. En parallèle, l'utilisation de l'ICG en médecine, et particulièrement dans la technique de l'angiographie, se démocratise (BISCHOFF, et al., 1985).

Environ 3 000 publications sur l'ICG ont été publiées dans le monde, preuve de l'intérêt que cette molécule suscite auprès de nombreux chercheurs dans le domaine de la médecine. Aujourd'hui, les recherches tentent d'une part d'améliorer son utilisation en tant que fluorophore et cherchent d'autre part à savoir si l'ICG pourrait être utilisée dans d'autres domaines grâce à un potentiel rôle en tant que PS.

2. Aspects Fondamentaux

2.1. Chimie

L'ICG ou vert d'indocyanine est une molécule de 775 daltons. Sa formule brute est $\text{1H-Benz[e]indolium,2-[7[1,3-dihydro-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)-2H-benz[e]indol-2-ylidene]-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)hydroxide}$.

Sa structure moléculaire (voir figure 1) lui confère des propriétés amphiphiles c'est-à-dire à la fois hydrophile et hydrophobe. En effet, elle est constituée de l'assemblage de deux parties polycycliques (benzoindotricarbocyanines) hydrophobes reliées entre elles par une chaîne polycarbonée. Deux groupements sulfates sur chaque partie polycyclique au niveau du noyau indol confèrent à la molécule sa solubilité dans l'eau (DESMETTRE, et al., 1999).

Son caractère amphiphile explique sa solubilité dans les solvants organiques tels que l'éthanol ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) ainsi que dans les milieux aqueux. L'ICG présente une forte affinité pour les protéines plasmatiques, en particulier les lipoprotéines (SADOQI, et al., 2006).

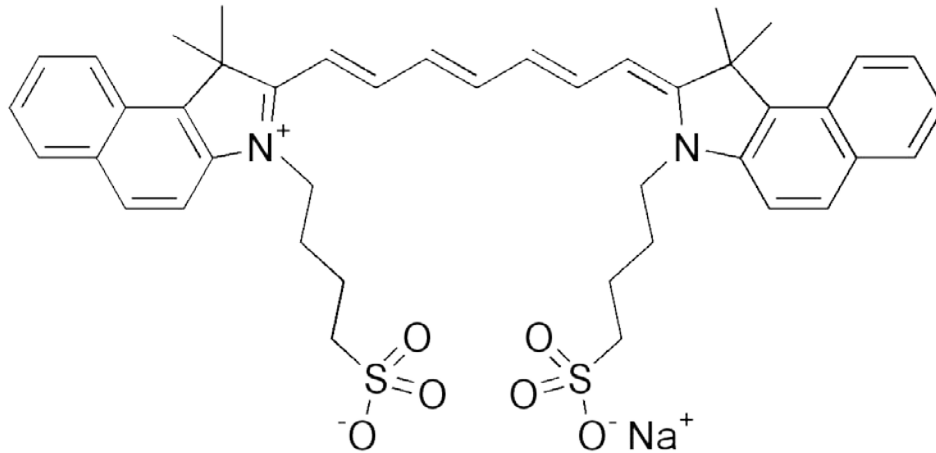


Figure 1 : Formule chimique de l'Indocyanine Green (ICG)

2.2. Caractéristiques spectrales de l'Indocyanine Green

Le spectre d'absorption de l'ICG dépend de la nature du solvant et de la concentration du colorant, le pic maximal d'absorption étant observé entre 600 et 900 nanomètres (HALLER, et al., 1993).

En solution aqueuse, cette molécule a tendance à former des agrégats et ceci d'autant plus que sa concentration est élevée (DESMETTRE, et al., 1999) (Figure 2).

Lors de son utilisation pour des applications médicales, après injection intraveineuse, l'ICG se fixe aux protéines plasmatiques et son pic d'absorption passe de 780 à 805 nm (décalage vers le domaine des infrarouges) (LANDSMAN, et al., 1976) (HOLLINS, et al., 1987).

La liaison aux protéines gêne la formation des agrégats : l'influence de la concentration d'ICG est donc moindre qu'en solution aqueuse.

L'interaction de ces deux phénomènes – formation des agrégats et fixation aux protéines plasmatiques – explique la stabilité de l'ICG en solution plasmatique.

En solution aqueuse, le pic d'absorption de l'ICG se situe à 785 nm. En revanche, en solution plasmatique, il se déplace immédiatement à 805 nm à cause de sa liaison à l'albumine (LANDSMAN, et al., 1976), (HOLLINS, et al., 1987).

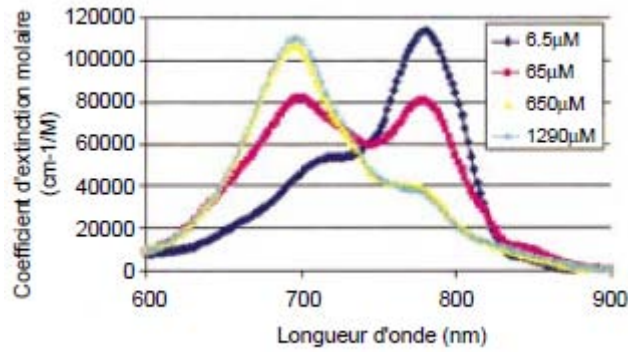


Figure 2 : Variation du spectre d'absorption de l'Indocyanine Green en fonction de sa concentration dans l'eau d'après les données de Landsman.

Les concentrations sont en micromoles (μmol). L'aspect "en miroir" autour de 790 nm traduit la formation des agrégats d'ICG dont la proportion augmente avec la concentration (LANDSMAN, et al., 1976) (DESMETTRE, et al., 1999).

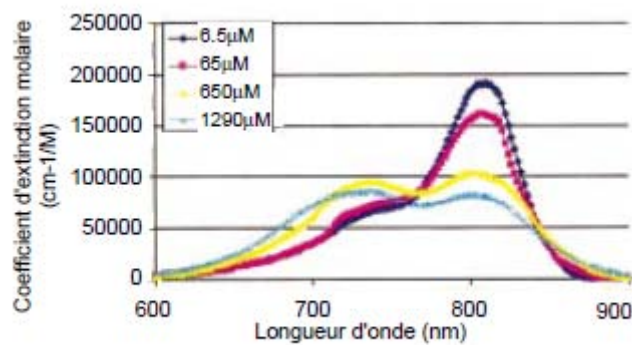


Figure 3 : Variations du spectre d'absorption de l'Indocyanine Green en fonction de la concentration plasmatique d'après les données de Landsman.

Les concentrations sont en micromoles (μmol) (LANDSMAN, et al., 1976).

Après absorption de la lumière, la molécule d'ICG passe dans un état excité singulet. Pour revenir à son état stable, elle peut suivre 3 voies différentes comme le montre le diagramme simplifié de Perrin-Jablonski :

- Première voie : L'énergie absorbée est convertie en une émission de fluorescence entre 750 nm et 950 nm. Le spectre de fluorescence est large et les valeurs maximales sont 810 nm dans de l'eau et 830 nm dans le sang. Le chevauchement des spectres d'absorption et de fluorescence peut conduire à une résorption de la fluorescence par l'ICG elle-même. Cette propriété de fluorescence peut être utilisée pour la détection *in vitro* et *in vivo* de l'ICG (Figure 4).

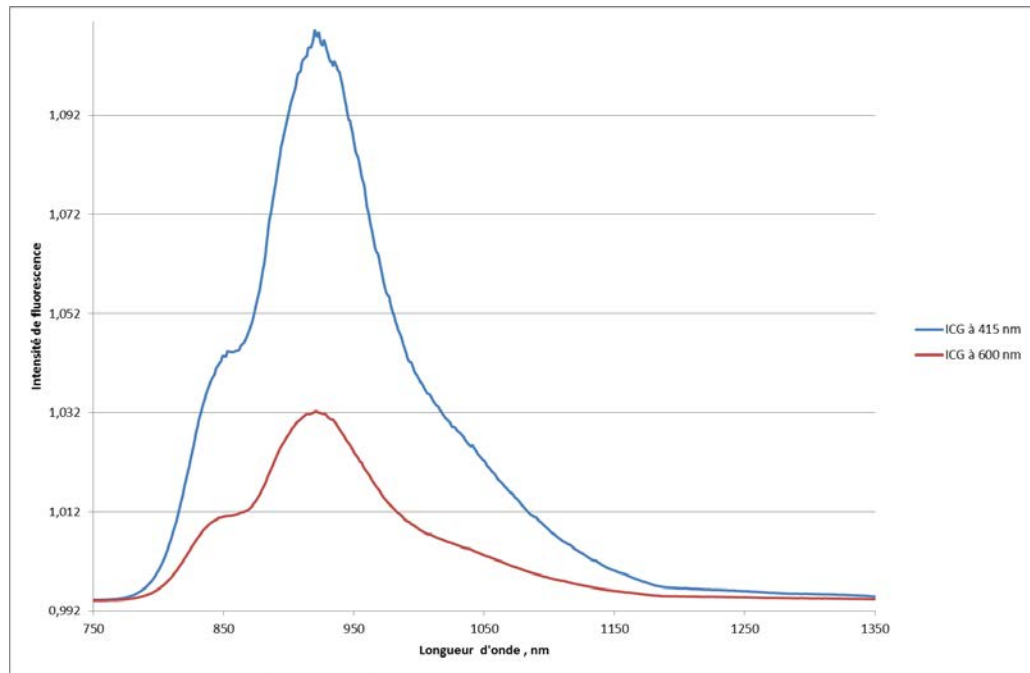


Figure 4 : Spectre d'émission de fluorescence de l'Indocyanine Green dans l'Ethanol (données personnelles)

- Deuxième voie : Une partie de l'énergie absorbée est transférée à un état triplet excité de l'ICG par un croisement inter-système (ISC). Reindl *et al* (REINDL, et al., 1997) ont montré que le rendement de formation de cet état triplet excité de l'ICG était respectivement de 14 %, 16% , 17% et 11 % dans l'eau, le méthanol, le DMSO et l'albumine. Ils suggèrent que les rendements de formation de cet état triplet entre 10 et 20% sont suffisamment élevés pour générer la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et, en particulier, de l'oxygène singulet, mais sans pour autant l'avoir prouvé.
- Troisième voie : L'énergie absorbée peut être transformée en chaleur par une conversion interne (IC). C'est un processus majeur après l'absorption de photon. Environ 85 % de l'énergie absorbée sous forme de lumière est convertie en chaleur.

Ces différentes voies de désexcitation sont résumées dans la figure 5.

IC : conversion interne

ISC : croisement inter-système

E : énergie

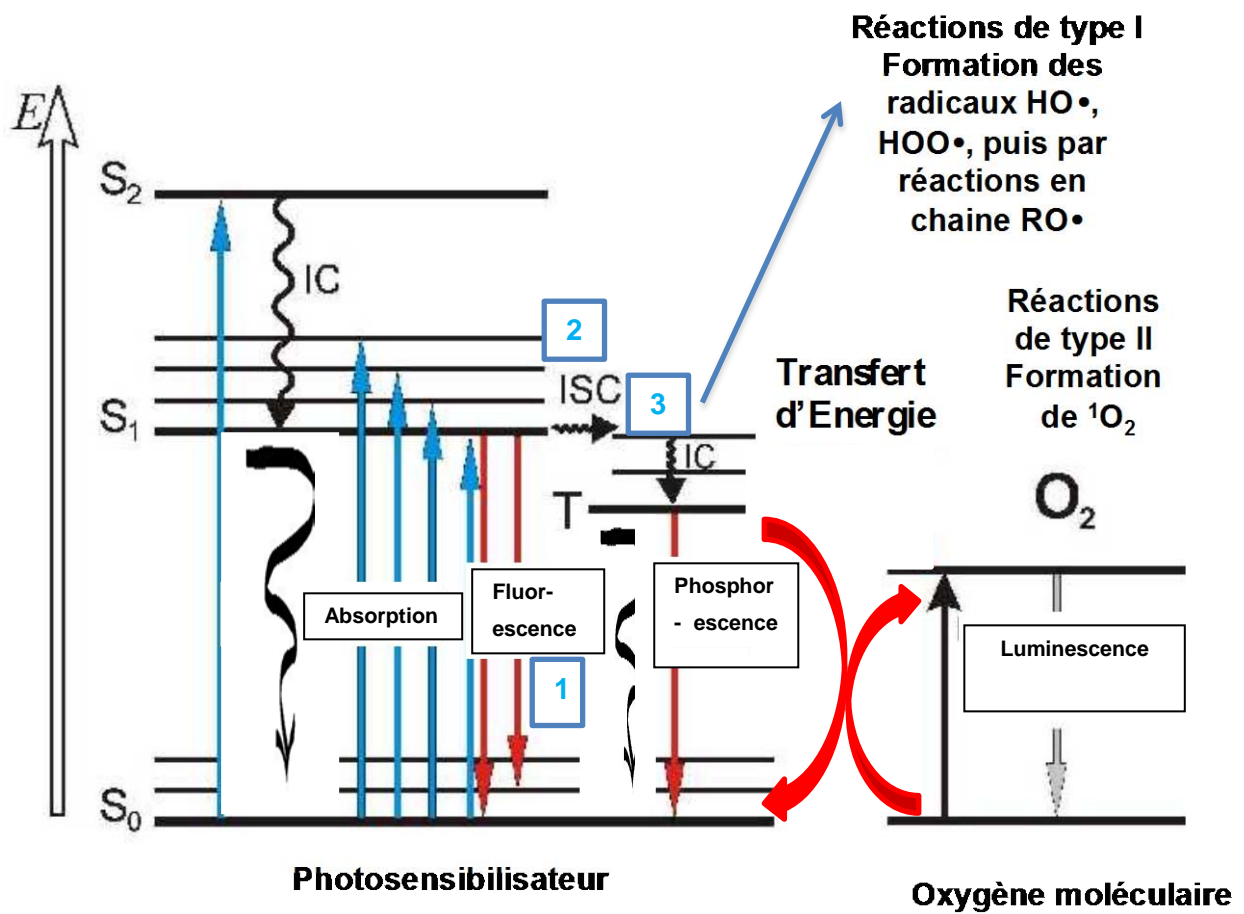


Figure 5 : Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski additionné des réactions avec l'oxygène et espèces oxygénées d'après les données de Lassalle (LASSALLE)

2.3. Utilisation de l'Indocyanine Green en thérapie

Différentes thérapies utilisant l'ICG ont pu être définies et sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau I: Définition des différents types de thérapie utilisant l'Indocyanine Green comme principe actif

THÉRAPIE	DÉFINITION
HYPERTHERMIE (HT)	Thérapie basée sur l'augmentation de la température entre 40 et 43°C pour détruire spécifiquement une tumeur
PHOTOCOAGULATION RENFORCEE PAR L'ICG	L'ICG vient renforcer l'absorption de la lumière infrarouge par les tissus (par ex : vaisseaux, ...) (la température est supérieure à 53°C pendant au moins plus de 1 minute)
THERAPIE PHOTODYNAMIQUE (PDT)	Thérapie utilisant l'oxygène, la lumière, et un photosensibilisateur pour induire la production d'espèces réactives de l'oxygène
THERAPIE PHOTODYNAMIQUE ET HYPERTHERMIQUE (PHT)	Combinaison de la PDT et de l'HT

2.3.1. La thérapie photodynamique (PDT)

C'est une thérapie utilisant l'oxygène, la lumière, et un photosensibilisateur pour induire la production d'espèces réactives de l'oxygène ou d'oxygène singulet : cette thérapie sera détaillée dans la suite de ce document.

2.3.2. L'hyperthermie (HT)

Elle est basée sur le principe de conversion de l'énergie lumineuse en chaleur comme décrit dans la figure 6.

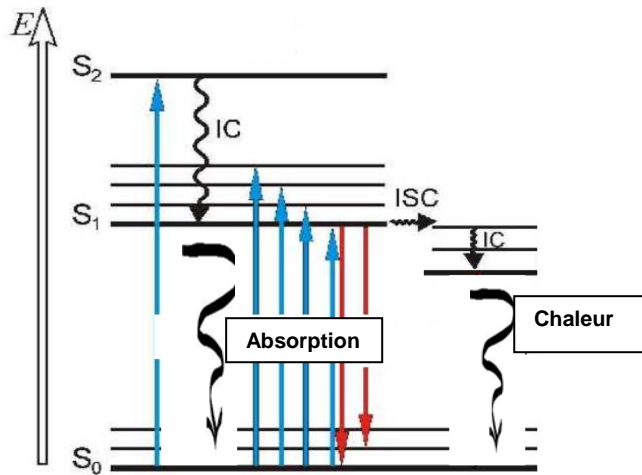


Figure 6 : Diagramme de Perrin-Jablonski d'après les données de Lassalle (LASSALLE)

Cette thérapie peut être utilisée et considérée comme efficace car les cellules tumorales sont plus sensibles aux élévations de températures que les cellules saines (ANGHILERI, et al., 1986).

Une température est considérée comme létale pour les cellules dès lors qu'elle est supérieure à 42 °C (KUO, et al., 2011).

L'hyperthermie se définit par une génération de chaleur au niveau du tissu cible suite à l'absorption de la lumière appliquée sur lui et conduisant à des lésions cellulaires et donc à la mort cellulaire.

Son efficacité dépend de :

- la température atteinte : au minimum 44°C,
- la durée du traitement : au minimum 30 minutes,
- des caractéristiques de la cellule ou du tissu.

2.3.3. La photothermie (PHT)

La PHT correspond à une combinaison de la PDT et de la HT. La température atteinte est, au minimum, de 45 °C. A cette température, la mort cellulaire est systématique.

2.4. Propriétés pharmacocinétiques et comportement *in vivo* de l'Indocyanine Green

Comme nous l'avons déjà évoqué, la structure moléculaire complexe de l'ICG lui confère des propriétés amphiphiles qui lui permettent de se lier à de nombreuses protéines plasmatiques comme l'albumine, les globulines et les lipoprotéines.

Après injection intraveineuse, l'ICG, grâce à son mode d'élimination hépatobiliaire, est rapidement excrétée. Sa vitesse d'élimination suit une vitesse dite de pseudo-ordre 1. Sa dégradation est plus rapide en présence de lumière (en fonction du type et de l'intensité) et de températures élevées. Les solutions aqueuses d'ICG sont plus stables dans l'obscurité, à basse température et à concentration élevée d'ICG (SAXENA, et al., 2003).

Les premières publications sur l'ICG estimaient la demi-vie de cette molécule entre 2 et 4 minutes. (voir figure 7) (Cherrick $t_{1/2} = 4,8$ min (chez l'humain) (CHERRICK, et al., 1960) ; Ott $t_{1/2} = 5,2$ min (chez le porc) (OTT, et al., 1994) ; Flock $t_{1/2} = 2,4$ min (chez le rat) (FLOCK, et al., 1993)). Des études plus récentes en spectrophotométrie sur la cinétique d'élimination confirment ces données, et montrent une décroissance exponentielle en deux phases : une première phase rapide estimant une demi-vie entre 3 et 4 minutes et une deuxième phase calculant une demi-vie d'environ une heure (HOLLINS, et al., 1987) (OTT, et al., 1994).

La Figure 8 montre que le modèle mono-exponentiel est une bonne approximation des temps de demi-vie précoces. En revanche, pour les études de temps de demi-vie tardif (au-delà de 30 à 50 minutes), la modélisation bi-exponentielle semble plus adaptée (avec une décroissance en 2 phases : phase rapide ($t_{1/2} = 2$ à 4 minutes) et phase lente ($t_{1/2} =$ environ 1 heure)).

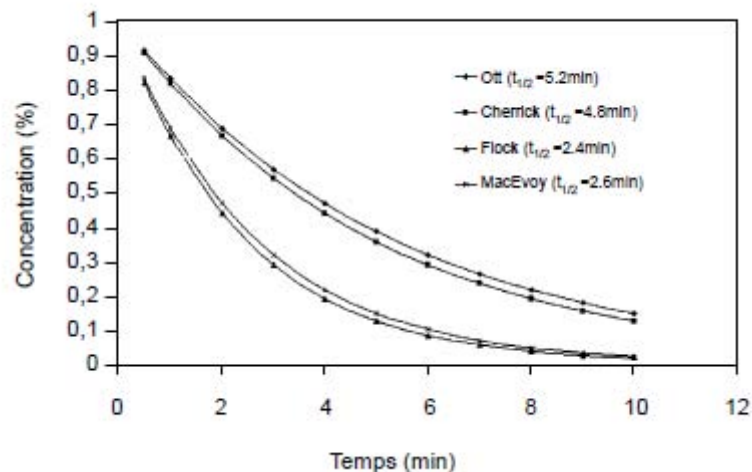


Figure 7 : Modélisation de l'élimination de l'Indocyanine Green selon une mono-exponentielle décroissante. (CHERRICK, et al., 1960) (OTT, et al., 1994) (FLOCK, et al., 1993) (MCEVOY, 1990)

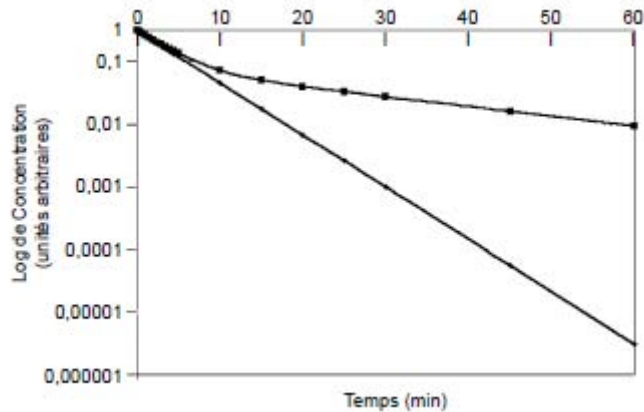


Figure 8 : Modélisation de l'élimination de l'Indocyanine Green selon une bi-exponentielle décroissante comparée à une modélisation mono-exponentielle. Echelle logarithmique en ordonnée. (OTT, et al., 1994)

2.5. Toxicité

L'ICG est métabolisée par le foie, et éliminée par le foie et la bile. Comme la molécule n'est pas absorbée par la membrane intestinale sa toxicité est très faible. Sa toxicité à une dose létale moyenne de 50 à 80 mg/kg (TAICHMAN, et al., 1987).

La sécurité des utilisations intraveineuses a été très bien étudiée, et la probabilité d'avoir un effet indésirable, à la suite d'une injection intraveineuse, est de l'ordre de 0,05% (HOPEROSS, et al., 1994).

Les principaux effets indésirables répertoriés sont transitoires (LABORATOIRES SERB, 1 Mars 2013) :

- nausées, vomissements,
- malaises bouffés de chaleur, hypersudation, réactions cutanées (rash cutané, urticaire ou prurit isolé),
- œdème de Quincke, choc de type anaphylactique.

3. Fluorophores disponibles en France pour un usage diagnostique

Comme nous l'avons déjà évoqué, la fluorescence est un phénomène radiatif consécutif à une excitation lumineuse (photons de lumière visible ou ultraviolette). Une molécule fluorescente (fluorophore ou fluorochrome) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission).

Une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve dans un état électroniquement excité, un état singulet. Le retour à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières dont la fluorescence.

La fluorescence se caractérise par une longueur d'onde d'émission, un rendement quantique de fluorescence, un coefficient d'extinction, une intensité de fluorescence et un temps de vie de fluorescence.

Il existe un grand choix de fluorochromes.

3.1. La Fluorescéine monosodique

La fluorescéine ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ou 3H-xanthène-3-one) (figure 9) est composée de deux molécules de phénols liées à un cycle pyrane lui-même relié à un acide benzoïque. Son poids moléculaire est 337 Daltons. Elle est peu lipophile, et elle a un passage transmembranaire par diffusion qui dépend du pH (DESMETTRE, et al., 1999).

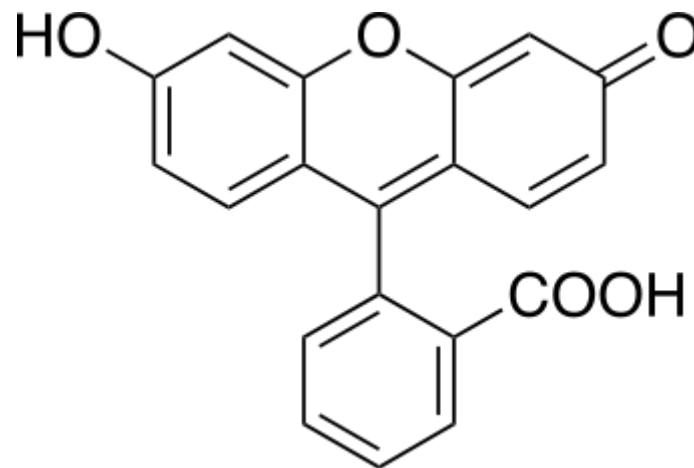


Figure 9: Formule chimique de la Fluorescéine

En solution aqueuse, son pic d'absorption se situe vers 490 nm (vs 780 nm pour l'ICG) et son pic d'émission vers 515 nm (vs 805 nm pour l'ICG) (Figure 10). Dans le plasma, son pic d'absorption est de 492 nm (vs 800 nm pour l'ICG) et celui d'émission est aux alentours de 515 nm (vs 825 nm pour l'ICG). Son rendement quantique de fluorescence dans l'eau est de 95%, et il est environ 25 fois supérieur à celui de l'ICG (FOX, et al., 1960).

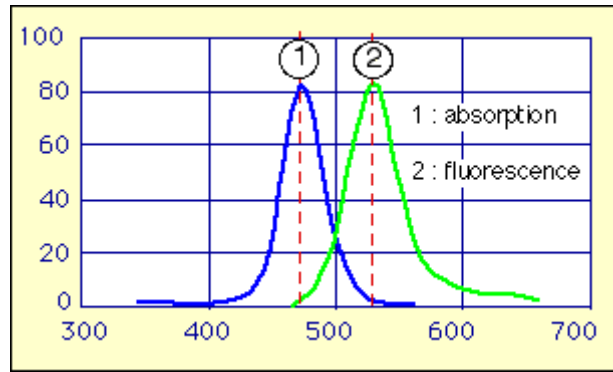


Figure 10 : Spectre d'absorption et spectre d'émission de fluorescence de la Fluorescéine d'après Biologie et Multimédia (Biologie et Multimedia)

Cette molécule est disponible en tant que médicament en France, et elle est commercialisée par les laboratoires Théa, selon une procédure d'enregistrement nationale. Elle n'est pas soumise à prescription médicale et est indiquée pour l'angiographie fluorescéinique du fond de l'œil.

3.2. L'Hexivix[®]

L'Hexivix[®] (Figure 11) est une molécule commerciale qui a pour substance active l'hexylaminolevulinate qui est l'ester de l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) (Figure 12).

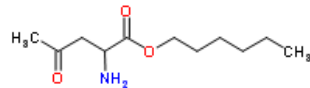


Figure 11 : Formule chimique de l'Hexivix[®]

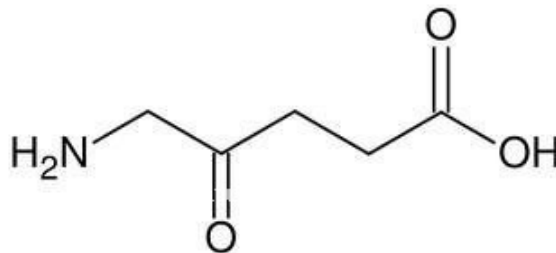


Figure 12 : Structure chimique du 5-ALA

La 5-ALA est un précurseur biochimique naturel de l'hème (molécule constitutive de l'hémoglobine) (voir figure 13) qui est métabolisé en porphyrines fluorescentes, en particulier en protoporphyrine IX (PPIX) (voir figure 14), par une série de réactions enzymatiques (Figure 15) (VIDAL).

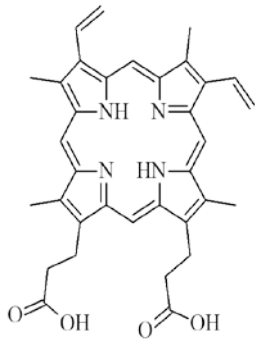


Figure 13 : Structure chimique de la PPIX

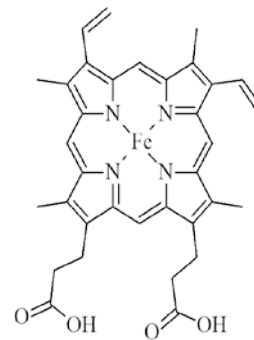


Figure 14 : Structure chimique de l'hème

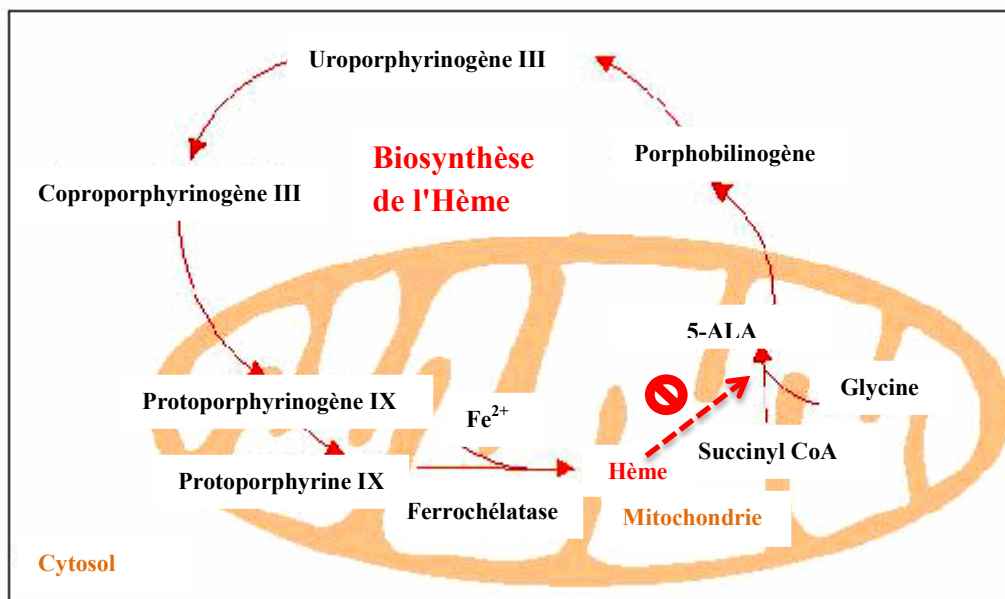


Figure 15 : Biosynthèse de l'hème d'après Xie (XIE, 2003)

Cette PPIX, sous l'action de la ferrochélatase, va former un complexe métallique avec l'ion Fe^{2+} pour produire l'hème qui, grâce à son noyau ferreux, perd ses propriétés de photosensibilisateur. L'hème va par la suite effectuer un rétrocontrôle négatif sur la production de 5-ALA pour éviter une surproduction de porphyrine dans l'organisme. Le 5-ALA de nature exogène contourne le rétrocontrôle de l'hème et induit donc une augmentation des précurseurs de l'hème dans l'organisme dont la PPIX qui sans sa liaison au fer garde ses propriétés de PS.

L'Hexvix[®] (dont une des longueurs d'onde d'absorption se situe entre 375 et 400 nm) est commercialisé par les laboratoires Ipsen Pharma et a été enregistré selon une procédure européenne de reconnaissance mutuelle. Ce médicament est indiqué en France à usage diagnostique uniquement et soumis à prescription médicale uniquement. La cystoscopie de fluorescence en lumière bleue avec Hexvix[®] est indiquée en complément de la cystoscopie conventionnelle en lumière blanche pour contribuer au diagnostic et au traitement du cancer de la vessie (LABORATOIRES IPSEN PHARMA, 17 Juin 2013).

3.3. L'Infracyanine[®] : vert d'indocyanine monopic

En France, l'ICG est commercialisée sous le nom d'Infracyanine[®] qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) selon une procédure nationale le 16 Avril 2003, sous la dénomination d'Infracyanine[®] (Poudre et solvant pour solution injectable - vert d'indocyanine monopic). Elle est distribuée par les laboratoires SERB, spécialisés dans les médicaments de prescription pour niches thérapeutiques.

L'indication de l'ICG en France permet son utilisation uniquement pour un usage diagnostique dans les domaines suivants (LABORATOIRES SERB, 1 Mars 2013) :

- étude des vaisseaux choroïdiens par angiographie, en particulier pour la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), la myopie dégénérative, et les autres causes de néo-vascularisation choroïdiennes, chorioretinopathie idiopathique centrale, œdème maculaire, maladies inflammatoires de la choroïde, dégénération familiale et héréditaires et tumeurs choroïdiennes,
- détermination du débit sanguin hépatique et de la réserve fonctionnelle hépatique par des tests de clairance,
- mesure du volume sanguin circulant et du débit cardiaque ; la détermination non invasive est particulièrement recommandée chez le nouveau-né, le nourrisson et le patient en unité de soin intensif.

Ce médicament est soumis à prescription médicale.

4. Perspectives d'utilisations de l'Indocyanine Green en tant que photosensibilisateur pour la thérapie photodynamique

4.1. Définition d'un photosensibilisateur (PS)

Une molécule photosensible, appelée « photosensibilisateur » (PS), est une espèce chimique capable d'absorber des photons (énergie lumineuse) et de transférer cette énergie à d'autres espèces du milieu environnant. Ce transfert d'énergie se traduit par la production d'espèces réactives de l'oxygène (aussi appelées ROS, de l'anglais *Reactive Oxygen Species*), dont l'oxygène singulet (1O_2), qui correspond à une espèce extrêmement réactive du dioxygène, capable de réagir sur de nombreux substrats biologiques et de provoquer, ainsi, la mort cellulaire (DOUGHERTY, et al., 1998).

4.2. La thérapie photodynamique

4.2.1. Définitions

La PDT ne peut avoir lieu sans les 3 éléments suivants :

- une molécule photosensible = Photosensibilisateur (PS),
- la lumière,
- l'oxygène.

Cette thérapie consiste à exciter une molécule photo-activable, le PS, qui va, en présence de lumière à une longueur d'onde judicieusement choisie, absorber un photon, et transférer son énergie à l'oxygène environnant pour former des espèces réactives de l'oxygène et/ou de l'oxygène singulet (1O_2), principal responsable de la mort cellulaire (COULEAUD, 2011). (voir Figure 16). Or, *in vivo*, le PS rentre en compétition avec les constituants du sang et les tissus qui absorbent la lumière dans le visible. Par exemple, parmi les constituants du sang, l'eau absorbe la lumière jusqu'à 400 nm et au-delà de 800 nm et l'hémoglobine absorbe jusqu'à 600 nm. Pour que le PS soit efficace en PDT, il doit donc absorber dans une zone appelée "fenêtre thérapeutique" entre 650 nm et 1000 nm où les composants endogènes absorbent le moins. De plus, selon la longueur d'onde utilisée pour exciter le PS, la lumière va pénétrer plus ou moins profondément les tissus.

L'excitation du PS sera donc choisie en fonction du type de cancer à traiter et de la profondeur de la tumeur à soigner.

D'un point de vue clinique, la PDT entraîne moins de traumatismes que les traitements classiques, et est proposée comme une stratégie locorégionale thérapeutique relativement récente et très prometteuse.

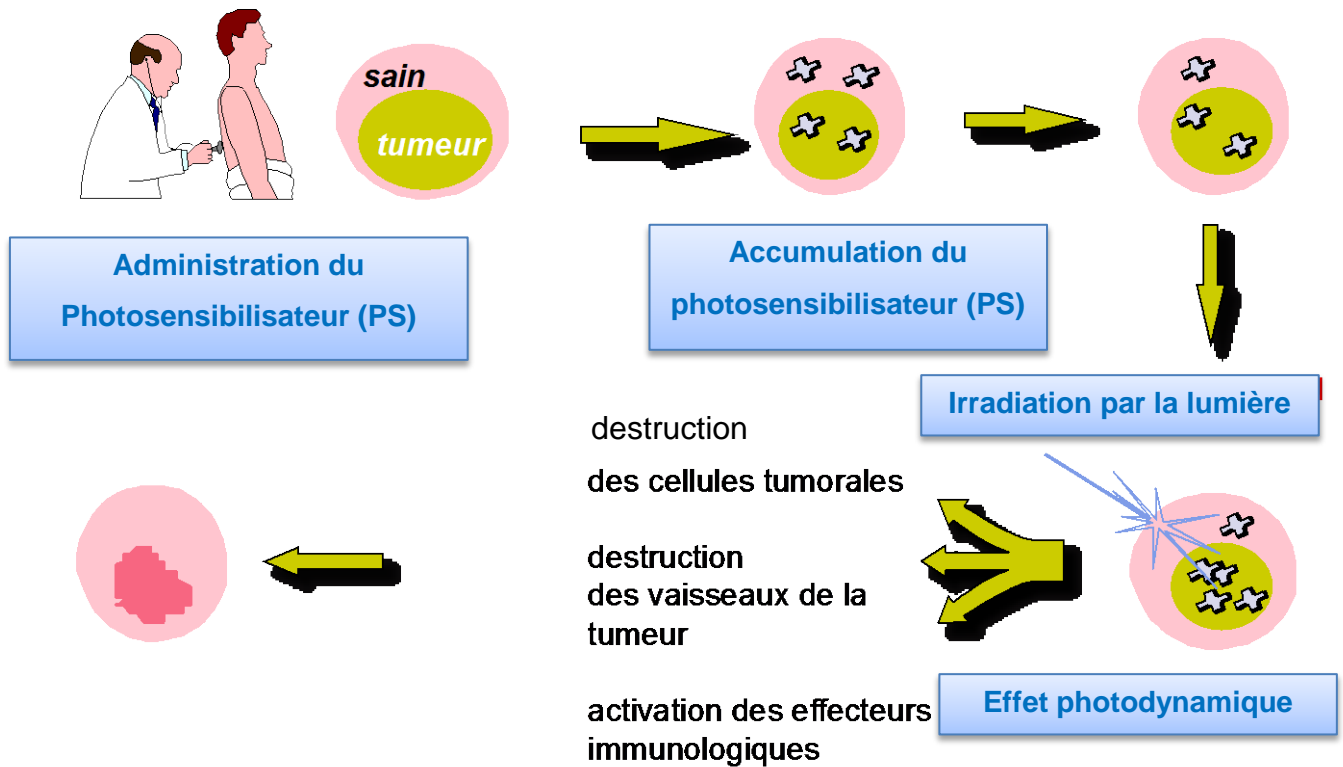


Figure 16 : Schéma illustré et simplifié de la thérapie photodynamique d'après les données de Lassalle (LASSALLE)

4.2.2. Applications

La PDT est utilisée pour traiter de nombreuses pathologies cancéreuses ou non, dont les principales sont décrites ci-dessous.

4.2.2.1. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

La DMLA est la première cause de perte de la vision dans les pays industrialisés chez les sujets de plus de 50 ans. Avec le vieillissement de la population, la DMLA constitue une part de plus en plus importante de la consultation ophtalmologique. De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients.

La PDT permet de limiter la perte de vision à condition d'être pratiquée tôt. Les résultats sont meilleurs si les néo-vaisseaux ne sont pas trop étendus. Elle nécessite 3 à 4 séances la première année en moyenne. La PDT peut être accompagnée d'une injection intra-oculaire dans le vitré de Triamcinolone qui a un effet bénéfique sur l'œdème maculaire et facilite l'action du laser ou par une injection d'anti-VGEF (Association Française d'Ophtalmologie).

4.2.2.2. Les infections bactériennes

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques des bactéries responsables d'infections chez l'homme a nécessité le développement d'alternatives antimicrobiennes. La PDT ou la PHT peut tuer les bactéries multi résistantes à l'aide d'une longueur d'onde proche de l'infrarouge et de l'ICG (TOPAGLU, et al., 2012).

4.2.2.3. L'acné

L'acné est l'un des problèmes les plus communs en dermatologie.

La PDT et la PHT présentent de nombreux avantages par rapport aux autres traitements conventionnels de l'acné. C'est un traitement sélectif et non invasif qui ne présente pas d'effets secondaires sérieux. La PDT et la PHT sont sans danger et efficaces pour le traitement de l'acné faible à modérée (JANG, 2011).

4.2.2.4. Les cancers

Le processus cancéreux correspond à une multiplication et à une prolifération anormale de certaines cellules. Tous les tissus de l'organisme peuvent être touchés par ce dérèglement dont les causes, les évolutions et les conséquences sont très diverses. C'est une cause majeure de décès dans le monde. Le traitement des cancers suppose la sélection soignée d'un ou de plusieurs traitements comme la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie ou l'hormonothérapie. L'objectif des traitements est de guérir la maladie ou de prolonger considérablement la vie du patient, tout en améliorant sa qualité de vie (OMS (Organisation Mondiale de la Santé)).

4.2.2.5. Les varices

Les varices sont un problème courant qui affecte environ 40 à 50% de s adultes. L'âge, l'insuffisance veineuse chronique, la prise d'hormones, la grossesse, la prédisposition génétique sont parmi les facteurs de risque les plus importants. Différents auteurs ont évalué l'efficacité d'un traitement de vaisseaux sanguins au laser associé à l'ICG (KLEIN, et al., 2013).

4.2.3. Thérapie photodynamique couplée avec d'autres thérapies

Pour traiter certaines pathologies, la PDT peut être utilisée comme une thérapie adjointe à d'autres thérapies comme la chirurgie, l'immunothérapie, la chimiothérapie, la radiothérapie, ... (SIBATA, et al., 2000)

4.3. Limites de l'Indocyanine Green en tant que photosensibilisateur et solutions proposées

4.3.1. Limites de l'Indocyanine Green

Malgré les aspects très attractifs de la PDT, le nombre de PS disponibles sur le marché est limité, et une conception rationnelle de PS mieux adaptés aux applications thérapeutiques permettrait de donner un nouvel essor à la PDT.

Par exemple, l'ICG en tant que PS présenterait des limites dans ses applications cliniques notamment dues à (HOLLINS, et al., 1987) (SHARMA, et al., 2012) (PHILIP, et al., 2010) (RUSSIN, et al., 2010) (PARK, et al., 2012) :

- un faible rendement d'espèces réactives de l'oxygène,
- une faible sélectivité,
- une dégradation rapide dans certains types de milieu,
- une élimination rapide dans la circulation sanguine,
- une instabilité en milieu physiologique dépendant de sa concentration, de la nature du solvant, de la température et de la lumière.

Malgré tout, l'utilisation de molécules comme l'ICG, ayant déjà une AMM, paraît une piste intéressante, puisque ces molécules sont déjà autorisées pour des applications diagnostiques.

De plus, des pistes se développent comme le ciblage par vectorisation des PS et/ou par la fixation d'un module d'adressage permettant de fixer plus spécifiquement les PS à la cible.

4.3.2. Encapsulation de l'Indocyanine Green

Pour parer aux limites de l'ICG, des chercheurs ont démontré l'intérêt des nanoparticules. Les nanoparticules peuvent servir à transporter une molécule jusqu'à sa cible. Elles sont relativement faciles à préparer, et présentent de nombreux avantages, comme une bonne sélectivité, et une protection efficace de l'agent thérapeutique envers la dégradation par les enzymes du corps humain. Lorsqu'elles sont de petite taille, elles permettent d'accumuler de façon sélective le PS dans les cellules cibles par des mécanismes de rétention et de

perméabilité (effet EPR) du tissu tumoral (BECHET, et al., 2008) (COULEAUD, et al., 2010) (CHOUIKRAT, et al., 2012).

Le seul exemple d'encapsulation de l'ICG dans la littérature est, à notre connaissance, décrit par Yaseen et al. (YASEEN, et al., 2007). Ils ont étudié l'encapsulation de l'ICG à l'aide de mésocapsules de diamètre compris entre 400 et 800 nm. Ainsi, ils ont démontré que ce système d'encapsulation protégeait l'ICG d'une dégradation thermique.

4.3.3. Ciblage de l'Indocyanine Green

La thérapie ciblée est une nouvelle stratégie thérapeutique prometteuse. Une de ces nouvelles approches est la PDT ciblée qui va, à la fois, délivrer le PS au niveau du tissu tumoral et en même temps améliorer l'efficacité de la PDT (PERNOT, et al.).

En fonction du mécanisme d'action du ciblage, 2 sortes de ciblage peuvent être distinguées :

- le ciblage passif ou indirect : les néo-vaisseaux tumoraux sont ciblés,
- le ciblage actif ou direct : la tumeur est directement ciblée.

Ces stratégies prennent en compte les propriétés biologiques et moléculaires des tissus tumoraux (elles visent par exemple des récepteurs spécifiques des cellules tumorales), et c'est pour cela qu'elles sont qualifiées de thérapie ciblée.

Fluorophore ou Photosensibilisateur ? Encore un débat

1. Introduction

L'ICG est bien connue pour ses propriétés de fluorescence, c'est d'ailleurs dans ce cadre que cette molécule est utilisée en usage diagnostique. Depuis, les recherches continuent pour comprendre au mieux ses différentes propriétés photophysiques. A l'heure actuelle, dans certaines publications, l'ICG est proposée comme un photosensibilisateur pour ses effets cytotoxiques *in vitro* et *in vivo* quand elle est couplée à la lumière, par exemple, pour la PDT. De plus, il est suggéré que la PDT utilisant l'ICG en tant que PS peut être associée à la radiothérapie, la chimiothérapie ou les ultrasons pour augmenter les chances de guérison des patients. L'ICG est aussi utilisée dans l'hyperthermie pour renforcer la photocoagulation dans le traitement de pathologies des vaisseaux sanguins. L'HT peut aussi être couplée à la chimiothérapie ou l'immunothérapie pour améliorer leurs effets.

La revue que nous avons écrite recense et analyse l'ensemble des publications scientifiques traitant de l'utilisation de l'ICG à des fins thérapeutiques.

2. Indocyanine Green : Photosensitizer or Chromophore ? Still a Debate

Indocyanine Green: Photosensitizer or Chromophore? Still a Debate

Camille Giraudeau^{1,2}, Albert Moussaron^{1,2}, Aurélie Stallivieri^{1,2}, Serge Mordon^{3,4} and Céline Frochet^{1,2,4,*}

¹Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, Nancy, F-54000, France; ²CNRS, LRGP, UMR 7274, Nancy, F-54000, France; ³INSERM U703, Université de Lille 2, CHRU, Institut Hippocrate 152, rue du Dr. Yersin, 59120 Loos; ⁴GDR CNRS 3049 « Médicaments Photoactivables-Photochimiothérapie » (PHOTOMED), France

Abstract: Indocyanine green (ICG) is a water-soluble anionic tricyanocyanine dye developed during the Second World War that was first approved for clinical use in humans in 1956. The main features of ICG that make it suitable for bio-imaging applications are its near infrared absorption and its fluorescence. Although ICG is mainly used for its fluorescence emission properties, it has also been hypothesized that it can serve as a photosensitizer for photodynamic therapy applications, eliciting cytotoxic effects both *in vitro* and *in vivo* when used in combination with light at wavelengths in the region of 800-830 nm. Moreover, ICG can be used for hyperthermia of enhanced-photocoagulation of blood vessels treatment. In this paper we have gathered all the available data concerning the use of ICG for different treatments.

Keywords: Cytotoxic effects, fluorescence, hyperthermia, indocyanine Green (ICG), photodynamic therapy (PDT), selective photocoagulation, site-specific therapy.

1. INTRODUCTION

ICG was developed in the Second World War as a dye for use in photography. It was first approved for clinical use in humans in 1956 [1], [2] and was tested in 1957 at the Mayo Clinic for use in human medicine. That is the only Near Infra Red (NIR) dye approved by the USA Food and Drug Administration (FDA) for clinical applications such as ophthalmological ones e.g. ophthalmologic angiography[3], as a vascular imaging agent [4] including the measurement of cardiac output [5], determination of plasma volume [6] and capillary microscopy [7], as well as hepatic function studies [8], guiding biopsy [9] and object localization in tissue [10]. The main features of ICG that make it suitable for bio-imaging applications are its NIR absorption and fluorescence. It is commercially available at a low cost in a very pure form. ICG is mainly used as a very efficient fluorescent probe [11-20].

ICG has been proposed as a photosensitizer, which elicits cytotoxic effects both *in vitro* and *in vivo* when used in combination with light for photodynamic therapy (PDT) applications. Moreover, ICG-PDT can be associated with radiotherapy, chemotherapy and ultrasounds. Furthermore, ICG can be used for hyperthermia treatment of enhanced-photocoagulation of blood vessels treatments that can be associated with chemotherapy, or immunotherapy.

2. GENERAL INFORMATION ABOUT ICG

2.1. Chemistry

ICG is a water-soluble anionic tricyanocyanine dye (MW 775) containing an extended conjugated system. Its chemical

name is 1H-Benz[e]indolium,2-[7[1,3-dihydro-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)-2H-benz[e]indol-2-ylidene]-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)hydroxide, inner salt, sodium. The chemical structure (see Fig. 1) is made up of two polycyclic moieties, each known as benzoindotricarbo-cyanin, connected to each other by a carbon chain. While the polycyclic moieties are responsible for lipophilic properties of ICG, the sulfate groups impart hydrophilicity. As a result, ICG is amphiphilic and soluble in inorganic solvents such as methanol and DMSO as well as in aqueous media, including buffers [25]. Its chemical structure does not easily allow conjugation reactions. Therefore, an encapsulated, biocompatible and injectable form of ICG could greatly expand its clinical applications for imaging (fluorescence, photoacoustic contrast) or therapy (PDT and photothermal).

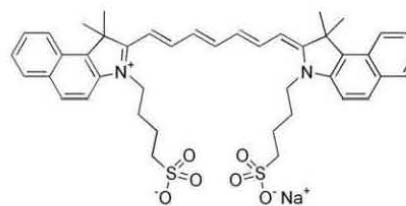


Fig. (1). Chemical structure of ICG.

2.2. Photophysical Properties

Depending on the solvent and the dye concentration, the maximum absorption is observed between 600 and 900 nm. For medical applications based on absorption, a maximum absorption at approximately 800 nm in blood plasma at low concentrations is important [6]. After light absorption, the

*Address correspondence by this author at the INSERM U703, Institut Hippocrate 152, rue du Dr. Yersin, 59120 LOOS France; Tel: 33 320 446 708; Fax: 33 320 446 708; E-mail: serge.mordon@inserm.fr

ICG molecule can follow one of three main pathways to deactivate its excited singlet state as shown in the simplified Jablonski diagram (Fig. 2).

Firstly, the absorbed energy may be converted to a fluorescence emission between 750 nm and 950 nm. The fluorescence spectrum is very wide and its maximum values are approximately 810 nm in water and 830 nm in blood (Fig. 3). The large overlap of the absorption and fluorescence spectra can lead to a marked reabsorption of the fluorescence by ICG itself. This can be used for the detection of ICG *in vitro* or *in vivo*.

Secondly, a part of the energy is transferred to an ICG triplet state by intersystem crossing (ISC). Reindl *et al.* [26] found that the yield of triplet formation by ISC was respectively 14%, 16%, 17% and 11% in water, methanol, DMSO and aqueous albumin solution. These authors suggested that the measured quantum yields of triplet formation in the range of 10% to 20% are sufficiently high to generate efficient Reactive Oxygen Species (ROS), in particular singlet oxygen.

Thirdly, the energy can be transformed into heat inside the ICG molecule by internal conversion. This is the major process after photon absorption, since about 85% of absorbed light energy is converted to heat.

Depending on the energy applied, different mechanisms can occur that lead to different types of therapies (Table 1). Different terminologies are used in the literature when ICG is used to induce a temperature increase: indocyanine green enhanced laser photocoagulation, photodynamic hyperthermic therapy, photothermal therapy (PTT), etc... (Table 1). To describe hyperthermia (therapeutic procedure used to raise the temperature between 40°C to 43°C to achieve a specific tumor killing effect) and coagulation (therapeutic procedure used to raise the temperature above 53°C, for a duration longer than 1s, to achieve a non-specific tissue necrosis), we use the term « photothermal therapy (PTT) ».

2.3. Degradation of ICG

The degradation of ICG in aqueous solution follows (pseudo) first-order kinetics. Exposure to light and high temperatures causes accelerated degradation. The type and intensity of exposed light to which ICG is exposed also affects

degradation. ICG aqueous solutions have been found to be more stable in the dark, at low temperature and at higher ICG concentrations [28]. Engel *et al.* [29] investigated the light-induced decomposition of ICG and tested the cytotoxicity of the light-induced decomposition products. ICG in solution was irradiated with laser light, solar light or surgical endolight and the light-induced decomposition products were analyzed by mass spectroscopy coupled to liquid chromatography. Independently of the light source used, the authors reported that $^1\text{O}_2$ was formed (but not detected) leading to dioxetanes by [2+2]-cycloaddition of $^1\text{O}_2$ (Fig. 4). These dioxetanes decomposed thermally into several carbonyl compounds. It is well-known that ICG dissolved in any solvent is fairly unstable, particularly when it is exposed to light. The results clearly showed that the decomposition products reduced the viability of RPE cells *in vitro*. However, the decomposition was inhibited by adding sodium azide that favors the formation of $^1\text{O}_2$. The authors claimed that direct proof of singlet oxygen by the detection of its luminescence at 1270 nm failed (data not shown). The authors suggest that ICG first produces $^1\text{O}_2$, then further decomposition gives products that are responsible for the destruction of the cells. Thus it has been proposed that RPE cells are not predominantly killed because of oxidation of cellular constituents, but because of the toxicity of the ICG decomposition products.

2.4. Pharmacokinetics and *In Vivo* Behavior

Because of its complex molecular structure, ICG has amphiphilic properties (both lipophilic and hydrophilic characteristics) that enable it to bind to many plasmatic proteins such as human serum albumin (through its hydrophobic core), globulins (80%) and lipoprotein. It has also been found to bind to alpha1- and beta1-lipoproteins (for more information see [25]). Thus, ICG is able to remain intravascular for a long time, at least longer than Fluorescein, which is more hydrophilic than lipophilic and contrary to ICG is likely to leak out of vessels quickly.

The hepatobiliary elimination of ICG explains the rapid elimination after intravenous injection. The first publications on ICG reported a half-life of 2 to 4 minutes. These data are consistent with recent studies using spectrophotometry elimination kinetics which showed an exponential decay in two phases: an initial rapid phase leading to a half-life of 3 to

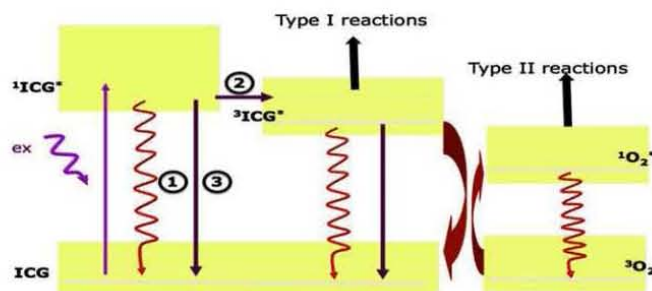


Fig. (2). Simplified Jablonski diagram 1) fluorescence emission, 2) intersystem crossing 3) heat production.

4 minutes and a second slow phase leading to a half-life of about one hour. The single exponential model is a good approximation for the early time. For the study of later times (after 30-50 minutes) mathematical modeling according to two exponential decay seems essential since the second term comes more prominent in the later time [25] (Fig. 5).

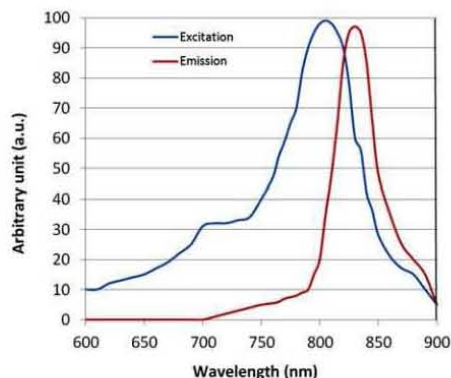


Fig. (3). Absorption and emission spectra of ICG (personal data).

Table 1. Relevant definitions or therapeutic definitions.

Therapy	Definition
Hyperthermia (HT)	Therapeutic procedure used to raise the temperature between 40°C to 43°C to achieve a specific tumor killing effect.
ICG-enhanced photocoagulation	ICG reinforces the NIR light absorption by the biological tissue (e.g. vessel, tissue solder [27] ...) (temperature superior to 53°C during more than 1 second).
PDT	Therapeutic procedure using oxygen, light and a photosensitizer to induce the production of Reactive Oxygen Species.
Photodynamic hyperthermia therapy (PHT)	Combination of PDT and HT.

ICG changes its molecular structure and forms aggregates whose absorbance properties vary, depending on their exposure to light, different temperature conditions and the time after ICG was dissolved in solvent [35].

2.5. Toxicity and Adverse Effects

ICG is metabolized microsomally in the liver and is only excreted *via* the liver and bile ducts; since it is not absorbed by the intestinal mucous membrane, its toxicity can be classified as low. The cytotoxicity has a median lethal dose LD₅₀ of 50-80 mg/kg [36]. The safety of intravenously applied ICG in humans is well documented with severe adverse reactions occurring in only 0.05% of recipients [37]. Iriyama *et al.*, [38] examined the effects of ICG on retinal ganglion cells (RGCs) *in vitro* and *in vivo*. They observed an inherent toxicity of ICG in a dose-dependent manner.

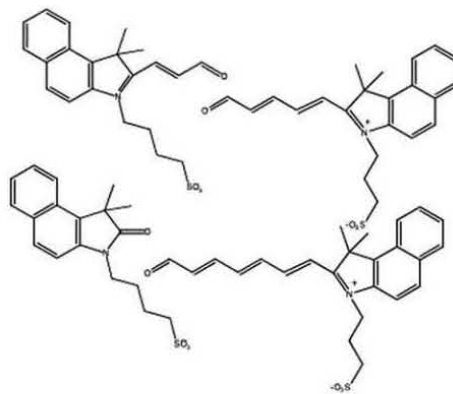


Fig. (4). Decomposition products of ICG upon light excitation.

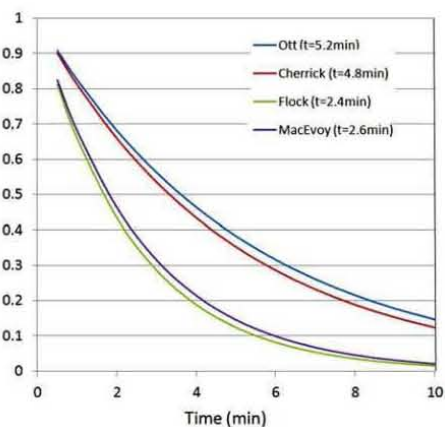


Fig. (5). ICG blood clearance; the curves were calculated using a monoexponential model and data provided by Ott *et al.*, Cherrick *et al.*, Flock *et al.*, MacEvoy *et al.* [30-34].

Despite its many advantages, ICG has several limitations for clinical applications: [32,39-42]

- A low quantum yield of reactive oxygen species,
- A threshold concentration in certain environments (80 μ g/mL plasmatic concentration),
- A lack of selectivity,
- A rapid degradation in moist environments that prevent it from being widely used in clinical applications,
- A rapid excretion from the circulation when administered in molecular form,
- It binds rapidly to albumin and high density lipoproteins, causing agglomeration,
- It shows instability in physiological conditions as a function of its concentration, the nature of the solvent, pH, temperature and light exposure.

A solution to prevent some of these side effects is to encapsulate ICG into nanoparticles.

2.6. Encapsulation of ICG

The utility of ICG remains limited by its unstable optical properties and nonspecific localization. Its usefulness for laser-mediated diagnostic and therapeutic applications could be vastly improved if it could be preferentially accumulated in significant quantities at a targeted sites [43]. Studies have been carried out to understand the interest of nanoparticles and this is illustrated by the number of reviews that have been written in the last two years on this subject [35-37]. Nanoparticles can work as carriers for anti-cancer agent delivery. They are relatively easy to prepare and have many advantages such as good colloidal stability, effective protection of the encapsulated drug against enzymes and hydrolysis, surface tailorability and multifunctionality. More importantly, due to their size, nanoparticles allow selective accumulation of the photosensitizer (PS) in cancer cells due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect of tumor tissues [44-46]. Another advantage of using nanoparticles is that they can also protect ICG. For example, Yaseen *et al.* [35] investigated the effect of encapsulation of ICG within dextran-coated electrostatically assembled mesocapsules (MCs) of 400 nm to 800 nm diameter. They proved that the MC system protected ICG from thermal degradation at all temperatures tested. In 2009, the same team encapsulated ICG within MCs to explore the potential for targeted optical imaging and therapy. *In vivo*, ICG was administered intravenously to Swiss Webster mice either as a free solution or in MCs. The circulation kinetics of ICG appeared to be unaffected by encapsulation; however, the deposition within organs other than the liver suggested a different biodistribution mechanism. Results indicated that the capsules' coating influenced their biodistribution to a greater extent than their size did. The MCs allowed the delivery of ICG to organs other than the liver, enabling the potential development of new optical imaging and therapeutic strategies.

Saxena *et al.* [47] investigated the biodistribution of ICG in healthy mice, when it was delivered through polymeric nanoparticles. Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles entrapping ICG were engineered and characterized using a fluorometric assay method. The biodistribution of ICG was determined in healthy C57BL/6 mice (female, 10-week old) when delivered *via* PLGA nanoparticles, in comparison to free ICG solution. The extraction method for ICG showed an efficiency of above 80% for various organs and plasma. When an i.v. dose was used to deliver ICG, 2-8 fold higher concentrations of ICG were deposited in various organs for nanoparticles, with 5-10 times higher plasma levels compared to free ICG solution until 4 h. The nanoparticle formulation significantly increased the ICG concentration and circulation time in plasma as well as the ICG uptake, accumulation and retention in various organs. Saxena *et al.* [48] also prepared ICG-loaded biodegradable PLGA nanoparticles by a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. To optimize the nanoparticle formulation, the influence of formulation parameters such as types of ICG, and amounts of ICG and the polymer were investigated. All PLGA nanoparticle formulations were found to have a mean diameter within the range of 300-410

nm. All ICG-loaded nanoparticle formulations were found to have similar ICG content of nanoparticles and showed an increase in ICG entrapment with increased amount of polymer. The release pattern consisted of two phases, with an initial exponential phase releasing about 78% of ICG within 8 h, followed by a slow phase releasing about 2% of ICG within the next 16 h.

Kim *et al.* [49] used polymeric micelles formed by the self-assembly of amphiphilic block copolymers to encapsulate ICG. Such filamentous carriers with high aspect ratios offer potential advantages over spherical carriers, including prolonged circulation times. Mixed micelles composed of poly(ethylene oxide)-poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-poly(ethylene oxide) (PEO-PHB-PEO) and Pluronic F-127 (PF-127) were used to encapsulate ICG. The micelle formulations were assessed for their effects on tumor accumulation after tail vein injection into xenograft tumor-bearing mice, by noninvasive optical imaging. Advantages of the mixed micelle formulations over pure PEO-PHB-PEO or PF-127 micelles include ease of formulation at room temperature, filamentous structures, reduced plasma clearance rate, and increased passive tumor targeting. These formulations are therefore promising for tumor-targeted imaging and drug delivery.

Kim *et al.* [50] developed 100 nm diameter nanoparticles containing ICG as a contrast agent for Photoacoustic (PA) Imaging and PDT based on technology using organically modified silicate (ormosil) as a matrix for the nanoparticles. PA Imaging is an emerging biomedical method based on detecting acoustic signals generated from biological tissues by optical absorption to increase the selectivity for breast and prostate cancer. The particles were conjugated with HER-2 antibody and the photodynamic efficacy of ICG ormosil nanoparticles was evaluated by measuring the change of fluorescence intensity of a DPIBF (1,3-diphenylisobenzofuran) chemical probe that is a well-known singlet oxygen quencher [51,52]. After irradiation at 800 nm over 30 sec with a light dose of 1.36 kJ/cm², both free ICG and ICG ormosil nanoparticles seemed to produce ¹O₂. As mentioned by the authors, the light dose is relatively high compared to the typical level of clinical PDT and further investigations are required.

2.7. Targeting of ICG

Site-specific therapy is a new promising therapeutic strategy, created to overcome growing problems of contemporary medicine, such as drug toxicity and resistance. An emerging aspect of this approach is targeted photodynamic therapy (TPDT), with the main aim of improving delivery of the photosensitizer to cancer tissue and at the same time enhancing specificity and efficiency of PDT (for a review, see [53]). Depending on the mechanism of targeting, the strategies of TPDT are divided into "passive" and "active" and "activable" where in the last case the photosensitizer is only activated in the targeted tissue. In the passive strategy, an arsenal of nanoparticles (NP) has recently been developed, including polymers NP, as well as supramolecular carrier platforms such as dendrimers, micelles, liposomes. Numerous interesting reports have clearly demonstrated that enhanced specific drug targeting, cellular uptake and bioavailability can be achieved by active targeting, that is to say by

conjugating various ligands such as peptides, growth factors, transferrin, antibodies or antibody fragments, oligonucleotide aptamers and small compounds such as folate [51,54]. The rationale of all these strategies is taken from the biological and molecular characteristics of tumor tissues. For instance, alterations or increased levels of specific cellular type receptor expression occur in diseased tissues.

The biodistribution of the dual modified ICG-loaded PLGA nanoparticles with dual surface modifications of polyethylene glycol PEG and folic acid (FA) in mice xenografted with MDA-MB-231 human breast cancer cells with a high expression of folate receptor (FR) has been investigated by Ma *et al.* [55], to directly confirm that the dual modification can enhance the delivery of ICG-loaded nanoparticles into the tumor tissues with high expression of FR to achieve a successful PDT treatment. They showed that the modified nanoparticles (with PEG and FA) accumulated preferentially into the tumor compared to non-modified nanoparticles, due to the long circulation and FR-mediated uptake. Likewise, Rungta *et al.* [56], have described a general strategy for the preparation of particles with surface attached ICG and PEG chains. PEGs of various molecular weights and ICG were modified with the addition of a terminal azide (azPEG and azICG, Fig. 6) and then attached to PA colloids through Click Chemistry reactions in water.

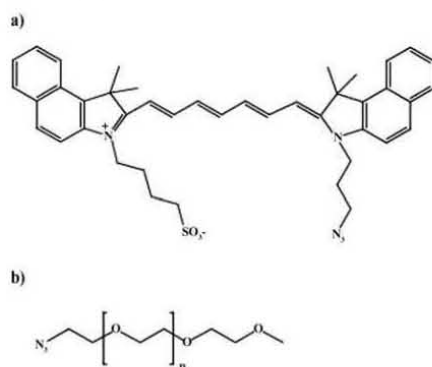


Fig. (6). Chemical structures of AzICG (a) and AzPEG (b).

The placement of azICG onto the surface of nanoparticles allowed the chromophores to complex with bovine serum albumine that resulted in the enhancement of dye emission. In addition, the inclusion of azPEG with azICG onto the particle surface resulted in a synergistic enhancement of the fluorescence intensity, with azPEGs of increasing molecular weight amplifying the response. Preliminary PDT studies with HepG2 cells combined with particles that were surface-decorated with both azICG and azPEG indicated that a minor exposure to 780 nm radiation resulted in a statistically significant reduction in cell growth. These results suggested that the surface attachment of azide-modified ICG to particles and its availability to spatially adjacent molecular oxygen, coupled with protein enhanced fluorescence, may make these particles a valuable resource in the treatment of cancer. This is the only study to date dealing with covalent grafting of ICG onto nanoparticles.

In the following parts of this article, we will describe the studies that have been performed using ICG as a treatment agent, depending on the type of disease that has been treated. All the available details concerning ICG concentration, light type and doses, irradiation time and ROS production or temperature elevation are gathered in Table 2.

3. ICG FOR PDT APPLICATIONS

3.1. What is PDT?

PDT is an emerging non-invasive technique for the treatment of a variety of cancer tumors, involving the light activation of a photoactivable molecule called a photosensitizer in the presence of oxygen (Table 1) [57]. After light irradiation of the photosensitizer, the energy from the excited photosensitizer can be transferred to surrounding molecules, allowing the generation of ROS including $^1\text{O}_2$ which is believed to be the major cytotoxic agent [58]. Thus, delivering the photosensitizer into cancer cells means the tumor can be specifically destroyed.

3.2. ICG for PDT Applications

3.2.1. Infections Treatment

The increase in resistance to antibiotics among disease-causing bacteria has necessitated the development of alternative antimicrobial approaches [59]. PDT can be used to destroy multidrug resistant bacteria with NIR and ICG. Topaloglu *et al.*, [60] investigated the optimum parameters with an 809 nm-laser (84, 168, 252 J/cm^2) and variable concentrations of ICG (20, 50 100, 125 150, 200, 250 $\mu\text{M}/\text{mL}$) to kill *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro*. They were able to optimize laser power and ICG concentration to non-toxic levels and achieved a 99% decrease in bacterial load with 252 J/cm^2 laser light and 125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ ICG concentration. Likewise, Omar *et al.*, [59] demonstrated that *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* were susceptible to be killed by ICG, excited with high or low intensity light (808 nm), the bactericidal effect being dependent on both ICG concentration and the light dose. Deuterium oxide increased the proportion of *S. aureus* killed suggesting that singlet oxygen was involved in the killing of the bacteria.

Pemi *et al.*, [61] developed novel antimicrobial polymers containing ICG. When exposed to light (808 nm), polyurethane-containing ICG exhibited antimicrobial activity against Gram-positive bacteria; a 2 \log_{10} reduction was achieved against methicillin-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis* (31, 83 J/cm^2). Such materials could be useful for preparing intravenous catheters, which are often colonized by such organisms. These findings imply that ICG in combination with light from a NIR laser may be an effective means of eradicating bacteria from wounds and burns. Under the same conditions the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* appeared to be less susceptible, the viable count being reduced by 0.5 \log_{10} .

Boehm and Ciancio [62] tested ICG uptake in *Porphyromonas gingivalis* 381 and *Aggregatibacter actinomycetem-comitans* in addition to *Escherichia coli* DH5alpha and

Table 2. Studies based on the use of ICG as a treatment agent.

Type of Treatment	ICG	In Vitro	In Vivo	λ_{ex} (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
ICG FOR PDT APPLICATIONS								
PDT Infection	Solution	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Strep. Pyogenes</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	808	500 mW Gallium-aluminium-arsenide near-infrared (NIR) Laser (Thor International Ltd., UK) 1.37, 0.07 or 0.048 W/cm ² 470, 225 and 150 Mw	Yes	L-tryptophan Deuterium oxide	[59]
PDT Infection	Solution in PBS (20 μ g/mL to 250 μ g/mL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Wild type strain (ATCC 27853)	-	809	Diode laser ,Bogazici University, Biomedical Engineering Institute, Biophotonics Laboratory 84, 168, 252 J/cm ²	No	No	[60]
PDT Infection	Solution in acetone /water	<i>Staphylococcus aureus</i> - <i>staphylococcus epidermidis</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Pseudomonas aerugina</i>	-	808	Laser, 31.83 J/cm ²	No	No	[61]
PDT Infection	Dissolved in DMSO (5mM) and diluted in PBS (0-10 μ M)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> 381 - <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> - <i>Escherichia Coli</i> DH5alpha HepG	-	810	Diode laser (Ivoclar Odyssey) Fiber (0.4 mm diameter) at 1 mm over the pellet W or 0.5 W 80 W/cm ² or 400 W/cm ² 0, 0.5 , 2 and 5 s	-	-	[62]
PDT Acne	Topically applied (1mg/mL)	-	22 volunteers	803 soft acne 809 soft acne 803 acne lesions	OPC – BO15 – MMM FCTS diode laser (Opto Power Corp., Tucson, AZ) 5-10 min - 10-50 mW/cm ² 15 min - 150-190 mW/cm ² 803 nm, 0.5 s - 18 W/cm ² with cooling or 809 nm, 0.5 s, 200 W/cm ² without cooling	No	No	[119]
PDT Acne	Topically applied	-	5 patients (2 men, 3 women)	810	Diode laser (LAS-30A ; TNL Inc., Daejeon, South Korea), 1-30 W, pulse duration 100-900 ms, 1-10 Hz	No	No	[73]

(Table 2) contd....

Type of Treatment	ICG	In Vitro	In Vivo	λ_{ex} (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT Acne	Topically applied	-	34 Patients (12 men, 22 women, from 17 to 29 years)	805	Diode laser (K-laser, Eltech, Treviso, Italy) 4 W/cm ² at 1 mm away from the skin and a spot size of 10 mm	No	No	[72]
PDT Acne	Topically applied	-	16 patients (7 men, 9 women, from 16 to 34 years)	805	NIR diode laser (LightSheer, Lumenis) 30 ms 12 J/cm ²	No	No	[71]
PDT Dermatology	i.v. application (0.2, 4 mg/kg body weight)	-	Male syrian golden hamsters	805	Diode laser, Meditec, Aesculap®, Jena, Germany beam diameter = 6 mm 106 kW/cm ² 3.2 J/cm ²	No	T increases with [ICG] and vessel diameter	[75]
PDT Dermatology	Intravenous administration (2 mg/kg body weight)	-	15 female patients (from 28 to 62 years)	808	PDL (Sclerolaser plus™, candela Corp., Wayland, MA) Diode laser (Mediostar, Asclepion, Jena, Germany) 50-110 J/cm ²	No	No	[74]
PDT ophthalmology	Intravenous bolus	-	15 pigmented rabbits (weighing 2 to 2.5 kg)	810	Diode laser (TTT 1500, OPTO, Sao Carlos, Brazil) Time = 20,30,10 s Diameter of the laser beam = 400 microns Power density 230, 630 or 950 mW/cm ² , Light fluence 6.3 J/cm ²	No	No	[76]
PDT ophthalmology	Solution in water	QNR/K2	-	2000 lx Daylight	Daylight-colored fluorescent lamp (6500 K, Sunline; Hitachi, Tokyo, Japan)	No	No	[77]
PDT Actinic keratosis	Solution (1, 5, 10, 25, 50 μM)	HaCaT	-	805		Singlet oxygen	Sodium Azide (effective physical quencher of singlet oxygen)	[80]
PDT Actinic keratosis	Solution in water	HaCaT SCL1 SCL2 N1 fibroblast	-	805	(cw)-diode laser (Opto Power Corp., CA, USA) maximum power 15W, 80 mW/cm ² , 12, 24 to 48 J/cm ²	No	No	[81]

(Table 2) contd....

Type of Treatment	ICG	<i>In Vitro</i>	<i>In Vivo</i>	λ_{ex} (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT melanoma	Solution	Sk-Mel-28	-	788	Femtosecond Ti-Sapphire laser, average power 400mW, beam diameter 3.0 cm, spectral pulse 150 fs, pulse rate 92.5 MHz, power density 57 mW/cm ²	No	No	[82]
PDT melanoma	Solution (100 μ M)	SKMEL 188 S91	-	830	MC LASER, therapy laser processor PMC-018, Katowice, Poland 100 or 200 mW/cm ² 30 to 100 J/cm ²	No	No	[83]
PDT Cervical cancer	Solution in PBS	HeLa V79	-	830	Beautyline BTL-10 laser (Beautyline, Ltd., Prague), 0, 24, 60, 99 J/cm ² 360 mW output	No	No	[84]
PDT Colorectal cancer	100 μ ICG solution (10, 50, 100 or 500 μ M)	HT-29	-	805	(cw)-diode-laser (Opto Power Corp., CA, USA) maximum optical output power of 15 W 150 cm ² , \varnothing 14 cm a monocoire fibre with 1.5 mm diameter 30 J/cm ²	Yes	Sodium azide, histidine or mannitol	[85]
PDT Bone cancer	Local or systemic injection	CRL-1666	Subcutaneous tumor of CRL-1666	810	Diode laser (UDL-15, Olympus, Tokyo, Japan), maximum power output=15W, single silica probe (DM-6065, Olympus; core diameter 600 μ m)	No	No	[86]
PDT Breast cancer	Solution (50 μ M)	MDA-MB231	-	809	24 J/cm ² 60 mW/cm ² biophotonics Lab., Inst. of Biomedical Eng., Bogazici Univ., Istanbul, Turkey	No	np	[87]
PDT Breast cancer	Intravenous administration 4 mg/kg	-	Mice with subcutaneous tumors (7-9 mm)	808	OLD-140-CPXF-2P A, Jenoptik Laserdiode GmbH, Jena, Germany Laser beam diameter: 5 mm Pulse time: 0.2 s Laser power output: 85 W	No	T increase of 12°C	[88]
PDT Oral cancer	Solution	KB	-	640, 785, and 895	LED (light emitting diode) 50 mW/cm ²	No	No	[89]

(Table 2) contd....

Type of Treatment	ICG	In Vitro	In Vivo	λ_{ex} (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT Leukemia	Solution (12 μ M)	U-937	-	805	Wave (cw) diode laser (Quanta System, Milan, Italy) 0.65 W Fiber 1.5 mm diameter 18 J/cm ² Single long irradiation or intermittent exposure: total dose 180 J/cm ²	Singlet oxygen	Oxidation of the reducing agent dithiothreitol	[90]
PDT Leukemia	CD117-targeted ICG-Calcium phospholipid nanoparticles (ICG-CPSNPs)	32-D-p210-GFP CML Human AML	C3H/HeJ mice	-	NIR laser 0.2 J/cm ²	Singlet oxygen	dihydroethidium	[91]
PDT Pancreas cancer	Solution in water (0 to 50 μ g/mL)	MIA PaCa-2 PANC-1 BxPc-3	-	808	Diode laser (B&W Tek, Newark, DE) 0.45 W – 5 min	No	No	[92]
PDT Macular surgery	Solution	RPE	-	Spectral range: 400–700	Spotlight source (LC-8, Hamamatsu Photonics, Japan) (spectral range: 400–700 nm) 750 mW/cm ² 10 min	Intracellular ROS production	Nis-hikawa <i>et al.</i> 2000	[78]
PDT Macular surgery	Solution	Cultured retinal pigment epithelial monolayers	-	-	Fiberoptic light source (Grieshaber & Co., Schaffhausen, Switzerland) 3 to 4 mm from the cells	No	No	[79]
PDT Kaposi sarcoma	Injection (1 mg/mL) into the submucosal layer	-	13 patients with early gastric cancer (11 males and 2 females)	810	Semiconductive diode laser UDL-60 (Olympus Co., Tokyo, Japan) 30–40 W/s	No	No	[95]
ICG FOR PDT COUPLED TO OTHER THERAPIES								
PDT + Laser immunotherapy	Intra-tumor injection (2.5 mg/kg body weight)	-	Young Wistar Furth female rats (DMBA-4 transplantable cells) 6 to 8 weeks and 150 to 200 g	805	Diode laser (Diomedics, Woodlands, TX) 4-mm distance from the skin overlying the tumor a laser spot 3 mm in diameter 2 watts for 10 min, delivering a total energy of 1,200 J to the tumor to each tumor was 68,000 J/cm ² over the entire surface area.	No	No	[98]

(Table 2) contd....

Type of Treatment	ICG	<i>In Vitro</i>	<i>In Vivo</i>	λ_{ex} (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT Laser immunotherapy	Intra-tumor injection	-	female Wistar Furth rats (metastatic mammary tumor model, DMBA-4 (33-35)) male Copenhagen rats (metastatic prostate tumor model, Met-Lu (36)) age 5-6 weeks 100-125 g	805	DIOMED 25 diode laser (DIOMEDICS, The Woodlands, TX). Lower energy : 2W for 10 min maximum power output : 25 W	No	No	[102]
PDT Laser immunotherapy	Intra-tumor injection	-	Female Wistar Furth rats (DMBA-4 tumors) age 6-7 weeks 110-130 g	805	a diode laser emitting 805 nm light (Diomed 25; Diomedics, The Woodlands, TX).	No	No	[96]
PDT + Laser immunotherapy	i.v. injection	-	Rat DMBA-4 metastatic mammary tumors	805	Diomed 25 solid state laser (DIOMEDICS, The Woodlands, TX) Maximum available power 25W The laser power was set at 2W 10 min with a 3 mm diameter laser spot size, fluence of 96 J/cm ² for a tumor of 1 cm diameter	No	No	[104]
PDT + Laser immunotherapy	Intra-tumor injection	-	DMBA-4 Metastatic Tumour in Wistar Furth female Rats	805	805 nm diode laser ISLSOF (McDonnell Douglas Aerospace, St.Louis, MO) In total 1200 J of energy (2 W and 10 min) was delivered to each tumor at 4 mm from the treatment site and a 3 mm diameter spot	No	No	[123] [100]
PDT + Radiotherapy	Solution (1 - 3.5 μ g/mL)	PC-3 EPN	-	805	diode laser (Quanta System, Italy) 120 mW/cm ² - 108 J/cm ² 6 MeV (linear accelerator GE 43 SATURNNE). Irradiation at 70 cm from the source (2 Gy/min)	No	No	[107]

(Table 2) contd....

Type of Treatment	ICG	In Vitro	In Vivo	λ_{ex} (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT + Radiotherapy	Solution in water	MCF-7	-	730	Lumacare LC-122-A (Ci-Tec, USA) non-coherent light source - optical fibers with a diameter of 2 mm and 8 mm diameter light spot 45 mW/cm ² (30, 60, and 108 J/cm ²)	No	No	[108]
PDT + chemotherapy	MCF-7 cells incubated in 20 ICG μ M for 24 h	MCF-7	-	805	Quanta System (Milan, Italy) continuous wave: 0.65 W 25j/cm ² adjustable time shutter: 0.1 s	No	No	[109]
PDT + ultrasound	Solution in distilled water	RIF-1	RIF-1 tumour	830	Photon laser diode module (PM-605P, photonic product, USA), 2 - 3 min, 315 mW/cm ²	ROS (<i>in vitro</i>)	H 2 DCFDA	[110]
PDT + TTT	Aqueous solution (15 mL with 75 mg)	-	25 patients (35 to 88 years, 13 men, 12 women)	?	Diode laser (IRIS Laser, Mountain View, CA) delivered through a slit-lamp focused on the tumor with a fundus contact lens (Mainster wide-field, ocular Instrument, Bellevue, WA) 60 s, 550 mW using a 3 mm diameter spot	No	-	[113]
PDT + TTT	i.v. injection over 20 s (100 mg in 10 mL of 5% glucose solution)	-	60 patients	810	Diode laser through a slit-lamp adaptor with beam width of 1.2, 2 and 3 mm. 60 s, 300 mW with 3mm beam width	No	-	[112]

Type of treatment	Icg	In Vitro	In Vivo	λ_{ex} (Nm)	Light	Temperature	Refs.
ICG FOR PHT							
PHT Acne	Topical micro-emulsion	-	Few patients	810	Cynosure, Inc., Chelmsford, MA 4-mm spot size 50-ms pulse duration fluence 40 J/cm ²	-	[118]
PHT Acne	Topical application	-	Human (12 patients) acne vulgaris	803	Diode laser (OPC-BO15-MMM-FCTS, Opto Power Corp., Tucson, Arizona), up to 50 mW/cm ² , 10 min, 15 and 30 J/cm ² , spot diameter 10 cm	-	[120]
PHT Dermatology	i.v. injection (2 mg/Kg body weight)	-	piglets	810	Diode laser Radiant exposure: 31 to 80 J/cm ²	-	[121]

(Table 2) contd....

Type of Treatment	ICG	<i>In Vitro</i>	<i>In Vivo</i>	λ_{ex} (nm)	Light	Temperature	Refs.
PHT Ophthalmology	75 mg/mL	-	Lewis or Brown Norway rats (200-400 g)	810	Diode laser (Oculight SLx ; Iridex, Mountain View, CA) 75 μ m spot size, 100-170 mW and 400 ms pulse duration	-	[122]
PHT cancerology	i.v. injection concentration was 1% and dosage varied from 100 to 200 μ L	-	Murine mammary tumors (female rats)	808	ISL50F diode laser (McDonnell-Douglas Aerospace, St Louis, MO) 5-10 W for 3-5 min, 52 W/cm ² (5 W) and 104 W/cm ² (10 W) The fiber at 4 mm from the skin, spot size: 3.5 mm in diameter	Quick temperature, often above elevation 140°F	[101] [97] [99] [123]
PHT cancerology	Dissolved in DMEM at concentrations of 50, 150, 250, 350, 500 μ L	Murine melanoma cell line B16F10		600 – 1600	Linear polarized infrared device (600 – 1600 nm) with energy output of 5W, Super Lizer™ model PX (SL, IKEN, Tokyo, Japan) 3 min, 3cm from the targeted surface, 0.33 W/m ² energy dose 549.4 J/m ²	-	[124] [125]
PHT cancerology	Aqueous solution (2-4 mg/kg body weight)	-	Human (3 patients)- AIDS-associated Kaposi's sarcoma	805	Beam diameter 2 cm, Opto Power, Tucson, AZ, USA, 0.5 to 5 W/cm ² , total dose 100 J/cm ²	T increases of 12.1 \pm 4.4 °C	[94]
PHT cancerology	25 mg/mL sterile water	-	27 dutch cross rabbits implanted by green amelanotic hamster melanoma	810	Slit-lamp delivered diode laser (Microlase ; Keeler Instruments, Broomall, PA) 500 μ m spot size - 0.2 s - 1100 mW through a contact lens (Fundus Laser Lens; Ocular Instruments, Inc. Bellevue, WA). Average of 513 spots per tumor during 105 s.	-	[111]
PHT cancerology	i) i.v. bolus injection (1 mg/kg) in rats ii) <i>in vitro</i> surface painting or local submucosal injection of a 0.1% solution (0.1 mL)	-	i) wistar rats ii) fresh resection samples of normal and malignant human gastric and colonic mucosa obtained with consent from 8 patients undergoing colorectal resection and 6 patients undergoing gastric resection	805	Diomed 25 semiconductor diode laser (Diomed, Cambridge, UK) 1-25 W 600 micron flexible bare quartz fibre with a constant fibre-tissue distance of 1 cm i) 20W 5 s (100 J) ii) 25 W 5 s (125 J)	-	[126]

(Table 2) contd....

Type of Treatment	ICG	In Vitro	In Vivo	λ_{ex} (nm)	Light	Temperature	Refs.
ICG FOR TARGETED PHT							
TARGETED PHT + PDT cancerology	Au- PSMA- ICG-anti VEGF antibodies nanorods and Au- PSMA- ICG	A549	-	808	Continuous-wave diode laser with a wavelength of 808 nm (output power : 22.5 W/cm ² , 1 mm ² laser beam spot area) 30 s to 3 min	Singlet oxygen $\Phi_{O_2} = 0.11$ (ICG) $\Phi_{O_2} = 0.16$ (ICG-nano) Sensor green Toluidine blue O (for Φ_{O_2}) T increases	[130]
TARGETED PHT +PDT cancerology	Adsorbed on Au nanoparticles coupled with anti EGFR antibody Solution	A549	-	808	Laser (FSL-808-450MS-FS, Enwave Optronics Inc.), 22.5 W/cm ² , 30 s to 3 min, 1mm ²	Singlet oxygen $\Phi_{O_2} = 0.11$ (ICG) $\Phi_{O_2} = 0.16$ (ICG-nano) Sensor green Toluidine blue O (for Φ_{O_2}) T increases	[115] [130]
TARGETED PHT cancerology	ICG-PL-PEG nanoparticle coupled toFA, or mAb	U87 MCF-7 EMT6 cells	-	808	Laser 1.25 W/cm ² 0.75 to 3.25 W for 5 min	T increases depending on [ICG] : up to 20°C	[127]
TARGETED PHT cancerology	Encapsulated into PLGA conjugated with RGD-4C or FA or R11 peptide	HDF (for cyto-compatibility studies) PC3 for uptake	-	808	Continuous wave laser (Cow Coherent Inc., Santa Clara, CA) 2.26 mm ² , 0.8 W; 5 min	Increase T : 8 to 10 °C	[132]
ICG FOR PHT COUPLED CHEMOTHERAPY							
PDT +Chemotherapy	ICG +Doxorubicin (DOX)	A DOX resistant ovarian epithelial adenocarcinoma cell line (SKOV-3)	-	808	A NIR Laser Module source (RLDH808 1200-5, Roithner Lase- rthchnik Gmbh, Vienna, Austria) emitting at 808 nm with an out- put power of 1 W 1 min	-	[116]
ICG FOR PHT COUPLED IMMUNOTHERAPY							
PHT + Immunotherapy	i.v. injection +local application of topical imiquimod	-	11 patients (7 men, 4 women from 46 to 87 years)	805	NIR laser	-	[134]

a human gingival epithelial cell line HepG in relation to ICG dose and exposure time. They measured the effects of ICG and 810 nm diode laser light (0-0.5 W output settings, 0-5 s) on bacteria. They found rapid and significant uptake of ICG into *P. gingivalis* 381 and *A. actinomycetemcomitans* 67 compared to *E. Coli* DH5alpha and HepG gingival cells and suggested a reduction of bacterial load in periodontal pockets. The authors affirmed that it is not clear how ICG kills bacteria. It is possible that several different mechanisms exist. Indeed, and as expected, they noticed that at high flux levels bacterial pellets heated up significantly if ICG was present, while there was no apparent temperature increase in irradiated pellets in the absence of ICG (laser 80-400 W/cm²,

1-5 s). At low flux levels, no temperature increase was observed, but significant bacterial killing still took place. Therefore it is reasonable to think that at low flux levels phototoxicity may result in killing whereas at a high level of flux, thermal effects dominate killing. This was not proven in the paper. Further studies should test whether ICG in conjunction with low level laser treatment has significant clinical effects on the biofilm environment of human periodontal pockets.

3.2.2. Dermatology (Acne)

Acne vulgaris is one of the most prevalent skin diseases known [63]. Conventional treatments for acne tend to be

inconvenient and are associated with side-effects, which has prompted a search for more acceptable therapies. [64] Acne often improves after exposure to sunlight, and this observation led to the development of laser and other light therapies [65,66]. Studies were undertaken and clinical trials carried out [63,67-70]. Lasers are now established options in the armament to treat acne [68].

Kim *et al.*, [71] used ICG and a diode laser for acne treatment of Asian subjects. An analysis was performed of 16 randomly chosen Korean patients with acne vulgaris treated by PDT for a mean follow up of 2 months. Volunteers were divided into two groups, a single- and multiple-treatment group, in which photodynamic therapy was repeated three times with 1-week intervals. PDT using ICG dye with a diode laser was effective for acne treatment of Korean subjects. However, multiple treatments were not superior to single treatments in controlling acne lesions.

Jang *et al.*, [72] compared the safety and efficacy of PDT using ICG and PDT and tested indol-3-acetic acid (IAA) in the treatment of mild to moderate acne vulgaris. In this prospective, a single-blind clinical trial concerned 34 patients. These were treated with IAA with green light (520 nm) on half of the face and with ICG with NIR radiation (805 nm) on the other half. The procedure was carried out five times at 1-week intervals. Both PDT with ICG and PDT with IAA are safe and effective for the treatment of mild to moderate acne vulgaris. Likewise, Nouri *et al.*, [67] demonstrated that ICG-PDT has fewer adverse effects than aminolevulinic acid-PDT.

Kim *et al.*, [73] used pin-point PDT with ICG, a pyramidal-shaped tip and a fine fiber which have been used for the targeting of veins in the treatment of thyroid nodules. The term 'skin pore' usually applies to the visible topographic features at the skin surface, corresponding to the enlarged openings of Pilosebaceous follicles. Five 22-26 year old individuals with Fitzpatrick skin types IV-V were treated. This therapeutic trial illustrated that selective PDT with ICG using an optic fiber is safe and can be useful for the improvement of enlarged pores. Nevertheless, this study did not give quantitative evaluations of pore size or sebum excretion reduction. Moreover, it was not clear whether a real PDT effect was observed, or a photothermal effect. Further investigations are warranted.

3.2.3. Dermatology (Other than Acne)

Telangiectatic and reticular leg veins are a common problem, affecting about 40-50% of adults. Age, chronic venous insufficiency, intake of hormones, pregnancy, genetic disposition, and occupation are among the most important risk factors [74]. Different authors have evaluated the efficacy of ICG-mediated diode laser treatment of blood vessels. Several *in vivo* studies have been carried out. Laser treatment (805 nm; 106 kW/cm²; 3.2 J/cm²; 3 ms), of blood vessels directly after i.v. application of ICG (0, 2, or 4 mg/kg body weight) was investigated in the skinfold chamber model by Babilas, *et al.*, [75]. Male Syrian Golden hamsters of 30-40 g body weight were used. Vessel diameters were measured using intravital fluorescence microscopy up to 24 hours following irradiation. Histology was analyzed 1 or 24 hours after irradiation. The reduction of blood vessel perfusion was

proportional to ICG-concentration and pulse duration. ICG-mediated laser irradiation induces irreversible photocoagulation of blood vessels of all diameters in this model.

In 2012, Klein *et al.*, [74] carried out a randomized controlled proof of concept trial. The safety and efficacy of ICG-augmented diode laser therapy (808 nm) was evaluated for the treatment of telangiectatic leg veins. ICG (2 mg/kg body weight) was intravenously administered in 15 female patients (skin type II to III) with telangiectatic leg veins (0.25 to 3.0 mm of diameter). Immediately after ICG injection, diode laser pulses of different radiant exposures (50 - 110 J/cm²) were applied as a single treatment. Safety and efficacy were assessed 1 and 3 months after treatment, by a blinded investigator and the patient. Treatments with the pulsed dye laser (PDL) and the diode laser without ICG served as reference therapies. The safety of ICG application and diode laser treatment were excellent in all patients with no persisting side effects. ICG-augmented diode laser therapy has proved to be a safe and effective treatment option for telangiectatic leg veins. In this case, it is a pure thermal action.

3.2.4. Ophthalmology

Since its peak absorption matches the emission wavelength of medical diode lasers, ICG is also used for the selective destruction of blood vessels. To evaluate the potential of PDT using ICG for occlusion of choroidal neovascularization, Costa *et al.*, [76] studied efficiency and collateral damage of photodynamic therapy-induced photothrombosis on the rabbit choriocapillary layer. Fundus photography, fluorescein angiography, and light and transmission electron microscopy were used to study efficiency of PDT-induced photothrombosis using ICG as the PS, and to assess the resultant collateral damages. The delivery system consisted of a modified infrared diode laser tuned to 810 nm, near the maximum absorption peak of ICG. Choriocapillary occlusion was achieved at ICG doses of 10 and 20 mg/kg with a radiant as low as 6.3 J/cm². When PDT was performed with ICG doses of 10 mg/kg, damage to the neural retina was minimal. Only inner photoreceptor segments showed degeneration, probably secondary to choroidal ischemia. The Bruch membrane remained intact and the retinal pigment epithelium was invariably damaged. Temporary occlusion of large choroidal vessels occurred at both dye doses. However, due to the High ICG concentration (20 mg/kg), the light dose 6.3 J/cm² could be enough to induce a thermal action.

Sato *et al.*, [77] investigated the phototoxicity of persistent ICG under continuous visible light illumination on QNR/K2 cells (cultured quail Müller cells). ICG exposure followed by illumination induced severe morphologic changes in cells, significant cell death and increase of apoptosis compared to ICG or illumination alone or with no exposure. Blocking peak absorbance wavelengths of ICG prevented photodynamic cytotoxicity of persistent ICG under continuous visible light illumination *in vitro*.

3.2.5. Macular Surgery

Kernt *et al.*, [78] investigated the effects of ICG on light-induced senescence of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells. Primary human RPE cells were pre-incubated with 0.005%, 0.05% or zero ICG and then exposed to white light.

After 10 min of irradiation, the induction of ROS and senescence-associated β -galactosidase activity (SA β -Gal) were determined. Expression and secretion of matrix metalloproteinases 1 and 3 and their mRNA were determined by RT-PCR and ELISA. Light exposure decreased RPE cell viability by 46%. Treatment with 0.005% and 0.05% ICG alone decreased RPE cell viability by 7% and 21% respectively. In addition, expression of ROS, SA β -Gal, and MMP-1 and 3 were significantly increased. When 0.005% and 0.05% ICG treatments were combined with light exposure, viability decreased by 69% and 82% compared to the untreated control. Effects on the expression of ROS, SA β -Gal, and MMP-1 and 3 were significantly increased when cells were pre-incubated with ICG and then illuminated, depending on the ICG dose. In conclusion, pretreatment with ICG significantly increased light-induced oxidative stress and senescence. This might indicate a potential, supplementary mechanism that could explain RPE alterations and reduced functional results after ICG-assisted internal limiting membrane peeling.

Sippy *et al.* [79] evaluated the potential toxic effects of ICG and endoillumination, alone or in combination, on cultured human RPE cells that were exposed to balanced saline solution. RPE cells exposed to ICG showed no histologic or ultrastructural changes. Those exposed to ICG alone or ICG plus light demonstrated a significant decrease in mitochondrial enzyme activity ($P = 0.0002$ and 0.005 , respectively). Brief exposure of cultured human RPE cells to ICG resulted in decreased mitochondrial enzyme activity but did not appear to influence cellular morphology or ultrastructure.

3.2.6. Cancer Treatment

3.2.6.1. Actinic Keratosis

PDT is increasingly recognized as an alternative treatment for superficial cancer. An actinic keratosis, also known as a solar keratosis, is a scaly or crusty growth lesion. It most often appears on the areas of the body frequently exposed to the sun. Many *in vitro* studies have been undertaken and will be developed in this section. Fickweiler *et al.*, [80] examined dose dependent phototoxic effects of ICG *in vitro* on HaCaT keratinocytes. Keratinocytes were incubated with 0-50 μ M ICG for 24 h and irradiated by a diode laser (805 nm) with different energy densities (0, 12, 24, 48 J/cm²). All ICG concentrations higher than 5 μ M in combination with irradiation yielded a cell killing effect that depended significantly on ICG concentration and light dose. Cell viability for dark control and cells incubated with 50 μ M ICG and irradiated with 48 J/cm² was 0.82 ± 0.15 and 0.07 ± 0.02 , respectively. Sodium azide, a quencher of ROS, significantly inhibited the cell killing. Thus irradiation of ICG might induce a photodynamic reaction. Likewise, ICG-mediated phototherapy was investigated *in vitro* in four different cell lines derived from human skin (SCL1 and SCL2 squamous cell carcinoma, HaCaT keratinocytes and N1 fibroblasts). After irradiation with a cw-diode laser (805 nm, 80 mW/cm²) at doses of 24 or 48 J/cm², for all cell lines ICG concentrations above 25 μ M produced a significant phototoxic effect. Electron microscopy (1h after ICG-mediated phototherapy) revealed cytoplasmic vesiculation, dilatation of the rough endoplasmic reticulum, the Golgi complex and the perinuclear cisternae and the beginning of chromatin condensation in the nucleus. The authors reported that these ultra-structural find-

ings are not consistent with a photothermal action of ICG-mediated phototherapy. Instead, Abels *et al.* [81] suggested photo-oxidation as a major cell-killing mechanism in their conditions of ICG concentration and light irradiation.

3.2.6.2. Melanoma

Mamoon *et al.*, [82] explored the efficiency of ICG as a PDT agent for human melanoma and its mechanistic role in the cell death pathway. They used human skin melanoma cells (Sk-Mel-28) incubated with ICG and exposed to a low power Ti: Sapphire laser at 788 nm (3.4 J/cm²). IR microspectroscopy was used as a rapid and sensitive assay to determine the mode and extent of cell death as a function of laser exposure. Fragmentation of DNA, protein conformation changes and increase of lipid content could be observed. Moreover, the authors showed caspase-mediated apoptosis through activation of the initiator caspases. The excitation of ICG evoked rapid multiple consequences that triggered apoptotic cells. They cited ¹O₂ formation but this has not been verified. To sum up, a pathway that seems to be redox-sensitive involves the release of cytochrome c from mitochondria to the cytosol, the activation of caspases, the inhibition of the NF-KB P65 subunit, the enhancement of DNA fragmentation and the induction of histone acetylation. ICG/PDT can efficiently and rapidly induce apoptosis in human melanoma cells and it can be considered as a new therapeutic approach for topical treatment of melanoma.

Urbanska *et al.*, [83] studied the cytotoxicity of ICG itself and the effect of photodynamic therapy by following the growth of human (SKMEL 188) and mouse (S91) melanoma cells. The surviving fraction of the irradiated ($\lambda = 830$ nm) vs non-irradiated cells, treated with the same dose of ICG (100 μ M), was significantly decreased. These results show that ICG is a very promising dye for PDT of melanomas.

3.2.6.3. Cervical Cancer

Skrivanova *et al.*, [84] evaluated ICG cytotoxicity in Hela cells, as well as the phototoxicity (830 nm excitation, 0, 24, 60, 99 J/cm², 360 mW). The maximum phototoxic effect of ICG was detected at an ICG concentration of 94 μ M and an energy of 99 J/cm² 24 h after irradiation. More interestingly, adding an oxidative agent, 20 μ M H₂O₂ statistically increased the phototoxicity of ICG. The authors attributed the results as supporting the theory of cell destruction by reactive oxidative species. However, the light dose used was very high and a thermal action could easily explain the destruction of these cells.

3.2.6.4. Colorectal Cancer

Bäumler *et al.*, [85] used HT-29 cell lines, incubated for 24 h with different concentrations of ICG, and excited at 805 nm (30 J/cm², 40 mW/cm²). They observed a decrease in survival. Using 100 μ M ICG and laser irradiation, they showed that sodium azide or histidine (quenchers of ¹O₂) reduced the cell killing significantly. In contrast, when using mannitol, a quencher of superoxide anion and hydroxyl radicals, cell killing was not inhibited.

3.2.6.5. Bone Cancer

Bone metastasis is a major cause of pain and disability. The spinal column is a common site of bone metastasis, seen in about 40% of patients with cancer. PDT with ICG was

evaluated by Funayama *et al.*, [86] on rat mammary adenocarcinoma cells and its therapeutic efficacy in a rat model of spinal metastasis was assessed. Three treatment groups existed: PDT with local injection of ICG, PDT with systemic injection of ICG and no treatment (control). PDT exerted an immediate and persistent phototoxic effect. Furthermore, PDT with local or systemic injection of ICG delayed the development of paralysis. This could be an effective local adjuvant treatment for spinal metastasis.

3.2.6.6. Breast Cancer

Bozkulak *et al.*, [87] studied the inhibitory growth effects of ICG-PDT on MDA-MB231 human breast cancer cells in a time course experiment. Cells were irradiated with a continuous wave diode laser ($\lambda = 809$ nm, 60 mW, 24 J/cm²). The results showed that ICG-PDT application (50 μ M ICG) exerted a photo-oxidative effect on MDA-MB231 breast cancer cells extremely rapidly (within 3 h). Relative cell viability was determined throughout a 48 h time course, and a consistent decrease was observed after ICG-PDT application.

Shafirstein *et al.*, [88] evaluated the potential benefit of using ICG/NIR laser therapy to regress superficial carcinoma with thermal injury. Two groups of A/J mice with subcutaneous mammary adenocarcinoma tumors (7-9 mm) were subjected to tail vein injection of ICG dye (4 mg/kg) or sterile saline and then irradiated with an 808 nm NIR laser. Histological evaluation of the subcutaneous tissue revealed minor thermal damage and necrosis in the saline/laser group and substantial damage (up to 100% necrosis) in the ICG/laser group. The ICG/laser-treated group showed a steady reduction in tumor volume compared to the saline/laser group. Thus, the vascular-targeted ICG-NIR laser thermal therapy appears to have potential for treating superficial tumors.

3.2.6.7. Oral Cancer (Oral Squamous Cell Carcinoma)

Lim *et al.*, [89] evaluated the efficiency of ICG-PDT against oral cancer. Different ICG concentrations, laser wavelengths, irradiation interval times after administering ICG, and the duration after PDT on KB cells (oral squamous cell carcinoma) were studied. The IC₅₀ value was 10 μ M when the irradiation value was 785 nm, which was very low compared to 630 nm and 895 nm. The values were not very different with varying irradiation interval times. The percentage of apoptotic cells increased gradually to 84% at 6 h after 20 μ M ICG-PDT treatment and the percentage of necrotic cells rose dramatically to 65% at 3 h after administration of 200 μ M ICG-PDT. Using ICG-PDT with 785nm LED light, the LED is regarded as a satisfying light source since cancer treatments in the oral region do not require focusing and increased depth of penetration due to longer wavelength enhances treatment effectiveness.

3.2.6.8. Leukemia

Leukemia of the blood or bone marrow is usually characterized by an abnormal proliferation of white blood cells. Varriale *et al.*, [90] evaluated the effects of an IR diode laser source emitting at 805 nm on a human leukaemic cell strain (U937) from a histiocytic lymphoma pre-loaded with ICG. The first aim of this work was to assess the earliest cellular defense events occurring upon ICG photosensitization. To this end, photosensitization was performed at low ICG con-

centration and low light energy density. The second aim was a comparative evaluation of the effects of continuous or fragmented irradiation. Independent of the irradiation method employed (continuous or fragmented), the authors demonstrated that cells are forced to apoptosis and not to necrosis and that the mechanism by which the process is triggered requires Caspase-3 activation. Indeed the only perceptible change in the expression of pro/apoptotic proteins produced by continuous photostimulation was a small, albeit reproducible, increase in Bax. In contrast, when photostimulation was achieved by means of several consecutive pulses, not only a remarkable increase in Bax was observed, but also a noticeable abatement in Bcl-XL expression. The potential involvement of ¹O₂ in this process has been directly demonstrated by ICG photo-mediated oxidation of dithiothreitol in water. It has also been demonstrated that this oxidation is apparently more efficient when ICG is photostimulated by light pulses. Furthermore, Barth *et al.*, [91] recently developed nontoxic and non-aggregating calcium phosphosilicate nanoparticles (CPSNPs) encapsulating the near-infrared fluorophore ICG for diagnostic imaging and drug delivery as well as for PDT. First studies revealed that specific targeting of CPSNPs allowed for enhanced accumulation within breast tumors *via* CD71 targeting, or pancreatic cancer tumors *via* gastrin receptor targeting. ICG loaded CPSNPs were evaluated as photosensitizers for PDT of leukemia. Using a novel bioconjugation approach to specifically target CD117 or CD96, surface features enhanced on leukemia stem cells, *in vitro* ICG-CPSNP PDT of a murine leukemia cell line and human leukemia samples were dramatically improved. Furthermore, the *in vivo* efficacy of PDT was dramatically enhanced in a murine leukemia model by using CD 117-targeted ICG-CPSNPs that resulted in 29% disease-free survival. This result suggests that leukemia-targeted ICG loaded CPSNPs offer the promise of an effective treatment for relapsing and multidrug-resistant leukemia and could improve the life of leukemia patients.

3.2.6.9. Pancreas

Tseng *et al.*, [92] determined the cytotoxicity of ICG-PDT in human pancreatic cancer. MIA PaCa-2, PANC-1 and BxPc-3 pancreatic cells were incubated for one hour with 0 to 50 μ g/L ICG, serially washed to remove unbound dye, and then briefly exposed to infrared light from a diode laser at 0.45 W. MTT cell viability assays were performed at 72 hours post-treatment. Toxicity to ICG or infrared laser alone was not observed in any of the cell lines. Cell viability assays showed an ICG dose dependent ablation when combined with laser exposure. In all 3 cancerous cell lines, significant growth inhibition was seen at 10 μ g/mL ICG under irradiation with nearly total abrogation at 20 μ g/mL ICG. ICG-PDT induces consistent and dramatic pancreatic cell death. Since neither ICG nor laser alone caused toxicity, combination therapy may offer effective control of tumor growth with minimal side effects in patients with unresectable primary or metastatic pancreatic cancer.

3.2.6.10. Kaposi's Sarcoma

The promising experimental findings with ICG led to first clinical results in treating Kaposi's sarcomas (KS) [93]. KS is the most common malignancy observed in patients infected with HIV (AIDS). It is a solid tumor consist-

ing of cells of endothelial and fibroblast origin. In the study of Abels *et al.*, [94] ICG was used as a photosensitizer in combination with a diode laser to treat AIDS-associated KS in 3 patients. Three homosexual men, aged 33, 34 and 67 years with AIDS-associated, biopsy-proven KS were treated. 57 plaque-type KS lesions were treated in several sessions. The ICG dosage varied from 2 to 4 mg/kg given in two applications within 30 min and irradiation was from 0.5 to 5 W/cm² (805 nm). The report showed that AIDS-associated KS can be selectively sensitized and effectively treated using i.v. administered ICG excited at 805 nm. No prolonged cutaneous photosensitivity was observed. Tolerability was very good. Excellent cosmetic results were observed.

3.2.6.11. Gastric Cancer

The objective of the study of Kawaguchi *et al.*, [95] was to assess retrospectively the clinical usefulness of diode laser irradiation for early gastric cancer. The subjects were 13 patients (14 lesions) selected from 125 patients with early gastric cancer who were treated by endoscopy during the period from September 1995 to February 2003. After injection with ICG solution (1 mg/mL) into the submucosal layer, a semiconductive diode laser (30-40 W/s) was used to irradiate by the non-contacting method. There was no major complication. In the period up to December 2007, six patients survived and seven died. However, no-one died of progression of gastric cancer. The mean survival times of all patients, survivors and patients who died were 5 years 2.8 months 6 years 4.5 months and 4 years 11.7 months, respectively. Early gastric cancer can be successfully treated by laser therapy with few complications and good prognosis. This method is expected to be most suitable and effective for elderly patients with serious underlying disease. According to the authors, ICG might present a promising photosensitizer for PDT and first clinical results confirm these findings. However, the total energy applied on tissue was not reported and a thermal action could also easily explain the results.

3.3. ICG for PDT Coupled to Others Therapies

3.3.1. ICG-PDT Associated with Immunotherapy

A new method for treating metastatic tumors which uses a combination of a NIR laser, ICG and an immunoadjuvant (Chitin) has been developed by Chen *et al.*, [96]. Chitosan, a derivative of chitin, has shown the ability to stimulate immune responses in animals. A water-soluble, viscous form of a chitosan derivative, glycosylated chitosan (GC), has been synthesized using chitosan and galactose [96]. In the treatment of metastatic mammary tumors in rats using laser immunotherapy, GC has significantly enhanced the effects of the photothermal interaction by an 805 nm laser and ICG. With the use of GC, the noncurative laser-ICG combination was able to successfully eradicate primary tumors and control untreated metastases at remote sites [97,98]. It also helped induce a long-term tumor resistance in the successfully treated rats [96]. The treatment using GC induced a tumor-specific immune response at both cellular and molecular levels [98], which has been shown to be able to adoptively transfer to untreated naive rats [99]. The laser and the light-absorbing dye provided a selective photothermal interaction [100-103], which lead to direct tumor cell destruction. It is also believed to serve as the precursor for host immune re-

sponses by exposing tumor antigens. The function of GC in combination with laser treatment is thought to stimulate the host immune system and to enhance a direct attack mounted by it, with the help of the exposed antigens, against the remaining tumor cells as well as distant metastases. [104] In the study of Chen *et al.* [104], laser immunotherapy was extended in two directions. First, different immunoadjuvants were selected as the immune stimulants to test the principles of the laser immunotherapy. Specifically, complete Freund adjuvant, incomplete Freund adjuvant and *Corynebacterium parvum* were used in combination with selective photothermal interaction in the treatment of metastatic mammary tumors in rats. Second, PDT was selected as the mechanism of direct tumor destruction (805 nm excitation). Combined with PDT, in the treatment of tumors in mice, GC was administered peritumorally immediately after laser irradiation. The survival of treated animals was compared with that of untreated control animals. GC resulted in a 29% long-term survival. In the treatment of EMT6 mammary sarcoma in mice, GC of 0.5% and 1.5% concentrations increased the cure rates of Photofrin-based PDT treatment from 38% to 63% and 75%, respectively. In the treatment of Line 1 lung adenocarcinoma in mice, a 1.67% GC solution enabled a noncurative *m*THPC-based PDT to cure 37% of the tumor-bearing mice. The experimental results showed that a combination of immunological stimulation and active tumor destruction could enhance the treatment of metastatic tumors. Furthermore, the chitosan derivative has been shown to be effective in inducing an antitumor immune response. The curative effects of laser immunotherapy using different immunoadjuvants and different direct tumor destruction mechanisms strongly support its hypothesized tandem effect in cancer treatment. These morphological findings suggest that both cell-mediated and humoral immune responses could be responsible for the observed tumor eradication and induced long-term tumor resistance.

3.3.2. ICG-PDT Associated with Radiotherapy

Many studies indicated that some radiation resistant tumor cells are sensitive to PDT and some PDT resistant tumor cells are more sensitive to ionizing radiation [105,106]. In the study of Colasanti *et al.*, [107], human prostate cancer cells were evaluated for growth after photodynamic therapy, radiotherapy, and combined treatment. ICG was tested as a photosensitizer and radiosensitizer. Two human cell lines were used: PC-3 derived from prostate carcinoma, and EPN derived from normal prostate tissue. The light source used for the photoactivation experiments was a diode laser that peaked at 805 nm. The light dose incident on cells was 108 J/cm². Ionizing radiation was produced by a linear accelerator, and the dose was 2, 4 and 6 Gy. Cytotoxicity was evaluated by measuring the colony forming ability of cells. The results show that ICG induces cell death by photoactivation, but it does not act as a radiosensitizer if used with ionizing radiation. Another study of Montazerabadi *et al.*, [108] was undertaken to evaluate the effects of ICG as a sensitizer of both photodynamic and radiation therapy on the MCF-7 human breast cancer cell line. Cells were incubated with ICG at different concentrations for 24 h and were then exposed in independent treatment groups to a non-coherent light at different fluence rates and X-ray ionizing radiation at different dose rates. Combination effects of this chemo, photo, and

radiotherapy were evaluated. The results showed that ICG had no significant cytotoxic effects up to 100 μ M but as a photosensitizer had a strong cytotoxic effect on cancer cells. As already proved, ICG did not act as a radiosensitizer. It was interesting to find that 50 μ M of ICG in combination with light at 60 J/cm² and 4 Gy of X-ray radiation killed cancer cells, reducing the percentage of viable cancer cells. According to the findings, the combined treatment of photodynamic therapy and radiotherapy produces an additive effect which does not depend on the sequence of the two treatments. Combined treatments could be more useful since they allow the reduction of the ionizing radiation dose to obtain the same effect as one obtainable by radiotherapy alone [107] and it appears that the adverse effects of PDT can be partially abated without reducing the efficacy of treatment [108].

3.3.3. ICG-PDT Associated with Chemotherapy

PDT can be safely combined with already established treatment options such as chemotherapy. Crescenzi *et al.*, [109] have evaluated whether treatment with ICG-PDT combined with low-dose chemotherapy on breast cancer cells results in an effective outcome (additive or even synergistic) so that the dose of the two chemotherapy components or at least of the most toxic one (i.e., cisplatin) can be reduced. Photodynamic treatment was administered by irradiating ICG-preloaded MCF-7 cells with an IR diode laser source at 805 nm; cisplatin was used for chemotherapy. Viability and metabolic data demonstrated mutual reinforcement of therapeutic efficacy. Photodynamic treatment caused transient selective destruction of Bcl-2 and up-regulation of Bax. It also induced apoptosis in a limited fraction of cells (10-12%). Flow cytometry data showed that PDT killed mostly G1-phase cells, whereas cisplatin killed mostly S-phase cells. This disjointed phase-related effect may account for the favorable effects exerted by combined treatment. These findings imply that low doses of cytostatic drugs may be as effective, or even more effective, as classical chemotherapy. Obviously, this new therapeutic avenue is worth further investigation and should be tested in *in vivo* models with the aim of being applied to human therapy.

3.3.4. ICG-PDT Associated with Ultrasound

Nomikou *et al.*, [110] studied the effects of ICG with NIR radiation (830 nm), ultrasound or a combination of both stimuli. *In vitro* experiments were performed on RIF-1 mouse tumor cell lines and *in vivo* in syngeneic mice with RIF-1 tumors. They could observe a synergic effect upon the combination of the two treatments with low doses of ultrasound. Microscopic examination of cell populations treated with light or ultrasound demonstrated the production of intracellular ROS with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DHFA) which generates cell-associated fluorescence in the presence of ROS. Using a mouse tumour model treatment by PDT, ultrasound or ultrasound plus NIR led to respective decreases in tumor growth of 42, 67 and 98 % at day 27 post-treatment.

3.3.5. ICG-PDT Associated with Thermotherapy

The effectiveness of ICG-enhanced laser treatment of experimental ocular melanoma was investigated for the first

time in 1993 by Liggett's team [111]. ICG administration was used to enhance the photocoagulation effects of the infrared laser in green amelanotic hamster melanoma implanted in the iris of rabbits. The 14 tumors treated with ICG-enhanced laser at 810 nm showed no growth after treatment; 4 of them showed total necrosis whereas the remaining 10 tumors demonstrated only rare viable cells around blood vessels or at the tumor periphery. In comparison, laser treatment without ICG resulted in only superficial tumor necrosis and the 4 tumors continued to grow after treatment. The authors concluded that with further evaluation, ICG-enhanced laser treatment may be useful in the treatment of ocular melanoma.

Indeed, in 2003, De Potter *et al.*, [112] realized a prospective, randomized and controlled study in order to determine the effect of ICG injection on the regression pattern of choroidal melanomas treated by transpupillary thermotherapy (TTT). 25 patients with selected choroidal melanoma were treated by TTT using an 810 nm diode laser. Adjuvant ICG administration before each TTT did not seem to be beneficial in the regression pattern.

Two years later, Liggett *et al.*, [113] evaluated whether the combination of simultaneous hyperthermia by TTT and PDT with ICG was an effective treatment for small and medium choroidal melanomas. Combined simultaneous TTT and ICG-based PDT was called CSTIP. 25 patients were treated. After a mean of 2.4 treatments (range 1 to 5 treatments) all of the tumors but one showed a significant volume reduction without clinical evidence of recurrences, for a follow-up that ranged from 6 to 59 months. Compared to De Potter *et al.*'s study [112] that had shown that ICG before TTT did not seem to be beneficial in the tumor regression pattern, this study differs in several ways: the timing of the laser treatment following the injection of ICG, the difference in laser parameters used during the treatment and the interval between treatments. Liggett *et al.*, [113] believe that CSTIP is effective in the treatment of small and medium choroidal melanomas.

4. ICG FOR HYPERTHERMIA

4.1. What is Hyperthermia?

The application of hyperthermia to cancer therapy is not new. Because of technological advances, interest has been renewed and several methods are currently under study clinically [www.cancer.gov]. Hyperthermia can be an effective cancer treatment modality because tumor cells are more sensitive to temperature elevation than normal cells [114].

A temperature of 42°C is considered sufficiently lethal to cancer cells but not to normal cells, probably because of protein denaturation, and poor DNA synthesis and repair, due to the comparatively lower oxygen level and pH of cancer cells [115]. The effectiveness of hyperthermia treatment is related to the temperature achieved during the treatment, as well as the length of treatment and cell and tissue characteristics. Most normal tissues are not damaged during hyperthermia if the temperature remains under 44°C for less than 30 minutes. However, the heat dissipation by blood flow in tumors is slower than that in normal tissues, and thus the temperature of tumor rises higher than that in normal tissue during heating. To ensure that the desired temperature is reached, but

not exceeded, the temperature of the tumor and surrounding tissue is monitored throughout the hyperthermia treatment.

Hyperthermia can be cytotoxic for cancer cells due to the inhibition of oxidative metabolism causing lower cellular pH and may also promote cell death by mechanisms such as cell membrane and cytoskeleton damage, as well as enhanced apoptosis.

The thermal effect can be strongly increased when combined with other treatment modalities the acute photothermal tissue interaction is needed for large-scale tumor cell destruction so that the body's defense system can fight against a much weakened tumor base. More importantly, the photothermal interaction is needed to expose tumor antigens in order to stimulate together with the *in situ* immunoadjuvant the host immune system against the residual tumor cells that survived the initial thermal assault and against the local tumor invasions and to remote metastases [116]. Liu *et al.*, [116] investigated the selective photothermal effect by using gel phantom to simulate targeted tumor tissue and chicken breast tissue. The target gel was buried inside the chicken breast tissue and the tissue-gel construct was irradiated. The authors showed a selective heating with an 805 nm-diode laser of target gel containing 0.27% ICG and buried 1 cm below the chicken tissue surface. The target gel experienced a temperature increase of more than 6°C whereas the surrounding chicken breast tissue experienced only a minor temperature effect. Kuo *et al.*, [117] observed that the right eyes of 9 young adult New Zealand white rabbits underwent transscleral cyclothermotherapy (TCT) following ICG treatment. In an effort to decrease the energy necessary to achieve destruction using transscleral diode laser thermotherapy, they combined the treatment with ICG in albino rabbits and evaluated the results. As a consequence ICG pre-treatment reduced the energy necessary to cause a threshold lesion with TCT in non-pigmented rabbits.

4.2. ICG for Selective Photocoagulation

4.2.1. Acne

The application of ICG and high intensity diode laser irradiation for acne treatment was described as a promising approach based on selective photothermolysis of the sebaceous glands. A study of Lloyd *et al.*, [118] confirmed first the ability of ICG to penetrate into enlarged sebaceous glands. Then, they determined by laser-tissue interaction analysis the necessary parameters for the diode laser to effectively target the ICG loaded glands. In a last step, they determined whether selective destruction of the sebaceous glands could be achieved in patients that had active acne on their back and assessed the safety and efficacy of this novel treatment for acne. Histological examination of biopsy samples from the treated areas found selective necrosis of the sebaceous glands. Preliminary clinical results demonstrated a decrease in acne noted in the treatment area at 3, 6, and 10 months follow-up. Tuchin *et al.*, [119] demonstrated the efficacy of phototherapy in combination with topical application of ICG suggested for soft and thermal treatment of *acne vulgaris*. New technologies of soft and thermal acne lesions treatment were tested on 22 volunteers with facile or back-located acne. The observations during 1-2 months showed

that soft acne treatments decreased the number of active elements, reduced erythema and inflammation, as well as considerably improving the skin state, without any side effects. At high power densities (up to 200 W/cm²) ICG stained acne inflammatory elements were destroyed by light exposures of 0.5 seconds (803 nm). In conclusion, diode laser (803 or 839 nm) power densities in the range of 18 to 200 W/cm² provide a variety of economic and comfortable procedures of thermal destruction of ICG stained acne inflammatory elements as short light exposures (less than 0.5 seconds). Furthermore, Genina *et al.*, [120] carried out a clinical trial. For the thermotherapy of acne, the following laser parameters were used: λ_{exc} = 810 nm, 4 mm spot size, 50 ms pulse duration, 40 J/cm². NIR diode laser low-intensity (soft) phototherapy with the topical application of ICG has been suggested for treatment of *acne vulgaris*. 12 volunteers with acne lesions were enrolled in the experiment. Skin areas were 4*5cm² and were stained with ICG solution and irradiated at 803 nm at a power of 50 mW/cm² for 5 to 10 min. The authors showed that one month later, the treatment reduced inflammation and improved the state of the skin without any side effects. The results were more pronounced for patients with moderate to severe forms of acne. The improvement was about 80% for the group receiving multiple treatments. Single treatment did not have a prolonged effect.

4.2.2. Dermatology

For the treatment of vascular lesions, Babilas *et al.*, [75] used photothermolysis by laser (λ_{exc} = 805 nm; fluence rate: 106 kW/cm²; fluence: 3.2 J/cm²) of blood vessels directly after i.v. application of ICG of concentrations of 2 or 4 mg/kg body weight on male Syrian Golden Hamsters with titanium dorsal skinfold chambers. The reduction of blood vessel perfusion was proportional to the ICG-concentration and pulse duration; a 30 ms pulse duration (2 or 4 mg/kg b.w. ICG-concentration) was sufficient to induce a loss of perfusion even of blood vessels with a diameter less than 30 μ m. Histology revealed photocoagulation of blood vessels up to 24 hours. This study shows an alternative approach to improve the treatment of port-wine stains (PWS) currently treated by the flash-pumped pulsed dye laser (FPDL) with a wavelength of 585 nm using the endogenous chromophore hemoglobin and pulse duration of 0.45 ms. Although clinical results of FPDL treatment are excellent in many cases, about 20% of PWS are resistant to this treatment.

Bäumler *et al.*, [121] proposed to improve blood vessel coagulation by iv introduction of ICG. They determined the plasma clearance rate, systemic toxicity and histological effects of ICG-assisted laser therapy in an animal model (Pigs) close to human skin. No hepatic toxicity was observed. Histological evaluation and clinical examination revealed no adverse skin reactions at 24 or 72 h after laser irradiation. The combination of ICG and diode laser irradiation showed highly selective damage of vessels. In light of these results, the authors suggest that ICG-assisted laser therapy could safely improve the clinical outcome of port wine stain or leg vein treatment with minimal adverse reactions. As blood perfusion in the human blood vessel system should be somewhat different to pigs, the ICG concentration and

plasma clearance rate will need to be re-evaluated in humans.

4.2.3. Ophthalmology

Wolfe and Csaky [122], in an attempt to reduce concomitant damage to the retina with laser photocoagulation and improve treatment outcomes, explored ICG in conjunction with a 810 nm diode laser in feeder vessel treatment as Flower did in 2000. The theoretical advantage of such a method includes localizing damage to a narrower region of the choroid thereby reducing unwanted injury to nearby structures such as the neural retina. Moreover, case reports have described successful low irradiance ICG photofluorobiosis [76]; The retinal arterioles of adult Lewis or Brown Norway rats were treated with diode laser alone or immediately following intravenous injection with 75 mg/mL ICG. The use of ICG adjuvant achieved complete vessel closure in albino animals with reperfusion seen in all vessels by 7 days. Nevertheless, it is limited by clot resolution due to both excessive vascular damage and an accompanying inflammatory response. To have more durable feeder vessel closure rates the authors suggested to use simultaneously an anti-inflammatory therapy or to use a less vascular damaging photoactivating dye.

4.2.4. Cancerology

Chen *et al.*, [123] carried out many *in vivo* studies. In 1995, a semiconductor laser was used in the study of photothermal effect on tumor cells. The laser produced an emission of 808 nm with a maximum output of 35 W. Laser treatment of cadaveric tumor tissue was performed and histological observations were promising. Thermal damage clearly occurred within regions with higher concentration of ICG, whereas peripheral tissues were less affected. The tissue samples injected with ICG showed clear photocoagulation at the center of ICG injection. In 1996, murine mammary tumors were treated using ICG and an 808 nm diode laser, and the *in vivo* chromophore enhanced photothermal effects on the tumor burden and on tumor rat survival were investigated. The photothermal interaction was apparent under all the treatment conditions with a well-defined spatial containment in this study and the tumor growth was slowed after treatment. The post-treatment observation showed tumor recurrence and metastasis; no long-term survival was achieved with a single application of laser in conjunction with ICG [101]. These results arouse a question as to the efficacy of the photothermal interaction, even though tumor cell destruction can be achieved on a large and controlled scale. However, this highly selective photothermal impact on the tumor tissue suggests that the method could be applied repeatedly to increase effectiveness and may serve as the precursor of other modalities, such as chemotherapy, radiation therapy, immunotherapy, and surgery.

In two recent studies, Radzi *et al.*, [124,125] evaluated the optimal concentration of ICG and PHT post-irradiation time effects, by assessment of the cytotoxicity of the treatment on B16F10 murine melanoma. A concentration of 150 μ M was chosen. They found that PHT can suppress the proliferation of melanoma cells in a dose-dependant manner *in vitro*. The morphological changes that characterize apoptosis are mainly cell shrinkage and rounding. A short irradiation

time had an immediate effect on cell proliferation, and apoptotic and necrotic morphology were detected within 24 h. In addition, PHT requires a lower molar concentration of ICG and a lower light dose to achieve a significant reduction of cell viability and it enhanced the susceptibility of B16F10 cells to death.

The tissue effects of ICG potentiated 805 nm laser were assessed both *in vivo* using rat stomach and colon and *in vitro* using normal and neoplastic human gastric and colonic mucosa [126]. Intravenous ICG did not potentiate the 805 nm laser-tissue effects in *in vivo* studies. Local techniques of ICG applications (submucosal injection +/- surface painting of 0.1% ICG solution) enhanced the total depth and diameter of laser induced thermal injury in all *in vitro* studies. Without ICG, enhancement of thermal tissue injury was minimal in normal gastric and colonic mucosa. This may permit targeting of the effects with minimal collateral damage during endoscopic laser palliation of advanced gastrointestinal malignancy.

4.3. Targeted PHT

Applications of ICG remain limited by its concentration-dependent aggregation, poor aqueous stability, nonspecific binding to proteins and lack of target specificity [127]. To overcome these limitations, further studies have been carried out with targeted PHT.

According to Yu *et al.*, [128], ICG-containing nanoparticle-assembled capsules (NACs) are capable of heat generation in response to NIR laser irradiation and are stable for multiple photothermal heating cycles. Fibroblast cells exposed to these capsules remain viable after 2 days of incubation. Yu *et al.*, [129] also studied Self-Assembly Synthesis, Tumor Cell Targeting, and Photothermal Capabilities of Antibody-Coated (anti-epidermal growth factor receptor (anti-EGFR)) ICG Nanocapsules. They analyzed the specificity of tumor cell targeting using three carcinoma cell lines with different levels of EGFR expression and investigated the photothermal effects of ICG nanocapsules on EGFR-rich tumor cells. Significant thermal toxicity was observed for encapsulated ICG as compared to free ICG at 808 nm laser irradiation with radiant exposure of 6 W/cm². These results illustrate the ability to design a colloidal material with cell targeting and heat generating capabilities using noncovalent chemistry.

Kuo *et al.*, [115,130,131] present the first examples of targeted Au nanorods simultaneously serving not only as photodynamic and photothermal agents to destroy A549 malignant cells but also as optical contrast agents to monitor cellular imaging. Gold nanoparticles are extensively exploited in organisms especially in the PDT field because of their good stability and biocompatibility (for reviews, see [44-46]). Au nanorods with a cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) surfactant coating were successfully synthesized. To conjugate ICG on the surface, CTAB was coated on the nanorods with PSMA (poly(styrene-alt-maleic acid)) polymer and ICG in sequence *via* an electrostatic interaction (length 35 nm, width 9.3 nm). The authors also synthesized targeted gold nanoparticles coated *via* electrostatic interaction with positively charged polyethylenimine (PEI). They obtained three sizes of Au-PEI-ICG NPs: 13, 50

and 100 nm. Anti-EGFR antibodies were electrostatically bound. The combination of PDT and hyperthermia enhanced the effectiveness of photodestruction compared to PDT or hyperthermia alone on the A549 cell line. The authors estimated the $^1\text{O}_2$ quantum yield of about 0.11 and 0.16 for respectively free ICG and coupled-ICG. The nanorods generated more $^1\text{O}_2$ than ICG alone. The authors demonstrated that Au-PEI-ICG NPs were better able not only to kill cancer cells than ICG but showed an effective destructiveness as the volume of NPs became larger.

In one study of Kuo *et al.* [130], the human lung carcinoma malignant cell line (A549), which overexpresses EGFR on the cell surface, was used to study the hyperthermia and PDT effect of Gold-poly(styrene-*alt*-maleic acid)-ICG nanorods (Au-PSMA-ICG). For specifically targeted NIR photochemical destruction, anti-EGFR antibodies (AbEGFR) were conjugated with ICG, Au-PSMA nanorods, and Au-PSMA-ICG nanorods. The photodestruction of A549 cells treated with Au-PSMA-ICG nanorods was performed using a continuous-wave diode laser with an 808 nm wavelength. Furthermore, the concentration of antibody conjugated on Au-PSMA-ICG nanorods was explored. The amount of antibody on gold nanorods would be related to the efficiency of photodestruction effect. Au-PSMA-ICG nanorods seemed to improve the efficacy of PDT and photothermal reactions compared with ICG and Au-PSMA nanorod treatment alone. The Au-PSMA-ICG nanorods generated more singlet oxygen than ICG alone, suggesting that Au-PSMA-ICG nanorods exhibit greater PDT efficiency. Moreover, the NIR irradiation-induced temperature produced by an 808 nm NIR laser changed for Au-PSMA nanorods and Au-PSMA-ICG nanorods as a function of exposure time. Without nanorod treatment, the A549 cells showed no damage after laser exposure; however, the viability of the ICG-treated and Au-PSMA-ICG nanorod-treated A549 cells fell after 2 minutes of laser exposure. According to these data, there was indeed an additive effect in the therapeutic efficacy of Au-PSMA-ICG nanorods. The resulting Au-PSMA-ICG nanorods simultaneously served as PDT and hyperthermia agents. Combined PDT and hyperthermia killed cancer cells more efficiently than PDT or hyperthermia treatment alone.

Zheng *et al.*, [127] used a novel ICG-containing nanostructure based on the noncovalent self-assembly chemistry between phospholipid-polyethylene glycol (PL-PEG) and ICG. Two representative targeting molecules, folic acid and integrin $\text{Rv}\beta$ monoclonal antibody (mAb), were conjugated to the surface of the ICG-PL-PEG nanoprobe, displaying the diversity of ligand conjugation. The target specificity was confirmed using three cell lines with different levels of available folate receptors or integrin $\text{Rv}\beta$ expression *via* laser scanning confocal microscope and flow cytometry. This specific ICG-PL-PEG nanoprobe could be internalized into targeted cells *via* a ligand-receptor mediated endocytosis pathway. *In vitro* experiments showed that internalized ICG-PL-PEG could be used for cell imaging and selective photothermal cell destruction. Likewise, Patel *et al.*, [132] showed the potential of multifunctional biodegradable and biocompatible PLGA nanoparticles (246 nm diameter) loaded with ICG. Successful cellular uptake of ligand conjugated PLGA-ICG nanoparticles by PC3 prostate cancer cells was obtained. Both phantom-based and *in vitro* cell culture

demonstrated that the NPs had the great potential to induce local hyperthermia both in radius and depth, an increase of 8–10 °C observed in tissue within 5 mm. NPs were conjugated to RGD-4C peptides that are specific to $\text{E}\beta_3^+$ cells, folic acid or R11 peptides are cell-penetrating peptides specific to prostate cancer cells. R11 peptide exhibited the strongest ability of targeting prostate cancer as compared to RGD-4C and folic acid.

These results represent the first demonstration of the dual functionality of ICG-containing nanostructures for targeted optical imaging and photothermal or photodynamic therapy of cancerous cells. This novel type of nanostructure, when conjugated with other therapeutic and imaging agents, could become a multifunctional probe for cancer diagnosis and treatment [127]. Furthermore, combined PDT and hyperthermia can more efficiently extinguish cancer cells than PDT or hyperthermia treatment alone [130].

4.4. PHT and Chemotherapy

Tang et McGoron, [133] investigated the *in vitro* cytotoxic effect of combined chemotherapy and hyperthermia to a doxorubicin (DOX) resistant ovarian cancer cell line (SKOV-3). The effect of two different heating methods, ICG induced rapid rate heating and an incubator induced slow rate heating, were compared. All the experiments were conducted in 96-well plates. Cells were subjected to different concentrations of DOX and 60 min 43 °C incubation or 5 μM of ICG with 1 min 808 nm NIR laser. An SRB assay was used to measure cell proliferation. ICG itself without laser irradiation was not toxic to SKOV-3 cells. The two types of hyperthermia individually produced similar cytotoxicity. DOX by itself was toxic with an IC50 value of about 5 μM . Hyperthermia in combination with DOX achieved significantly greater cell killing/growth inhibition at all DOX concentrations compared to DOX alone. A subadditive cytotoxic effect was observed by combining DOX and 60 min 43 °C incubation which lead to a lowered DOX IC50 value of about 1 μM . This value was even lower with 1 min laser-ICG photothermotherapy (0.1 μM) and, though not statistically significant, a synergistic effect may exist between DOX and laser-ICG photothermotherapy. The rate of heating may have an effect on chemotherapy-hyperthermia interaction. In conclusion, the combination of photothermal therapy and chemotherapy may provide a valuable tool for cancer treatment with minimized side effect.

4.5. PHT + Immunotherapy

Li *et al.*, [134] reported the preliminary clinical outcomes of the first series of 11 patients with advanced melanoma treated with *in situ* photoimmunotherapy (ISPI). ISPI is a promising therapeutic method that combines local, selective photothermal therapy using ICG with immunological stimulation using imiquimod as the immunoadjuvant. Imiquimod is an FDA-approved prescription medication that acts as an immune response modifier. ISPI consists of 3 main components applied directly to the cutaneous metastases: 1) local application of topical imiquimod; 2) injection of ICG; and 3) an 805 nm laser for local irradiation. In this series, a complete response was observed in six patients. Eight patients had complete disappearance of tumor from the regional lymph

Table 3. Clinical trials with ICG as a photothermal or photodynamic photosensitizer.

Title	Start Date	Purpose	Study type	Study phase	Recruitment status	Status	Condition	Intervention	
Long Term Results of Combined Transpupillary Thermotherapy (TTT) Indocyanine Green (ICG) Based Photodynamic Therapy (PDT) in Choroidal Melanoma	January 2009	This is a report of combined Transpupillary thermotherapy (TTT) treatment with indocyanine green (ICG) in the control of small and medium sized choroidal melanomas	Obs.	-	Completed	No Results Available	Choroidal Melanoma	Procedure: TTT + ICG-based PDT	http://ClinicalTrials.gov/show/NCT01253759
Laser Assisted Treatment of Chronic Sinusitis With and Without Light Activated Agents	May 2009	The study aims to treat chronic rhinosinusitis with an alternative to antibiotics, thus sparing volunteers prolonged antibiotic use and possible side effects, not to mention the cost and development of antibiotic resistant bacteria.	Int.	-	unknown	No Results Available	Rhinosinusitis	Device: Laser + ICG Device: Laser only	http://ClinicalTrials.gov/show/NCT00948519
Lucentis as an Adjuvant Therapy With TTT-ICG Based in Choroidal Melanoma	September 2007	To report preliminary results on safety and tolerability of intravitreal injection of Ranibizumab (Lucentis) combined with TTT + ICG based photodynamic therapy (PDT) in the treatment of choroidal melanoma	Int.	Phase 3	Active, not recruiting	No Results Available	Choroidal Melanoma	Procedure: Ranibizumab injection and TTT - ICG based	http://ClinicalTrials.gov/show/NCT00680225
Treatment of Patients With Neovascular AMD Using Indocyanine Green-Mediated Photothrombosis (i-MP).	April 2007	To establish the safety and efficacy of ICG-mediated photothrombosis (i-MP) for the treatment of patients with neovascular age-related macular degeneration	Int.	Phase 2	Unknown	No Results Available	Maculopathy, Age-Related	Procedure: ICG-Mediated Photothrombosis	http://ClinicalTrials.gov/show/NCT00331253

Obs.: Observational
Int.: Interventional

phatic drainage area, which is defined as a complete local response (CLR). Furthermore, CLR was observed in the non-treatment site lesions in 4 patients. The probability of a 12-month overall survival was 70%.

CONCLUSIONS

This review summed up the studies that have been carried out using ICG as a chemical compound for treatment. Depending on the energy used, it seems that three different mechanisms can occur:

- Fluorescence is the primary effect at very low laser power (inferior to 10 mW/cm²) and ICG concentrations of 0.1 to 0.2 mg/kg body weight [88]. This was not the scope of the review.

- Phototoxicity *via* PDT was claimed for low power density of 5-10 W/cm² and exposure times of seconds or minutes [28,29,80]. Applying these low power densities in PDT there is hardly any detectable temperature increase in cells or tissue due to sufficient cooling *via* heat conduction. Therefore, it is rather unlikely that cells could suffer from thermal effects. Besides, other mechanisms could explain these results. For example [135], when cells are irradiated with visible and near-infrared wavelengths, in addition to the ability of photons to produce electronic excitation in chromophores, light induces a wave-like alternating electric field in a medium that is able to interact with polar structures and produce dipole transitions. These dipole transitions could explain the observed cell destruction.

The photodynamic effect of ICG has been explained by cell destruction due to the production of reactive oxygen species. Nevertheless, the mechanisms of actions are still not clear and even if some authors claimed that singlet oxygen is produced by an indirect method [71, 76, 81, 82, 101] the direct proof of singlet oxygen by the detection of its luminescence at 1270 nm failed.

- At high power density (Superior to 100W/cm²) and short pulse duration, in the ms range, the temperature in the target can reach high values during ms irradiation which can be used for selective photothermolysis. A thermal effect (hyperthermia or selective photocoagulation) seems to be the main mechanism inducing a therapeutic effect. With a conventional ICG dose (2 mg/kg), 3 to 4 minutes after injection, the absorption of the blood is increased 10 fold at 800 nm, leading to a very efficient thermal effect.

The question of whether ICG is or is not a good PS for PDT is still controversial. As we showed in this review, although some papers claim that ICG is active in PDT, others claim it is not particularly effective. The comparison between the different studies is not obvious because the parameters used such as ICG concentrations, light fluence, irradiance are different. Moreover, they are comparatively high compared with those used with well-known PS. It is then difficult to separate photochemical effects based on generation of ROS from the triplet state from photothermal effects arising from the excited singlet state. Anyway, research is still very active in discovering all the potential of ICG and currently, six pre- or clinical studies aim to prove the effectiveness of ICG (Table 3). Three studies use ICG as a photosensitizer in the treatment of choroidal melanoma. Clinical trials combine Transpupillary Thermo Therapy (TTT) to PDT using ICG with or without Ranibizumab. Another Phase I trial is conducted in patients with melanoma. This deals with the effects of imiquod combined with laser therapy with or without ICG in patients with melanoma of stage 3 or 4. Imiquod is well-known to boost the immune system and stop tumor growth. The study aims to determine the toxicity of photo immunotherapy and laser treatment with or without ICG. In this trial, they specifically propose that ICG is a photothermal sensitizer not a photodynamic sensitizer. A recent (2007), double-blind phase 2 study attempts to prove the efficacy and safety of ICG coupled with photo thrombolytic for the treatment of age-related macular degeneration. Another recent trial started in 2009 is conducted on the treatment of bacterial infections, particularly rhinosinusitis.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

LIST OF ABBREVIATIONS

32-D-p210-GFP = Murine cell line,

CML = Chronic Myeloid Leukemia

AML	= Acute Myeloid Leukemia
A549	= Human lung carcinoma malignant cell line
BxPc-3	= Pancreatic cell line
CRL1666	= Rat mammary adenocarcinoma
DHFA	= 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMBA-4	= Breast cancer cell line
DMEM	= Dulbecco's modified Eagle's medium
DPIBF	= 1,3-diphenylisobenzofuran
EMT6	= Epithelial mammary carcinoma cells
EPN	= Epithelial normal prostate tissue cells
FA	= Folic acid
H 2 DCFDA	= 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HaCaT	= Spontaneously immortalized human keratinocytes
HDF	= Human dermal fibroblast
HepG	= Human gingival epithelial cell line
HT-29	= Human colon carcinoma cell line
KB	= Oral squamous cell carcinoma
mAb	= Integrin $\alpha_3\beta_3$ monoclonal antibody
MCF-7	= Human breast cancer cells
MDA-MB231	= Breast cancer cell line
MIA PaCa-2	= Pancreatic cell line
N1 fibroblast	= Skin from a healthy donor
PANC-1	= Pancreatic cell line
PC-3	= Prostate carcinoma cells
S91	= Mouse melanoma cells
Sk-Mel-28	= Human skin melanoma
SKMEL 188	= Human melanoma cells
SCL1 and SCL2	= Derived from squamous cell carcinomas of the skin
P388-D1	= American Type Culture Collection [ATCC] CCL46)
PC3	= Prostate cancer cells
QNR/K2RPE	= Porcine retinal pigment endothelial cells
RIF-1	= Mouse fibrosarcoma cells
RPE	= Retinal pigment epithelium cells
SKOV-3	= DOX resistant ovarian epithelial adenocarcinoma cell line
U87	= Human glioblastoma cancer cells
U-937	= Human monocytic (histiocytic lymphoma, CRL 1593) cells
V79	= Chinese hamster

REFERENCES

Reference 136 and 137 are related articles recently published.

- [1] Fox, L.J.; Brooker, L.G.; Heseltine, D.W.; Essex, H.E.; Wood, E.H. A tricarboyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation. *Proc. Staff Meet Mayo Clin.*, **1957**, *32*(18), 478-484.
- [2] Fox, L.J.; Wood, E.H. Indocyanine green: physical and physiologic properties. *Proc. Staff Meet Mayo Clin.*, **1960**, *35*, 732-744.
- [3] Flower, R.W.; Hochheimer, B.F. Indocyanine green dye fluorescence and infrared absorption choroidal angiography performed simultaneously with fluorescein angiography. *Johns Hopkins Med. J.*, **1976**, *138*(2), 331-42.
- [4] Porri, G.; Giovannini, A.; Amato, G.; Ioni, A.; Pantanetti, M. Photodynamic therapy of circumscribed choroidal hemangioma. *Ophthalmology*, **2003**, *110*(4), 674-680.
- [5] Lundjohansen, P. The Dye Dilution Method for Measurement of Cardiac-Output. *Eur. Heart J.*, **1990**, *11*, 6-12.
- [6] Haller, M.; Akbulut, C.; Brechtelsbauer, H.; Fett, W.; Briegel, J.; Finsterer, U.; Peter, K. Determination of Plasma-Volume with Indocyanine Green in Man. *Life Sci.*, **1993**, *53*(21), 1597-1604.
- [7] Moneta, G.; Brülisauer, M.; Jäger, K.; Bollinger, A. Infrared fluorescence videomicroscopy of skin capillaries with indocyanine green. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, **1987**, *6*(1), 25-34.
- [8] Paumgartner, G. The handling of indocyanine green by the liver. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **1975**, *105*(17), 1130.
- [9] Motomura, K.; Inaji, H.; Komoike, Y.; Kasugai, T.; Noguchi, S.; Koyama, H. Sentinel node biopsy guided by indocyanine green dye in breast cancer patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **1999**, *29*(12), 604-607.
- [10] Hammond, D.C.; Lane, F.R.; Welk, R.A.; Madura, M.J.; Borreson, D.K.; Passinault, W.J. Endoscopic tattooing of the colon. An experimental study. *Am. Surg.*, **1989**, *55*(7), 457-461.
- [11] Desmettre, T.; Cohen, S.Y.; Devoisselle, J.M.; Gaudric, A. Intérêt et indications actuelles de l'angiographie au vert d'indocyanine (ICG). *J. Fr. Ophthalmol.*, **2011**, *34*(8), 568-582.
- [12] Grosenick, D.; Wabnitz, H.; Ebert, B. Recent advances in contrast-enhanced near infrared diffuse optical imaging of diseases using indocyanine green. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **2012**, *20*(1), 203-221.
- [13] Polom, K.; Murawa, D.; Rho, Y.; Nowaczyk, P.; Hünerbein, M.; Murawa, P. Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology. *Cancer*, **2011**, *117*(21), 4812-4822.
- [14] Schaafsma, B.E.; Mieog, J.S.D.; Hutteman, M.; Van der vorst, J.R.; Kuppen, P.J.K.; Löwik, C.W.G.M.; Frangioni, J.V.; Van de velde, C.J.H.; Vahneijer, A.L. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J. Surg. Oncol.*, **2011**, *104*(3), 323-332.
- [15] Santra, S.; Kaittanas, C.; Perez, J.M. Cytochrome C encapsulating theranostic nanoparticles: a novel bifunctional system for targeted delivery of therapeutic membrane-impermeable proteins to tumors and imaging of cancer therapy. *Mol. Pharm.*, **2010**, *7*(4), 1209-1222.
- [16] Kneipp, J.; Kneipp, H.; Rice, W.L.; Kneipp, K. Optical probes for biological applications based on surface-enhanced Raman scattering from indocyanine green on gold nanoparticles. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*(8), 2381-2385.
- [17] Withrow, K.P.; Gleysteen, J.P.; Safavy, A.; Skipper, J.; Desmond, R.A.; Zinn, K.; Rosenthal, E.L. Assessment of indocyanine green-labeled cetuximab to detect xenografted head and neck cancer cell lines. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2007**, *137*(5), 729-734.
- [18] Villaraza, A.J.L.; Milenic, D.E.; Brechbiel, M.W. Improved speciation characteristics of PEGylated indocyanine green-labeled Panitumumab: revisiting the solution and spectroscopic properties of a near-infrared emitting anti-HER1 antibody for optical imaging of cancer. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*(12), 2305-2312.
- [19] Nakajima, T.; Mitsunaga, M.; Bander, N.H.; Heston, W.D.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Targeted, Activatable, *In vivo* Fluorescence Imaging of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Positive Tumors Using the Quenched Humanized J591 Antibody-Indocyanine Green (ICG) Conjugate. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*(8), 1700-1705.
- [20] Jung, B.; Anvari, B. Synthesis and characterization of bovine serum albumin-coated nanocapsules loaded with indocyanine green as potential multifunctional nanoconstructs. *Biotechnol. Prog.*, **2012**, *28*(2), 533-539.
- [21] Steigerwalt, R.D.J.; Pascarella, A.; Arrico, L.; Librando, A.; Plateroti, R.; Plateroti, A.M.; Plateroti, P.; Nebbioso, M. Idiopathic juxtafoveal retinal telangiectasis and retinal macroaneurysm treated with indocyanine green dye-enhanced photocoagulation. *Panminerva Med.*, **2012**, *54*(1), 93-96.
- [22] Klein, A.; Buschmann, M.; Babilas, P.; Landthaler, M.; Bäuml, W. Indocyanine green-augmented diode laser therapy vs. long-pulsed Nd:YAG (1064 nm) laser treatment of telangiectatic leg veins: A randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.*, **2013**, *169*(2), 365-373.
- [23] Bäuml, W.; Paasch, U.; Klein, A.; Landthaler, M.; Friedman, R.; Shafirstein, G. Intravenous injection of indocyanine green to enhance laser-assisted coagulation of blood vessels in skin - an animal study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **2013**, *27*(2), 206-211.
- [24] Klein, A.; Szeimies, R.M.; Bäuml, W.; Zeman, F.; Schreml, S.; Hohenleutner, U.; Landthaler, M.; Koller, M.; Babilas, P. Indocyanine green-augmented diode laser treatment of port-wine stains: clinical and histological evidence for a new treatment option from a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.*, **2012**, *167*(2), 333-342.
- [25] Sadoqi, M.; Kumar, S.; Lau-Cam, C.; Saxena, V. In: *Biological and pharmaceutical nanomaterials*, 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, **2006**.
- [26] Reindl, S.; Penzkofer, A.; Gong, S.H.; Landthaler, M.; Szeimies, R.M.; Abels, C.; Bäuml, W. Quantum yield of triplet formation for indocyanine green. *J. Photochem. Photobiol.*, **1997**, *105*(1), 65-68.
- [27] Khosroshahi, M.E.; Nourbakhsh, M.S.; Saremi, S.; Tabatabaee, F. Characterization of skin tissue soldering using diode laser and indocyanine green: *in vitro* studies. *Lasers Med. Sci.*, **2010**, *25*(2), 207-212.
- [28] Saxena V.; Sadoqi M.; Shao J. Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.*, **2003**, *92*(10), 2090-2097.
- [29] Engel, E.; Schraml, R.; Maisch, T.; Kobuch, K.; König, B.; Szeimies, R.M.; Hillenkamp, J.; Bäuml, W.; Vasold, R. Light-induced decomposition of indocyanine green. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2008**, *49*(5), 1777-1783.
- [30] Cherrick, G.R.; Stein, S.W.; Leevy, C.M.; Davidson, C.S. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J. Clin. Invest.*, **1960**, *39*, 592-600.
- [31] Flock, S.T.; Jacques, S.L. Thermal damage of blood vessels in a rat skin-flap window chamber using indocyanine green and a pulsed alexandrite laser: A feasibility study. *Laser Med. Sci.*, **1993**, *8*(3), 185-196.
- [32] Hollins, B.; Noe, B.; Henderson, J.M. Fluorometric determination of indocyanine green in plasma. *Clin. Chem.*, **1987**, *33*(6), 765-768.
- [33] Mc Evoy, G. In: *AHFS Drug Information 1990*. Ed.: American Society of Health System Pharmacists: Bethesda, USA, **1990**, pp. 1311-1312.
- [34] Ott, P.; Keiding, S.; Johnsen, A.H.; Bass, L. Hepatic removal of two fractions of indocyanine green after bolus injection in anesthetized pigs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **1994**, *266*(6), 1108-1122.
- [35] Yaseen M. A.; Yu J.; Wong M. S.; Anvari B. Stability assessment of indocyanine green within dextran-coated mesocapsules by absorbance spectroscopy. *J. Biomed. Opt.*, **2007**, *12*(6), 064031.
- [36] Taichman, G.C.; Hendry, P.J.; Keon, W.J. The use of cardio-green for intraoperative visualization of the coronary circulation: evaluation of myocardial toxicity. *Tex. Heart Inst. J.*, **1987**, *14*(2), 133-138.
- [37] Hopeross, M.; Yannuzzi, L.; Gragoudas, E.; Guyer, D.; Slakter, J.; Sorenson, J.; Krupsky, S.; Orlock, D.; Puliafito, C. Adverse Reactions Due to Indocyanine Green. *Ophthalmology*, **1994**, *101*(3), 529-533.
- [38] Iriyama, A.; Uchida, S.; Yanagi, Y.; Tamaki, Y.; Inoue, Y.; Matsuura, K.; Kadonosono, K.; Araie, M. Effects of indocyanine green on retinal ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci.*, **2004**, *45*(3), 943-947.
- [39] Sharma, P.; Bengtsson, N.E.; Walter, G.A.; Sohn, H.B.; Zhou, G.; Iwakuma, N.; Zeng, H.; Grobmyer, S.R.; Scott, E.W.; Moudgil, B.M. Gadolinium-Doped Silica Nanoparticles Encapsulating Indocyanine Green for Near Infrared and Magnetic Resonance Imaging. *Small*, **2012**, *8*(18), 2856-2868.

- [40] Philip, R.; Penzkofer, A.; Bäuml, W.; Szeimies, R.M.; Abels, C. Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green. *J. Photochem. Photobiol.*, **1996**, *96*(1), 137-148.
- [41] Russin, T.J.; Altino lu, E.L.; Adair, J.H.; Eklund, P.C. Measuring the fluorescent quantum efficiency of indocyanine green encapsulated in nanocomposite particulates. *J. Phys. Condens. Matter*, **2010**, *22*(33), 334217.
- [42] Park, H.S.; Lee, J.E.; Cho, M.Y.; Hong, J.H.; Cho, S.H.; Lim, Y.T. Hyaluronic Acid/Poly (L-Amino Ester) Polymer Nanogels for Cancer-Cell-Specific NIR Fluorescence Switch. *Macromol. Rapid Commun.*, **2012**, *33*(18), 1549-1555.
- [43] Yaseen, M.A.; Yu, J.; Jung, B.; Wong, M.S.; Anvari, B. Biodistribution of encapsulated indocyanine green in healthy mice. *Mol. Pharm.*, **2009**, *6*(5), 1321-1332.
- [44] Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.*, **2008**, *26*(11), 612-621.
- [45] Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O. Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale*, **2010**, *2*(7), 1083.
- [46] Choukrat, R.; Seve, A.; Vanderesse, R.; Benachour, H.; Barberi-Heyob, M.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O.; Verelst, M.; Frochot, C. Non Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications: Recent Developments. *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*(6), 781-792.
- [47] Saxena, V.; Sadoqi, M.; Shao, J. Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green: biodistribution in healthy mice. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *308*(1), 200-204.
- [48] Saxena, V.; Sadoqi, M.; Shao, J. Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and *in vitro* release. *Int. J. Pharm.*, **2004**, *278*(2), 293-301.
- [49] Kim, T.H.; Mount, C.W.; Dulken, B.W.; Ramos, J.; Fu, C.J.; Khant, H.A.; Chiu, W.; Gombotz, W.R.; Pun, S.H. Filamentous, Mixed Micelles of Triblock Copolymers Enhance Tumor Localization of Indocyanine Green in a Murine Xenograft Model. *Mol. Pharm.*, **2011**, *9*(1), 135-143.
- [50] Kim, G.; Huang, S.W.; Day, K.C.; O'Donnell, M.; Agayan, R.R.; Day, M.A.; Kopelman, R.; Ashkenazi, S. Indocyanine-green-embedded PEBBLEs as a contrast agent for photoacoustic imaging. *J. Biomed. Opt.*, **2007**, *12*(4), 044020.
- [51] Nie, S.; Xing, Y.; Kim, G.J.; Simons, J.W. Nanotechnology applications in cancer. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, **2007**, *9*, 257-288.
- [52] Ustü, Y.; Tsukada, M.; Nakamura, H. Kinetics studies of photosensitized oxygenation by singlet oxygen in aqueous micellar solutions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1978**, *51*, 379-384.
- [53] Pernot, M.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M. In: *Advances in photodynamic therapy II* Hamblin M.; Huang Y. Y., In press.
- [54] Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, *64*, 24-36.
- [55] Ma, Y.; Sadoqi, M.; Shao, J. Biodistribution of indocyanine green-loaded nanoparticles with surface modifications of PEG and folic acid. *Int. J. Pharm.*, **2012**, *436*(1-2), 25-31.
- [56] Rungta, P.; Bandera, Y.P.; Roeder, R.D.; Li, Y.; Baldwin, W.S.; Sharma, D.; Sehorn, M.G.; Luzinov, I.; Foulger, S.H. Selective Imaging and Killing of Cancer Cells with Protein-Activated Near-Infrared Fluorescing Nanoparticles. *Macromol. Biosci.*, **2011**, *11*(7), 927-937.
- [57] Macdonald, I.J.; Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2001**, *5*(2), 105-129.
- [58] Weishaupt, K.R.; Gomer, C.J.; Dougherty, T.J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.*, **1976**, *36*(7), 2326-2329.
- [59] Omar, G.S.; Wilson, M.; Nair, S.P. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. *BMC Microbiol.*, **2008**, *8*(1), 111.
- [60] Topaloglu, N.; Yuksel, S.; Gulsoy, M. In: *Optimization of parameters in photodynamic therapy to kill P. aeruginosa with 809-nm diode laser and indocyanine green*, Proceedings of the SPIE 8210 Photonics West, BIOS Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXI, January 21-26, 2012; Kessel, D. H.; Hasan, T., San Fransisco, California, USA, **2013**.
- [61] Perti, S.; Pratten, J.; Wilson, M.; Piccirillo, C.; Parkin, I.P.; Prokopovich, P. Antimicrobial Properties of Light-activated Polyurethane Containing Indocyanine Green. *J. Biomater. Appl.*, **2011**, *25*(5), 387-400.
- [62] Boehm, T.K.; Ciancio, S.G. Diode laser activated indocyanine green selectively kills bacteria. *J. Int. Acad. Periodontol.*, **2011**, *13*(2), 58-63.
- [63] Nouri, K.; Villafradez-Diaz, L.M. Light/laser therapy in the treatment of acne vulgaris. *J. Cosmet. Dermatol.*, **2005**, *4*(4), 318-320.
- [64] Hamilton, F.L.; Car, J.; Lyons, C.; Car, M.; Layton, A.; Majeed, A. Laser and other light therapies for the treatment of acne vulgaris: systematic review. *Br. J. Dermatol.*, **2009**, *160*(6), 1273-1285.
- [65] Sigurdsson, V.; Knulst, A.C.; Vanweelden, H. Phototherapy of acne vulgaris with visible light. *Dermatology*, **1997**, *194*(3), 256-260.
- [66] Kjeldstad, B.; Johnsson, A. An action spectrum for blue and near ultraviolet in activation of Propionibacterium acnes; with emphasis on a possible porphyrin photosensitization. *Photochem. Photobiol.*, **1986**, *43*(1), 67-70.
- [67] Nouri, K.; Ballard, C.J. Lasers alleviate acne. *J. Cosmet. Dermatol.*, **2004**, *3*(3), 182-183.
- [68] Nouri, K.; Ballard, C.J. Laser therapy for acne. *Clin. Dermatol.*, **2006**, *24*(1), 26-32.
- [69] Taub, A.M.Y.F. Procedural treatments for acne vulgaris. *Dermatol. Surg.*, **2007**, *33*(9), 1005-1026.
- [70] Elsaie, M.L.; Choudhary, S. Photodynamic therapy in the management of acne: an update. *J. Cosmet. Dermatol.*, **2010**, *9*(3), 211-217.
- [71] Kim, B.J.; Lee, H.G.; Woo, S.M.; Youn, J.I.; Suh, D.H. Pilot study on photodynamic therapy for acne using indocyanine green and diode laser. *J. Dermatol.*, **2009**, *36*(1), 17-21.
- [72] Jang, M.S.; Doh, K.S.; Kang, J.S.; Jeon, Y.S.; Suh, K.S.; Kim, S.T. A comparative split-face study of photodynamic therapy with indocyanine green and indole-3-acetic acid for the treatment of acne vulgaris. *Br. J. Dermatol.*, **2011**, *165*(5), 1095-1100.
- [73] Kim, S.; Cho, K.H. Clinical trial of pin-point photodynamic therapy using an optic fiber for the improvement of enlarged facial pores: A case study. *J. Dermatol. Treat.*, **2009**, *20*(1), 36-41.
- [74] Klein, A.; Bäuml, W.; Koller, M.; Shafirstein, G.; Kohl, E.A.; Landthaler, M.; Babilas, P. Indocyanine green-augmented diode laser therapy of telangiectatic leg veins: A randomized controlled proof-of-concept trial. *Lasers Surg. Med.*, **2012**, *44*(5), 369-376.
- [75] Babilas, P.; Shafirstein, G.; Baier, J.; Schacht, V.; Szeimies, R.M.; Landthaler, M.; Bäuml, W.; Abels, C. Photothermolysis of blood vessels using indocyanine green and pulsed diode laser irradiation in the dorsal skinfold chamber model. *Lasers Surg. Med.*, **2007**, *39*(4), 341-352.
- [76] Costa, R.A.; Farah, M.E.; Freymüller, E.; Morales, P.H.; Smith, R.; Cardillo, J.A. Choroidocapillaris photodynamic therapy using indocyanine green. *Am. J. Ophthalmol.*, **2001**, *132*(4), 557-565.
- [77] Sato, T.; Ito, M.; Ishida, M.; Karasawa, Y. Phototoxicity of Indocyanine Green under Continuous Fluorescent Lamp Illumination and Its Prevention by Blocking Red Light on Cultured Muller Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2010**, *51*(8), 4337-4345.
- [78] Kernt, M.; Hirneiss, C.; Wolf, A.; Liegl, R.; Rueping, J.; Neubauer, A.; Alge, C.; Ulbig, M.; Gandorfer, A.; Kampik, A.; Haritoglou, C. Indocyanine green increases light-induced oxidative stress, senescence, and matrix metalloproteinases 1 and 3 in human RPE cells. *Acta Ophthalmol.*, **2010**, *90*(6), 571-579.
- [79] Sippy, B.D.; Engelbrecht, N.E.; Hubbard, G.B.; Moriarty, S.E.; Jiang, S.; Aaberg, T.M.; Grossniklaus, H. E.; Sternberg, P. Indocyanine green effect on cultured human retinal pigment epithelial cells: implication for macular hole surgery. *Am. J. Ophthalmol.*, **2001**, *132*(3), 433-435.
- [80] Fickweiler, S.; Szeimies, R.M.; Bäuml, W.; Steinbach, P.; Karer, S.; Goetz, A.E.; Abels, C.; Hofstädter, F. Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects *in vitro*. *J. Photochem. Photobiol.*, **1997**, *38*(2), 178-183.
- [81] Abels, C.; Fickweiler, S.; Weiderer, P.; Bäuml, W.; Hofstädter, F.; Landthaler, M.; Szeimies, R.M. Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch. Dermatol. Res.*, **2000**, *292*(8), 404-411.
- [82] Mamoona, A.M.; Gamal-Eldeen, A.M.; Ruppel, M.E.; Smith, R.J.; Tsang, T.; Miller, L.M. *In vitro* efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma. *Photodyn. PhotoDyn. Ther.*, **2009**, *6*(2), 105-116.
- [83] Urbanska, K.; Romanowska-Dixon, B.; Matuszak, Z.; Oszejka, J.; Nowak-Sliwinska, P.; Stochel, G. Indocyanine green as a prospec-

- itive sensitizer for photodynamic therapy of melanomas. *Acta Biochim. Pol.*, **2002**, *49*(2), 387-391.
- [84] Skřivanová, K.; Korpíková, J.; Vihálek, J.; Mornstein, V.; Janisch, R. Photochemical properties of a potential photosensitizer indocyanine green *in vitro*. *J. Photochem. Photobiol.*, **2006**, *83*(2), 150-154.
- [85] Baumler, W.; Abels, C.; Karrer, S.; Weiß, T.; Messmann, H.; Landthaler, M.; Szeimies, R.M. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light. *Br. J. Cancer*, **1999**, *80*(3-4), 360-363.
- [86] Funayama, T.; Sakane, M.; Abe, T.; Ochiai, N. Photodynamic Therapy with Indocyanine Green Injection and Near-Infrared Light Irradiation Has Phototoxic Effects and Delays Paralysis in Spinal Metastasis. *Photomed. Laser Surg.*, **2012**, *30*(1), 47-53.
- [87] Bozkulak, O.; Yamaci, R.F.; Tabakoglu, O.; Gulsoy, M. Photo-toxic effects of 809-nm diode laser and indocyanine green on MDA-MB231 breast cancer cells. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, **2009**, *6*(2), 117-121.
- [88] Shafirstein, G.; Baumler, W.; Hennings, L.J.; Siegel, E.R.; Friedman, R.; Moreno, M.A.; Webber, J.; Jackson, C.; Griffin, R.J. Indocyanine green enhanced near-infrared laser treatment of murine mammary carcinoma. *Int. J. Cancer*, **2011**, *130*(5), 1208-1215.
- [89] Lum, H.J.; Oh, C.H. Indocyanine green-based photodynamic therapy with 785 nm light emitting diode for oral squamous cancer cells. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, **2011**, *8*(4), 337-342.
- [90] Varriale, L.; Crescenzi, E.; Paba, V.; Mazziotti Di Celso, B.; Palumbo, G. Selective light-induced modulation of bcl-XL and bax expressions in indocyanine green-loaded U937 cells: effects of continuous or intermittent photo-sensitization with low IR-light using a 805-nm diode laser. *J. Photochem. Photobiol.*, **2000**, *57*(1), 66-75.
- [91] Barth, B.M.I.; Altino, E.; Shanmugavelandy, S.S.; Kaiser, J.M.; Crespo-Gonzalez, D.; Divittore, N.A.; McGovern, C.; Goff, T.M.; Keasey, N.R.; Adair, J.H.; Loughran, T.P.; Claxton, D.F.; Kester, M. Targeted Indocyanine-Green-Loaded Calcium Phosphosilicate Nanoparticles for *In vivo* Photodynamic Therapy of Leukemia. *ACS Nano*, **2011**, *5*(7), 5325-5337.
- [92] Tseng, W.W.; Saxton, R.E.; Deganutti, A.; Liu, C.D. Infrared Laser Activation of Indocyanine Green Inhibits Growth in Human Pancreatic Cancer. *Pancreas*, **2003**, *27*(3), 42-45.
- [93] Abels, C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*(8), 765-771.
- [94] Abels, C.; Karrer, S.; Baumler, W.; Goetz, A.; Landthaler, M.; Szeimies, R.M. Indocyanine green and laser light for the treatment of AIDS-associated cutaneous Kaposi's sarcoma. *Br. J. Cancer*, **1998**, *77*(6), 1021-1024.
- [95] Kawaguchi, A.; Nagao, S.; Takebayashi, K.; Higashiyama, M.; Komoto, S.; Hokari, R.; Miura, S. Long-term outcome of endoscopic semiconductive diode laser irradiation therapy with injection of indocyanine green for early gastric cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2008**, *23*(8), 1193-1199.
- [96] Chen, W.R.; Jeong, S.W.; Lucroy, M.D.; Wolf, R.F.; Howard, E.W.; Liu, H.; Nordquist, R.E. Induced antitumor immunity against DMBA-4 metastatic mammary tumors in rats using laser immunotherapy. *Int. J. Cancer*, **2003**, *107*(6), 1053-1057.
- [97] Chen, W.R.; Adams, R.L.; Carubelli, R.; Nordquist, R.E. Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment. *Cancer Lett.*, **1997**, *115*(1), 25-30.
- [98] Chen, W.R.; Zhu, W.G.; Dynlacht, J.R.; Liu, H.; Nordquist, R.E. Long-term tumor resistance induced by laser photodynamic immunotherapy. *Int. J. Cancer*, **1999**, *81*(5), 808-812.
- [99] Chen, W.R.; Singhal, A.K.; Liu, H.; Nordquist, R.E. Antitumor immunity induced by laser immunotherapy and its adoptive transfer. *Cancer Res.*, **2001**, *61*(2), 459-461.
- [100] Chen, W.R.; Adams, R.L.; Bartels, K.E.; Nordquist, R.E. Chromophore-enhanced *in vivo* tumor cell destruction using an 808-nm diode laser. *Cancer Lett.*, **1995**, *94*(2), 125-131.
- [101] Chen, W.R.; Adams, R.L.; Higgins, A.K.; Bartels, K.E.; Nordquist, R.E. Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: an *in vivo* efficacy study. *Cancer Lett.*, **1996**, *98*(2), 169-173.
- [102] Chen, W.R.; Liu, H.; Ritchey, J.W.; Bartels, K.E.; Lucroy, M.D.; Nordquist, R.E. Effect of different components of laser immunotherapy in treatment of metastatic tumors in rats. *Cancer Res.*, **2002**, *62*(15), 4295-4299.
- [103] Lucroy, M.D.; Chen, W.R.; Ridgway, T.D.; Higbee, R.G.; Bartels, K.E. Selective laser-induced hyperthermia for the treatment of spontaneous tumors in dogs. *J. X-Ray Sci. Technol.*, **2002**, *10*(3-4), 237-243.
- [104] Chen, W.R. Enhancement of Laser Cancer Treatment by a Chitosan-derived Immunoadjuvant. *Photochem. Photobiol.*, **2005**, *81*(1), 190-195.
- [105] Luksiene, Z.; Berg, K.; Moan, J. In: *Combination of Photodynamic Therapy and X-Irradiation - a Study on 5-Ala Radiomodifying Properties*. Proceedings Volume 2325 of Photodynamic Therapy of Cancer II, September 6, 1994; Brault D.; Jori G.; Moan J.; Ehrenberg B.; Lille, France, 1995. of Bellingham: Spie - Int Soc Optical Engineering, 1995. ISBN: 0-8194-1658-4.
- [106] Berg, K.; Luksiene, Z.; Moan, J.; Ma, L. Combined Treatment of Ionizing-Radiation and Photosensitization by 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin-Ix. *Radiat. Res.*, **1995**, *142*(3), 340-346.
- [107] Colasanti, A.; Kisslinger, A.; Quarto, M.; Riccio, P. Combined effects of radiotherapy and photodynamic therapy on an *in vitro* human prostate model. *Acta Biochim. Pol.*, **2004**, *51*(4), 1039-1046.
- [108] Montazerabadi, A.R.; Sazgarnia, A.; Bahreyni-Toosi, M.H.; Ahmadi, A.; Aledavood, A. The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. *J. Photochem. Photobiol.*, **2012**, *109*, 42-49.
- [109] Crescenzi, E.; Varriale, L.; Iovino, M.; Chiaviello, A.; Veneziani, B.M.; Palumbo, G. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, **2004**, *3*(5), 537-544.
- [110] Nomikou, N.; Sterrett, C.; Arthur, C.; McCaughan, B.; Callan, J.F.; Mchale, A.P. The Effects of Ultrasound and Light on Indocyanine-Green-Treated Tumour Cells and Tissues. *Chem. Med. Chem.*, **2012**, *7*(8), 1465-1471.
- [111] Chong, L.P.; Ozler, S.A.; De Queiroz, J.M.J.; Liggett, P.E. Indocyanine green-enhanced diode laser treatment of melanoma in a rabbit model. *Retina*, **1993**, *13*(3), 251-259.
- [112] De Potter, P.; Jamart, J. Adjuvant indocyanine green in transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma. *Ophthalmology*, **2003**, *110*(2), 406-413.
- [113] Liggett, P.E.; Lavaque, A.J.; Chaudhry, N.A.; Jablon, E.P.; Quiroz-Mercado, H. Preliminary results of combined simultaneous transpupillary thermotherapy and ICG-based photodynamic therapy for choroidal melanoma. *Ophthalmic Surg. Laser Imag.*, **2005**, *36*(6), 463-470.
- [114] Anghileri, L.; Robert, J. *Hyperthermia in cancer treatment*, CRC Press, 1986.
- [115] Kuo, W.S.; Chang, C.N.; Chang, Y.T.; Yang, M.H.; Chien, Y.H.; Chen, S.J.; Yeh, C.S. In: *Near-infrared Au nanorods in photodynamic therapy, hyperthermia agents, and near-infrared optical imaging*, Proceedings of Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications III, February 11, 2011; Samuel Achilefu; Ramesh Raghavachari, San Francisco, California, USA, 2011.
- [116] Liu, V.G.; Cowan, T.M.; Jeong, S.W.; Jacques, S.L.; Lemley, E.C.; Chen, W.R. Selective photothermal interaction using an 805-nm diode laser and indocyanine green in gel phantom and chicken breast tissue. *Lasers Med. Sci.*, **2002**, *17*(4), 272-279.
- [117] Kuo, P.C.; Peyman, G.A.; Men, G.; Bezerra, Y.; Torres, F. The effect of indocyanine green pretreatment on the parameters of transcleral diode laser thermotherapy-induced threshold coagulation of the ciliary body. *Lasers Surg. Med.*, **2004**, *35*(2), 157-162.
- [118] Lloyd, J.R.; Mirkov, M. Selective photothermolysis of the sebaceous glands for acne treatment. *Lasers Surg. Med.*, **2002**, *31*(2), 115-120.
- [119] Tuchin, V.V.; Genina, E.A.; Bashkatov, A.N.; Simonenko, G.V.; Odoevskaya, O.D.; Altschuler, G.B. A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris: photodynamic and photothermolysis treatment. *Lasers Surg. Med.*, **2003**, *33*(5), 296-310.
- [120] Genina, E.A.; Bashkatov, A.N.; Simonenko, G.V.; Odoevskaya, O.D.; Tuchin, V.V.; Altschuler, G.B. Low-intensity indocyanine-green laser phototherapy of acne vulgaris: Pilot study. *J. Biomed. Opt.*, **2004**, *9*(4), 828.
- [121] Baumler, W.; Paasch, U.; Klein, A.; Landthaler, M.; Friedman, R.; Shafirstein, G. Intravenous injection of indocyanine green to en-

- hance laser-assisted coagulation of blood vessels in skin-animal study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **2013**, *27*(2), 206-211.
- [122] Wolfe, J.D.; Csaky, K.G. Indocyanine green enhanced retinal vessel laser closure in rats: histologic and immunohistochemical observations. *Exp. Eye Res.*, **2004**, *79*(5), 631-638.
- [123] Chen, W.R.; Adams, R.L.; Bartels, K.E.; Nordquist, R.E. Chromophore-enhanced *in vivo* tumor cell destruction using an 808-nm diode laser. *Cancer Lett.*, **1995**, *94*(2), 125-131.
- [124] Radzi, R.; Osaki, T.; Tsuka, T.; Imagawa, T.; Minami, S.; Nakayama, Y.; Okamoto, Y. Photodynamic Hyperthermal Therapy with Indocyanine Green (ICG) induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in B16F10 Murine Melanoma Cells. *J. Vet. Med. Sci.*, **2012**, *74*(5), 545-551.
- [125] Radzi, R.; Osaki, T.; Tsuka, T.; Imagawa, T.; Minami, S.; Okamoto, Y. Morphological Study in B16F10 Murine Melanoma Cells after Photodynamic Hyperthermal Therapy with Indocyanine Green (ICG). *J. Vet. Med. Sci.*, **2012**, *74*(4), 465-472.
- [126] Greenwell, T.; Wyman, A.; Rogers, K. Chromophore-enhanced 805 nm laser therapy for gastrointestinal neoplasia. *Eur. J. Surg. Oncol.*, **2001**, *27*(4), 368-372.
- [127] Zheng, X.; Xing, D.; Zhou, F.; Wu, B.; Chen, W.R. Indocyanine Green-Containing Nanostructure as Near Infrared Dual-Functional Targeting Probes for Optical Imaging and Photothermal Therapy. *Mol. Pharm.*, **2011**, *8*(2), 447-456.
- [128] Yu, J.; Yaseen, M.A.; Anvari, B.; Wong, M.S. Synthesis of Near-Infrared-Absorbing Nanoparticle-Assembled Capsules. *Chem. Mater.*, **2007**, *19*(6), 1277-1284.
- [129] Yu, J.; Javier, D.; Yaseen, M.A.; Nitin, N.; Richards-Kortum, R.; Anvari, B.; Wong, M.S. Self-assembly synthesis, tumor cell targeting, and photothermal capabilities of antibody-coated indocyanine green nanocapsules. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*(6), 1929-1938.
- [130] Kuo, W.S.; Chang, C.N.; Chang, Y.T.; Yang, M.H.; Chien, Y.H.; Chen, S.J.; Yeh, C.S. Gold Nanorods in Photodynamic Therapy, as Hyperthermia Agents, and in Near-Infrared Optical Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*(15), 2711-2715.
- [131] Kuo, W.S.; Chang, Y.T.; Cho, K.C.; Chiu, K.C.; Lien, C.H.; Yeh, C.S.; Chen, S.J. Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*, **2012**, *33*(11), 3270-3278.
- [132] Patel, R.H.; Wadajkar, A.S.; Patel, N.L.; Kavuri, V.C.; Nguyen, K.T.; Liu, H. Multifunctionality of indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles for enhanced optical imaging and hyperthermia intervention of cancer. *J. Biomed. Opt.*, **2012**, *17*(4), 046003.
- [133] Tang, Y.; Mcgoron, A.J. Combined effects of laser-ICG photothermotherapy and doxorubicin chemotherapy on ovarian cancer cells. *J. Photochem. Photobiol.*, **2009**, *97*(3), 138-144.
- [134] Li, X.; Naylor, M.F.; Le, H.; Nordquist, R.E.; Teague, T.K.; Howard, C.A.; Murray, C.; Chen, W.R. Clinical effects of *in situ* photodynamic immunotherapy on late-stage melanoma patients: A preliminary study. *Canc. Biol. Ther.*, **2010**, *10*(11), 1081-1087.
- [135] Amat, A.; Rigau, J.; Waynant, R.W.; Ilev, I.K.; Anders, J.J. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: a hypothesis of mechanism. *J. Photochem. Photobiol. Biol.*, **2006**, *82*(2), 152-160.
- [136] Huang, L.; Chen, T.C.; Lin, F.H. Luminol as *in situ* light source in meso-tetraphenylporphyrin-mediated photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.*, **2013**, *20*(9), 1195-1202.
- [137] Ferreira, D.M.; Saga, Y.Y.; Aluicio-Sarduy, E.; Tedesco, A.C. Chitosan nanoparticles for melanoma cancer treatment by Photodynamic Therapy and electrochemotherapy using aminolevulinic acid derivatives. *Curr. Med. Chem.*, **2013**, *20*(14), 1904-1911.

3. Conclusion

Cette revue avait pour but de rassembler l'ensemble des études réalisées sur l'utilisation de l'ICG en tant que PS, afin de répondre à la question suivante : l'ICG est-il ou non un bon PS ? Malgré le nombre d'études réalisées, et en cours, il n'est pas encore possible d'y répondre.

En effet, comme la revue nous le montre, de nombreux chercheurs ont montré que l'ICG est un PS efficace dans l'APDT, alors que d'autres déclarent que l'ICG n'est pas un PS particulièrement efficace.

Seules 8 publications traitent de l'ICG en tant que PS et sont répertoriées dans le tableau 2.

Tableau II : Publications traitant de l'Indocyanine Green en termes de photosensibilisateur

Type de traitement	ICG	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	λ_{ex} (nm)	ROS	Détection	Référence
PDT Infection	Solution	<i>Staph. Aureus</i> <i>Strep. Pyogenes</i> <i>P.Aeruginosa</i>	-	808	Survie cellulaire	L-tryptophan Deuterium oxide	(OMAR, et al., 2008)
PDT Kératose actinique	Solution (1, 5, 10, 25, 50 μ mol)	HaCaT	-	805	1O_2	Azide de sodium	(FICKWEILER, et al., 1997)
PDT Cancer colorectal	Solution (10, 50, 100 or 500 μ mol)	HT-29	-	805	Survie cellulaire	Azide de sodium, histidine et mannitol	(BÄUMLER, et al., 1999)
PDT Leucémie	Solution (12 μ mol)	U-937	-	805	1O_2	Oxidation du dithiothreitol	(VARRIALE, et al., 2000)
PDT Leucémie	Nanoparticules de phosphosilicate de calcium et CD117	32-D-p210-GFP CML Human AML	Souris C3H/HeJ	-	1O_2	dihydroethidium	(BARTH, et al., 2011)
PDT Chirurgie maculaire	Solution	RPE	-	400–700	ROS intracellulaires	CM-H ₂ DCFDA	(KERNT, et al., 2010)
PDT + Ultrasons	Solution	RIF-1	Tumeur RIF-1	830	ROS (<i>in vitro</i>)	H ₂ DCFDA	(NOMIKOU, et al., 2012)
PHT Ciblée + PDT Cancérologie	Nanotige d'or Au- PSMA- ICG-anti VEGF et Au- PSMA-ICG	A549	-	808	1O_2	SOSG	(KUO, et al., 2010)

32-D-p210-GFP :	Lignée cellulaire murine
A549 :	Lignée cellulaire humaine maligne d'un carcinome de poumon
H 2 DCFDA :	2', 7'-dichlorodihydrofluoresceine diacetate
HaCaT :	Kératinocytes humains immortalisés spontanément
HDF :	Fibroblastes dermiques humains
HT-29 :	Lignée cellulaire humaine d'un carcinome de colon
PC-3 :	Lignée cellulaire d'un carcinome prostatique
RIF-1 :	Lignée cellulaire d'un fibrosarcome de souris
RPE :	Lignée cellulaire de l'épithélium pigmentaire de la rétine
SOSG :	Capteur vert d'oxygène singulet
U-937 :	Lignée cellulaire humaine monocytique (histiocytique lymphome, CRL 1593)

Il n'est pas facile de comparer les différentes études car les paramètres utilisés diffèrent d'une étude à l'autre : la concentration d'ICG, la longueur d'onde, la dosimétrie de lumière choisie, et les lignées cellulaires sont différentes.

Pour prouver l'effet PDT, les différents auteurs utilisent des sondes chimiques variées dont la fonction est de pouvoir réagir avec l'oxygène singulet en formant des nouvelles espèces chimiques avec des propriétés photophysiques différentes. Pour démontrer sans aucune ambiguïté que l'oxygène singulet est effectivement formé, il faudrait montrer la formation d'oxygène singulet de façon directe, c'est-à-dire par détection de la luminescence de l'oxygène singulet après excitation de l'ICG. A ce jour, et à notre connaissance, aucune équipe de recherche n'a réussi à le démontrer.

Par ailleurs, après analyse de différentes publications, il est très difficile de différencier si les effets observés sont des effets photodynamiques ou des effets photothermiques.

C'est pour quoi, les recherches concernant l'ICG et ses propriétés de PS sont toujours d'actualité et des essais cliniques sont en cours pour apporter des données d'efficacité sur les propriétés de PS de l'ICG, afin de permettre d'obtenir une indication pour un usage thérapeutique.

Possibilités réglementaires pour une mise à disposition de l'Indocyanine Green en usage thérapeutique

1. Introduction

Pour pouvoir mettre à disposition un médicament en France, celui-ci doit avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM). Pour constituer ce dossier, le médicament suit une phase de développement durant laquelle le demandeur (futur titulaire) de l'AMM génère des données pré-cliniques et cliniques de qualité, sécurité et efficacité sur le médicament.

L'AMM est octroyée sur ces critères de qualité, efficacité et sécurité à condition que le rapport bénéfice/risque évalué à partir de ces critères soit favorable. Ces données sont obtenues lors de la phase de développement du médicament avec les résultats des études précliniques et des essais cliniques.

Cette AMM est octroyée par le directeur général (DG) de l'ANSM ou par la commission européenne après démonstration de la qualité et de l'efficacité du médicament ainsi que la sécurité de l'emploi du médicament dans les conditions normales d'utilisation.

Il existe en France 4 procédures d'enregistrement différentes (LEEM (Les Entreprises du Médicament)), (CE (Commission Européenne), June 2013): 3 européennes et 1 nationale

- La procédure centralisée (*Centralised Procedure, CP*) : pour qu'elle soit utilisée, le médicament ne doit pas être enregistré dans un pays de l'Union Européenne. Elle est obligatoire pour les nouveaux médicaments issus des biotechnologies ; pour les médicaments contenant une nouvelle substance active et destinés au traitement des cancers, du diabète, du SIDA, des maladies neuro-dégénératives, des maladies virales, des maladies auto-immunes ; pour les médicaments orphelins (maladies rares) ; et pour les médicaments de thérapie innovante à usage thérapeutique. Elle est facultative pour tous les autres médicaments contenant une nouvelle substance active, les médicaments correspondant à une innovation thérapeutique, scientifique ou technique et pour les médicaments présentant un intérêt pour le patient ou pour la santé animale au niveau communautaire. Le dossier est déposé à l'Agence Européenne des Médicaments (*European Medicines Agency, EMA*), évalué par le Comité Européen des Médicaments à usage humain (CHMP), puis s'ensuit une revue linguistique c'est-à-dire la traduction des textes anglais approuvés dans les langues des Etats membres. L'AMM est octroyée par la Commission européenne (CE) pour les 27 Etats membres. La décision de la CE s'impose de fait sur le territoire français.

- La procédure de reconnaissance mutuelle (Mutual Recognition Procedure, MRP) : c'est la "reconnaissance" d'une AMM nationale octroyée par un autre état membre (état membre de référence (*Reference Member State, RMS*)) à un ou plusieurs autres états membres (états membres concernés (*Concerned Member State, CMS*)). Cette procédure est obligatoire pour les médicaments ayant déjà une AMM et qui sont destinés à être mis sur le marché dans plus d'un état membre. La procédure se termine donc par l'octroi d'une AMM nationale dans chacun des CMS.
- La procédure décentralisée (Decentralised Procedure, DCP) : elle a lieu seulement dans le cas où le médicament n'a encore aucune AMM en Europe. La procédure démarre en même temps dans tous les états membres choisis par la firme pharmaceutique. Elle est plus rapide et moins contraignante que la procédure en MRP, c'est une alternative intéressante à la procédure centralisée. Les médicaments enregistrés via cette procédure sont ensuite gérés selon les règles établies pour la MRP. Ils font donc en fin de procédure l'objet d'une décision nationale d'octroi d'AMM.
- La procédure Nationale (NP) (France) : le dossier est déposé auprès de l'ANSM. Le dossier est analysé par les équipes d'évaluation interne de l'ANSM sur des critères de qualité, efficacité et sécurité, et l'avis de groupes de travail d'experts externes peut être demandé. La décision est prise par le DG de l'ANSM et l'AMM est délivrée sur le marché français uniquement.

Le dossier de demande d'AMM est soumis dans un format prédéfini international nommé "*Common Technical Document*" (CTD). Le CTD est organisé en 5 modules. Le contenu du module 1 est spécifique à l'Europe et est défini par la CE en collaboration avec les autorités compétentes de chaque Etat membre, de l'EMA et du demandeur. La structure des modules 2, 3, 4 et 5 est commune à l'Europe et aux Etats-Unis (CE (Commission Européenne), May 2008) :

- Module 1 : données administratives
- Module 2 : résumé des données pharmaceutiques précliniques, et cliniques
- Module 3 : données pharmaceutiques (sur la qualité, la fabrication, les contrôles,...)
- Module 4 : données précliniques de sécurité : pharmacologie, pharmacocinétique, toxicologie (essais sur les animaux)
- Module 5 : données cliniques d'efficacité (essais cliniques sur l'homme)

L'AMM est accompagnée du Résumé des Caractéristiques Produit (RCP) et de la notice.

Le RCP est une partie clé de l'AMM, il est destiné aux professionnels de santé et leur sert de base pour savoir comment le médicament doit être utilisé. Il est mis à jour tout au long de la vie du médicament par exemple quand de nouvelles données de sécurité ou d'efficacité sont disponibles.

Le RCP comporte les informations essentielles sur l'utilisation du médicament (indication thérapeutique, dosage, mode d'administration, contre-indication(s), précautions d'emploi, ...), les données qualitatives et quantitatives du rapport bénéfice/risque du médicament (section 4.8 "Effets Indésirables" et section 5.1 "Propriétés Pharmacodynamiques"), les informations pour les traitements spécifiques (population pédiatrique, interaction avec d'autres médicaments, fertilité, grossesse et allaitement, ...), et les données pharmaceutiques (incompatibilités, durée de conservation, précautions particulières de conservation,...). Ces données sont présentées selon une structure définie. Pour les médicaments enregistrés selon une procédure européenne, la dernière partie du RCP est consacrée aux données spécifiques 0 chaque pays dont, pour la France, les conditions de prescription et de délivrance. Le RCP sert également de base pour l'élaboration de la notice, et de l'étiquetage des médicaments qui sont à destination des patients (EMA (Agence Européenne du Médicament)).

La notice est à destination du patient et présente donc l'essentiel des données du RCP dans un langage plus accessible (ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament))

L'AMM est octroyée pour 5 ans et elle est renouvelable pour une durée indéterminée si son rapport bénéfices /risque est bien confirmé durant les 5 premières années.

Cette AMM est obtenue dans une indication particulière et le médicament doit être prescrit et utilisé dans cette indication. Elle peut être modifiée/étendue par l'intermédiaire de demandes de variations auprès des autorités de santé.

2. Photosensibilisateurs déjà disponibles sur le marché français

2.1. Photosensibilisateur de 1^{ère} génération

Le PS de 1^{ère} génération est la Photofrin[®] (porfimère). C'est le PS actuellement le plus utilisé en PDT. Il est enregistré en France selon une procédure nationale. Ce médicament est commercialisé par les laboratoires Pinnacle Biologics B.V. Il est soumis à prescription médicale et il est réservé à un usage hospitalier. Il est indiqué dans le traitement des rechutes des cancers bronchiques non à petites cellules ou du cancer de l'œsophage ayant fait l'objet d'un traitement loco-régional antérieur.

Ce médicament est activé par la lumière dans la région spectrale de 630 nm. Environ 40 à 50 heures après son administration, la lumière laser doit être appliquée sur la tumeur à l'aide d'une fibre optique. La photo-activation dépend de la puissance de lumière totale (dose de lumière) appliquée au siège de la tumeur. Une irradiation uniforme et complète par lumière laser de la masse tumorale est indispensable. Les fibres optiques sont disponibles en deux modèles, le diffuseur cylindrique et la microlentille (LABORATOIRES PINNACLE BIOLOGICS B.V, 7 Janvier 2014).

2.2. Photosensibilisateurs de 2^{ème} génération

Ils ont été développés pour pallier les défauts de la Photofrin[®], à savoir sa non pu reté, sa longueur d'onde d'excitation à 630 nm, son coefficient d'extinction molaire faible à cette longueur d'onde, et son élimination peu rapide entraînant une photosensibilité rémanente de plusieurs semaines. Ils sont hydrophiles ou lipophiles grâce à des modifications chimiques de leur structure. Les PS de 2^{ème} génération ayant une AMM en France sont répertoriés dans le tableau 3.

2.3. Photosensibilisateurs de 3^{ème} génération

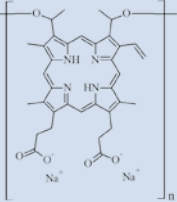
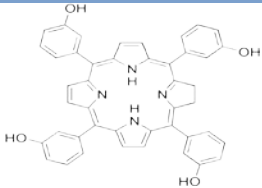
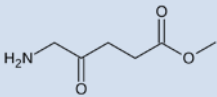
Les PS de 3^{ème} génération sont des PS vectorisés. Ils sont encapsulés (par exemple dans des liposomes) et/ou adressés, c'est-à-dire qu'ils sont couplés à un module d'adressage (par exemple un ligand vecteur ou une biomolécule ayant le rôle de prodrogue) pour améliorer leur sélectivité. Le ciblage peut être direct, c'est-à-dire qu'il vise directement les cellules tumorales en ciblant des récepteurs surexprimés à la surface de la tumeur (par exemple des récepteurs aux œstrogènes ou à l'acide folique). Le ciblage peut aussi être indirect en visant les néo-vaisseaux tumoraux. Il vise alors des marqueurs spécifiques de l'angiogenèse pour éradiquer la néo-vascularisation de la tumeur :

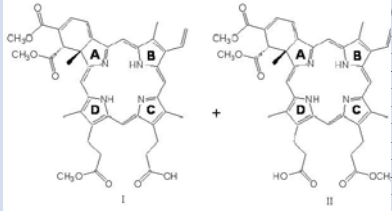
- les intégrines : récepteurs membranaires à la surface des cellules endothéliales qui sont activés lors de l'angiogenèse,
- les VEGFR ou neuropilines : le VEGF est le principal régulateur de l'angiogenèse qui s'exprime lors de la phase d'hypoxie tumorale. Les VEGFR sont ses récepteurs et les neuropilines sont des glycoprotéines transmembranaires corécepteurs du VEGF.

En France, le seul PS de 3^{ème} génération ayant une AMM est la Visudyne®. Cette molécule est commercialisée en France depuis juillet 2000 par les laboratoires Novartis selon une procédure centralisée. Elle est soumise à prescription médicale et elle est indiquée pour le traitement (LABORATOIRES NOVARTIS EUROPHARM Ltd, 27 Novembre 2012) :

- des adultes atteints de dégénérescence maculaire exsudative (humide) liée à l'âge (DMLA) et présentant une néovascularisation choroïdienne (NVC) rétrofovéolaire à prédominance visible, ou
- des adultes présentant une néovascularisation choroïdienne rétrofovéolaire due à la myopie forte.

Tableau III : Principaux photosensibilisateurs ayant une autorisation de mise sur le marché en France

Génération de PS	Substance active	Formule	Nom Commercial	$\lambda_{excitatio}$ n (nm)	Procédure d'enregistrement	Titulaire AMM	Indications	Condition délivrance
1 ^{ère}	Polymère sodique de l'HpD		Photofrin [®] (LABORATOIRES PINNACLE BIOLOGICS B.V, 7 Janvier 2014)	630	Procédure Nationale (14/03/2002)	Pinnacle Biologics B.V	Traitement des rechutes des cancers bronchiques non à petites cellules ou du cancer de l'œsophage ayant fait l'objet d'un traitement loco-régional antérieur	Soumis à prescription médicale
2 ^{nde}	Temoporfine		Foscan [®] (LABORATOIRES BIOLITECH PHARMA Ltd, 21 Novembre 2013)	652	Procédure Centralisée (24/10/2001)	Biotech Pharma Ltd	Traitement palliatif des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou	Soumis à prescription médicale
2 ^{nde}	Aminolévulinate de méthyle		Metvixia [®] (LABORATOIRES GALDERMA INTERNATIONAL, 7 Décembre 2010)	635	Procédure Nationale (19/09/ 2006)	Galderma International	1) Traitement des kératoses actiniques fines ou non hyperkératosiques et non pigmentées 2) Traitement du carcinome basocellulaire 3) Traitement des carcinomes intraépidermiques (maladie de Bowen) non pigmentés	Soumis à prescription médicale

Génération de PS	Substance active	Formule	Nom Commercial	$\lambda_{excitation}$ (nm)	Procédure d'enregistrement	Titulaire AMM	Indications	Condition délivrance
3 ^{ème}	Verteporphin liposomale	<p><u>Principe Actif :</u></p> 	Visudyne® (LABORATOIRES NOVARTIS EUROPHARM Ltd, 27 Novembre 2012)	689	Procédure centralisée (27/07/2000)	Novartis Europharm Ltd	1) Traitement de la DMLA présentant une néovascularisation choroïdienne (NVC) rétrofovolaire à prédominance visible 2) Traitement de la néovascularisation choroïdienne rétrofovolaire due à la myopie forte.	Soumis à prescription médicale

3. Essais cliniques en cours utilisant l'Indocyane Green comme un agent thérapeutique

Un essai clinique est une recherche biomédicale organisée et pratiquée sur l'Homme en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales. Les essais cliniques portant sur les médicaments ont pour objectif, selon le cas, d'établir ou de vérifier certaines données pharmacocinétiques (modalités de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion du médicament), pharmacodynamiques (mécanisme d'action du médicament notamment) et thérapeutiques (efficacité et tolérance) d'un nouveau médicament ou d'une nouvelle façon d'utiliser un traitement connu (ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament)). Les essais cliniques se déroulent en 4 phases : les études de phase 1, 2 et 3 en amont de l'AMM, constitutives du dossier d'AMM, et les études cliniques de phase 4 en aval de l'AMM. La phase 1 correspond à un essai clinique sur un nombre limité de volontaires sains pour évaluer la diffusion du principe actif dans l'organisme et les éventuels réactions négatives. La phase 2 est un essai clinique sur des volontaires malades, elle permet de tester l'efficacité et la tolérance du médicament et de déterminer sa posologie optimale. La phase 3 permet de confirmer les résultats obtenus durant les essais de phase 1 et 2 sur une plus large population. La phase 4 a lieu après commercialisation du médicament et permet de confirmer les données en vie réelle (LEEM (Les Entreprises du Médicament)).

Actuellement, plus d'une centaine d'essais cliniques utilisant l'ICG sont en cours dont 6 en France (U.S. National Institutes of Health). Sur l'ensemble, la quasi-totalité utilise l'ICG comme un agent de diagnostic. Ces essais sont menés soit pour vérifier l'efficacité de l'ICG dans le diagnostic de certaines pathologies (comme les ganglions lymphatiques sentinelles) ou pour vérifier l'efficacité d'un traitement. Cependant, 6 études, cherchent à prouver l'efficacité de l'ICG en tant qu'agent thérapeutique (U.S. National Institutes of Health) (Voir Tableau 4).

Tableau IV : Essais cliniques en cours dans le monde utilisant l'Indocyanine Green en tant qu'agent thérapeutique

Essai clinique	Domaine Thérapeutique	Traitement	Phase	Début	Sponsor	Thérapie
Single Session Of Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green	Parodontite	<u>Médicament:</u> ICG <u>Dispositif:</u> Laser <u>Traitement:</u> Détartrage	Phase 2	Octobre 2012	SVS Institute of Dental Sciences	PDT
Treatment of Patients With Neovascular AMD Using Indocyanine Green-Mediated Photothrombosis (i-MP).	DMLA	<u>Médicament:</u> ICG <u>Traitement:</u> ICG-Mediated Photothrombosis	Phase 2	Avril 2007	Opto Eletronica S.A	?
Long Term Results of Combined Transpupillary Thermotherapy Indocyanine Green Based Photodynamic Therapy in Choroidal Melanoma	Mélanome de la choroïde	<u>Traitement:</u> Transpupillary thermotherapie + ICG -based PDT	Phase 4	Mars 2009	New England Retina Associates	PDT
Lucentis as an Adjuvant Therapy With TTT- ICG Based Photodynamic Therapy in in Choroidal Melanoma	Mélanome de la choroïde	<u>Traitement:</u> Ranibizumab injection and Transpupillary thermotherapie (TTT) + ICG -based PDT	Phase 3	Mai 2008	New England Retina Associates	PDT
Laser Assisted Treatment of Chronic Sinusitis With and Without Light Activated Agents	Rhinosinusite	<u>Traitement:</u> (1) Laser + ICG (2) Laser seulement	N/A	Mai 2009	New York Head & Neck Institute	?
Imiquimod and Laser Therapy With or Without a Green Dye in Treating Patients With Stage III or Stage IV Melanoma That Has Spread to Other Parts of the Skin	Mélanome (peau) Cancer métastatique	<u>Médicaments:</u> Imiquimod ICG <u>Autres:</u> Flux cytométrique Technique immunologique Analyse des biomarqueurs	Phase 1	Mars 2006	Oklahoma Health Sciences Center - Tulsa	?

4. Possibilités réglementaires

Pour pouvoir mettre à disposition l'ICG dans le cadre d'un usage thérapeutique, 2 possibilités réglementaires semblent envisageables en France :

- soit une demande de variation pour obtenir une extension d'indication dans l'AMM de la spécialité déjà disponible en France, l'Infracyanine[®], sur la base de données d'efficacité obtenues dans le cadre d'un nouvel essai clinique dans le traitement d'une pathologie,
- soit la mise en place d'une recommandation temporaire d'utilisation dans le cadre de l'utilisation de l'Infracyanine[®] dans une pathologie et selon des conditions précises d'utilisation à la suite d'une saisine de l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments (ANSM) par une société savante ou une association de patients pour élaborer cette recommandation.

4.1. Extension d'indication

L'extension d'indication est une variation et comme toute variation elle est soumise au règlement des variations (CE) n° 1234/2008 du 24 Novembre 2008 modifié en Août 2012 par le règlement (CE) n°712/2012 (CE (Commission Européenne), 2012) qui définit une classification des modifications demandées et définit les exigences spécifiques à chaque type de variation.

4.1.1. Définition d'une variation

Les modifications de termes d'une AMM sont appelées des variations, elles permettent de faire vivre l'AMM tout au long de la vie du médicament. Les variations sont classées selon le règlement (CE) n° 1234/2008 (CE (Commission Européenne), 2008) et évaluées soit au niveau local par l'ANSM soit au niveau européen par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) en fonction de la procédure d'enregistrement initiale du médicament.

Les variations suivent la classification suivante :

- Variations de type IA_{in} : elles concernent les modifications mineures qui sont mises en œuvre par le titulaire de l'AMM puis notifiées immédiatement aux autorités compétentes qui rend son avis sous 30 jours à réception de la demande.
- Variations de type IA : elles concernent les modifications mineures qui sont mises en œuvre par le titulaire de l'AMM puis notifiées dans les 12 mois suivants cette mise en œuvre aux autorités compétentes qui rend son avis sous 30 jours à réception de la demande.

- Variations de type IB : elles sont des modifications mineures notifiées par le titulaire de l'AMM à l'autorité compétente. Si, dans les 30 jours qui suivent la réception de la notification, l'autorité compétente n'a pas transmis d'avis défavorable au titulaire, la notification est réputée acceptée par l'autorité compétente.
- Variations de type II : elles sont des modifications majeures soumises à un avis préalable explicite des autorités de santé avant mise en œuvre. Le titulaire soumet à l'autorité compétente une demande et celle-ci rend son avis sous 60 jours à réception de la demande. Une demande d'extension d'indication fait partie des variations de type II.
- Les extensions de gamme : il s'agit de l'octroi d'une nouvelle AMM pour une nouvelle forme pharmaceutique d'un médicament existant déjà sur le marché (par exemple voie injectable vs comprimé).
- Les restrictions urgentes de sécurité.

4.1.2. Définition d'une extension d'indication

Dans la législation européenne, il n'existe pas de définition précise de l'extension d'indication dans les textes de Loi. Cependant, la Commission Européenne a publié des lignes directrices (dans le "Notice to Applicants : A guideline on Summary of Products Characteristics" (CE (Commission Européenne), September 2009)) qui permettent de définir l'extension d'indication comme une des modifications suivantes (CE (Commission Européenne), Novembre 2007) :

- une nouvelle maladie ciblée,
- un stade différent d'une maladie,
- un élargissement de la population cible pour une même maladie,
- un changement de stratégie thérapeutique comme le passage d'un traitement de première intention à un traitement de seconde intention (ou inversement),
- un changement de stratégie thérapeutique comme le passage d'un traitement à une prévention ou à un diagnostic d'une maladie,
- un changement de stratégie thérapeutique comme le passage d'un traitement en prévention de la progression d'une maladie ou en prévention de rechutes d'une maladie,
- un changement de stratégie thérapeutique comme le passage d'un traitement de court terme à un traitement de long terme pour une maladie chronique.

Le titulaire de l'AMM doit fournir un argumentaire solide pour demander une extension d'indication qui doit être soutenu par des données scientifiques appropriées.

Selon le règlement variation (CE) n° 1234/2008 (CE (Commission Européenne), 2008), l'extension d'indication est une variation majeure de type II : "C.I.6. Change(s) to therapeutic indication (s) - a) Addition of a new therapeutic indication or modification of an approved one".

4.1.3. Constitution d'un dossier de demande d'extension d'indication

4.1.3.1. Documents nécessaires pour la soumission d'une variation de type II

La demande doit être soumise par le titulaire de l'AMM à l'ANSM ou à l'EMA (selon le type de procédure d'enregistrement).

Comme toute variation de type II, le dossier de soumission doit comporter (CE (Commission Européenne), 2008) :

- une lettre de couverture expliquant les modifications proposées,
- un formulaire de modification (ou "application form") comprenant des détails sur l'AMM du médicament concerné, et si la demande de variation est liée à une autre variation une description du lien entre les 2 modifications doit être fournie dans la section appropriée du formulaire,
- le numéro de classification de la variation (ici C.I.6., voir chapitre 4.1.2) qui permet de savoir quelles sont les conditions et les documents requis pour la soumission,
- les données supportant la demande de variation,
- une mise à jour du module qualité, du module des données non-cliniques et du module des données cliniques. Si des rapports de données non-cliniques ou cliniques sont soumis, leurs résumés doivent être inclus dans le module 2,
- si la variation est soumise dans le cadre d'une demande des autorités compétentes, par exemple pour le dépôt d'une variation suite à un signal ou des données de pharmacovigilance, une copie de la demande doit être annexée à la lettre de couverture,
- dans le cas où la variation touche le RCP, l'étiquetage ou la notice, l'information produit révisée doit être présentée ainsi que les traductions appropriées. Si la lisibilité du carton ou de la notice est affectée par la variation de type II, des maquettes ou des spécimens de ces éléments doivent être fournis à l'état membre de référence, à l'autorité compétente locale ou à l'EMA,
- la redevance appropriée.

4.1.3.2. Spécificité requise dans le cadre d'une demande d'extension d'indication : le rapport justifiant la nouvelle indication

Une demande d'extension d'indication pour un médicament est une variation de type II, cependant au vu de l'importance du changement pour l'AMM de ce médicament elle répond aussi à des règles spécifiques.

Elle doit comporter un rapport présentant les résultats significatifs d'essais pré-cliniques ou cliniques soutenant cette nouvelle indication. Ces informations sont présentées sous forme d'un rapport d'environ une dizaine de pages inclus dans le module 1 de l'AMM. Les rapports des différentes études et les références bibliographiques doivent être placés dans les modules adéquats du dossier d'AMM.

Ce rapport inclus :

- Une introduction.
- Un argumentaire comparant le médicament dans sa nouvelle indication avec les médicaments déjà existants sur le marché pour cette même indication thérapeutique. Le titulaire de l'AMM doit démontrer l'intérêt et le bénéfice clinique de son médicament en comparaison avec les thérapeutiques déjà existantes sur le marché. Les thérapeutiques non pharmacologiques comme le diagnostic, la prévention ou le traitement de cette pathologie comme la chirurgie ; les règles hygiéno-diététiques, ..., doivent aussi faire partie de cette étude de comparaison. Au minimum une étude doit être menée *versus* un comparateur pertinent dans l'indication souhaitée, le cas échéant, cette étude sera considérée comme une étude significative. Le choix du comparateur (thérapie déjà existante) dans les essais cliniques doit être justifié à l'aide de données scientifiques tirées de la littérature.
- Un argumentaire pour justifier de cette nouvelle indication étayé par des données scientifiques appropriées obtenues dans le cadre des études précliniques et/ou cliniques appropriées.

Les études effectuées dans ce cadre doivent avoir été menées ou financées par le titulaire de l'AMM.

En général, la démonstration d'une efficacité, d'un bon profil de tolérance, et/ou de propriétés pharmacocinétiques favorables résulte dans la démonstration clinique de ces avantages en comparaison des thérapeutiques déjà existantes.

La pertinence de ces données sera évaluée par l'EMA, le RMS ou les autorités compétentes locales selon la procédure d'enregistrement.

En complément de ces données spécifiques, les données de sécurité, qualité et d'efficacité comme dans toutes les demandes de variation sont à fournir.

4.1.4. Evaluation du dossier de demande d'extension d'indication

Dans le cadre d'une demande d'extension d'indication pour un médicament enregistré en procédure nationale, la phase d'évaluation commence après réception et validation de la conformité du dossier par l'autorité compétente. Le titulaire de l'AMM est informé du début de la procédure. En général, la procédure dure 60 jours. La période d'évaluation peut être réduite par l'autorité compétente au regard de l'urgence de la demande ou bien être allongée jusqu'à 90 jours.

L'autorité compétente peut demander des informations supplémentaires au titulaire de l'AMM. La demande d'informations supplémentaires doit être envoyée au titulaire de l'AMM avec un calendrier prévisionnel des dates de soumission des réponses et de la nouvelle période d'évaluation. La procédure est suspendue jusqu'à réception des réponses généralement le calendrier est suspendu pendant 1 mois. Pour avoir un délai de réponse supplémentaire, le titulaire doit faire une demande à l'autorité compétente. L'évaluation des réponses prend entre 30 et 60 jours en fonction de la complexité et du nombre de données demandées au titulaires de l'AMM (CE (Commission Européenne), 2008).

4.1.5. Résultat de l'évaluation du dossier de demande d'extension d'indication

A la fin de la période d'évaluation, l'autorité compétente finalise son évaluation en rendant un avis favorable ou non et en informe le titulaire de l'AMM. Après approbation de la variation, l'ANSM dispose de 2 mois pour renvoyer une ampliation de l'AMM au titulaire c'est-à-dire un document officiel autorisant l'utilisation du médicament dans cette nouvelle indication. La modification peut être implémentée après que le titulaire a été informé de l'approbation de sa modification d'AMM (CE (Commission Européenne), 2008).

4.1.6. Conclusion

A l'heure actuelle, il n'existe pas de données d'efficacité assez pertinentes et solides pour pouvoir soumettre une demande d'extension d'indication pour l'ICG, cette voie réglementaire n'est donc pas envisageable dans un premier temps. Avec l'introduction en France, par la Loi du 29 Décembre 2011 (Loi de renforcement de la sécurité sanitaire du médicament et des produits de santé dite "Loi Bertrand"), de la recommandation temporaire d'utilisation (RTU) une autre piste réglementaire semble s'ouvrir pour pouvoir mettre à disposition l'ICG en tant qu'agent thérapeutique. En effet, la mise en place d'une RTU permettrait d'obtenir les données nécessaires pour soumettre dans un second temps une demande d'extension d'indication auprès de l'ANSM.

4.2. La Recommandation Temporaire d'Utilisation (RTU)

4.2.1. Le Contexte d'élaboration de la recommandation temporaire d'utilisation : La Loi Bertrand, pour le renforcement de la sécurité sanitaire du médicament et des produits de santé

La volonté du législateur de modifier le cadre législatif des industries du médicament avec la promulgation de la Loi du 29 Décembre 2011, trouve son origine dans le cadre des récentes crises comme celle de la contamination du sang, des valvulopathies sous Benfluorex, des incidents liés aux prothèses mammaires PIP et du Mediator®.

Née dans ce contexte particulier, et élaborée dans l'urgence, cette Loi dite "Loi Bertrand" n'est que le point de départ de la transformation du système de mise sur le marché et de surveillance des médicaments et des dispositifs médicaux qui a pour but d'améliorer la sécurité pour les patients, des produits de santé et du progrès thérapeutique ; d'assurer une expertise indépendante et des décisions transparentes ; de former et d'informer les professionnels de santé et le public.

Cette Loi est l'aboutissement d'une vaste concertation sur la refonte du système de sécurité sanitaire des produits de santé. D'une part sous la forme des "Assises du médicament" qui ont réuni professionnels de santé, associations de patients, autorités de régulation, lanceurs d'alerte, représentants de l'expertise académiques, industries de santé et personnalités qualifiées ; d'autre part sous la forme des travaux des parlementaires comme le rapport de la mission d'information de l'Assemblée Nationale sur le médiateur et la pharmacovigilance, le rapport de la mission d'information du Sénat «Médiateur : évaluation et contrôle des médicaments», le rapport de l'Assemblée nationale en conclusion des travaux de la mission d'information sur les agences sanitaires ; et enfin sous la forme du traditionnel rapport des corps d'inspection (IGAS) «Enquête sur le Médiateur», ... Ainsi toutes les opinions et les propositions ont pu s'exprimer et - à défaut d'être retenues - entendues (LEEM (Les Entreprises du Médicament), 26 Janvier 2012).

Cette Loi, qui vise à refonder le système de sécurité sanitaire des produits de santé, poursuit deux objectifs majeurs :

- efficacité du médicament,
- sécurité du médicament,

au travers de quatre réformes principales :

- renforcement de la sécurité du médicament,
- renforcement de l'encadrement des pratiques commerciales et promotionnelles,
- redéfinition des missions et des pouvoirs de l'ANSM,
- renforcement de la transparence,

et va donc impacter en profondeur les industries pharmaceutiques.

4.2.2. Définition de la recommandation temporaire d'utilisation

La sécurité d'emploi d'un médicament est assurée par un rapport positif entre les bénéfices et les risques de son utilisation dans l'indication considérée. Ce rapport positif fonde l'AMM dont le cadre est défini par le RCP.

En effet, dans le cas de l'ICG, si le profil de tolérance est bien connu et favorable, son efficacité dans cette utilisation n'est pas encore totalement établie. De ce fait, son utilisation expose à une balance bénéfices/risques défavorable par manque de données sur les bénéfices attendus.

Cependant, certains médicaments sont prescrits en dehors de l'AMM, soit pour répondre à un besoin de santé publique non assuré dans le cadre d'une AMM existante, soit pour assurer l'accès du médicament à certains sous-groupes de patients peu étudiés ou non ciblés dans le dossier d'enregistrement.

Ainsi, dans le but d'assurer une équité d'accès et de sécuriser le plus possible l'utilisation des médicaments en dehors de l'AMM, la Loi du 29 décembre 2011 introduit la possibilité d'encadrer les utilisations en dehors du cadre de l'AMM d'une part grâce aux RTU (Article L.5121-12-1 du Code de la Santé Publique), pour des médicaments bénéficiant déjà d'une AMM en France, qui seront élaborées par l'ANSM en collaboration non décisionnelle avec le laboratoire sollicité ; et d'autre part en redéfinissant plus précisément les Autorisations Temporaires d'utilisation (ATU) (Article L.5121-12 du CSP) pour les médicaments n'ayant pas d'AMM en France (République Française, 30 décembre 2011). Le décret n° 2012-742 du 9 mai 2012 relatif aux recommandations temporaires d'utilisation des spécialités pharmaceutiques en précise les conditions d'élaboration par l'ANSM. (République Française, 10 mai 2012) et le décret n° 2012-740 du 9 mai 2012 relatif à la prise en charge dérogatoire par l'assurance maladie des spécialités pharmaceutiques bénéficiant d'une recommandation temporaire d'utilisation ou de certains produits et prestations précise les conditions de remboursement du médicament dans le cas d'une prescription selon une RTU (République Française, 10 mai 2012). Le décret n° 2013-66 du 18 janvier 2013 relatif aux autorisations temporaires d'utilisation des médicaments vient préciser en détail les conditions d'élaboration d'une ATU (République Française, 20 Janvier 2013).

L'ATU est une procédure exceptionnelle, applicable en France, dérogatoire, et temporaire pour traiter des maladies graves ou rares quand il n'existe pas de traitement approprié et que leur efficacité et leur sécurité d'emploi sont résumées en l'état des connaissances scientifiques. Elle est délivrée par l'ANSM, et permet l'accès à des médicaments n'ayant pas d'AMM en France, quand il y a un réel besoin de santé publique. Elle s'utilise, hors du cadre des essais cliniques, pour des médicaments en développement ou autorisés à l'étranger. En pratique, il existe 2 types d'ATU : l'ATU nominative qui ne concerne qu'un seul malade ou l'ATU de cohorte qui concerne un sous-groupe ou un groupe de malades. L'ATU de cohorte est subordonnée à la mise en œuvre d'un protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations (PUT) qui, est établi par l'ANSM en collaboration avec le titulaire d'AMM. Il permet la collecte d'informations sur l'utilisation réelle du médicament, et notamment des données de tolérance du produit. L'ANSM peut considérer que la mise en place d'un tel protocole est également nécessaire pour certains médicaments mis à disposition dans le cadre d'ATU nominatives. Les données recueillies font l'objet de rapports périodiques de synthèse à l'ANSM et les résumés de ces données sont diffusés aux professionnels de santé utilisateurs (ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament)).

La voie réglementaire de l'ATU n'est, cependant, pas possible dans le cadre de la mise à disposition de l'ICG en tant qu'agent thérapeutique, car cette molécule possède déjà une AMM en France.

4.2.3. Critères d'élaboration des recommandations temporaires d'utilisation

Une RTU est élaborée par l'ANSM lorsque les deux conditions suivantes sont remplies (ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament), Octobre 2012) :

- il existe un besoin thérapeutique non couvert, c'est-à-dire qu'il n'existe pas d'alternative médicamenteuse appropriée de posant d'une AMM ou d'une ATU de cohorte dans l'indication concernée,
- et le rapport bénéfices/risques du médicament est résumé favorable, à partir de données scientifiques disponibles d'efficacité et de sécurité.

La RTU répond donc à un double objectif :

- sécuriser l'utilisation de médicaments prescrits dans un cadre non conforme à leur AMM, en objectivant leur intérêt thérapeutique au regard de risques auxquels ils exposent les patients,
- assurer un suivi des patients traités dans ce cadre dérogatoire à l'AMM. Elle constitue ainsi un levier pour améliorer la connaissance du médicament dans l'utilisation considérée et incite le laboratoire à déposer une demande d'extension d'indication.

Il s'agit d'un dispositif temporaire qui ne peut excéder 3 ans.

4.2.4. Spécialités concernées

Toutes les spécialités de posant d'une AMM, européenne ou nationale, sont susceptibles de faire l'objet d'une RTU qu'elles soient prescrites en ville comme à l'hôpital.

Une RTU peut porter sur :

- une seule spécialité pharmaceutique,
- plusieurs spécialités :
 - appartenant, le cas échéant, à un groupe générique,
 - ayant un mécanisme d'action similaire,
 - une convention autorisée lors de leur prescription dans la même indication ou dans les mêmes conditions d'utilisation.

4.2.5. Circuit d'élaboration d'une recommandation temporaire d'utilisation

4.2.5.1. Identification du besoin

L'ANSM est en charge d'élaborer les RTU. Dans le cadre de ses missions de surveillance et de bon usage de médicaments, lorsqu'une situation non conforme à l'AMM est identifiée, l'ANSM peut s'autosaisir pour élaborer une RTU lorsqu'elle identifie un besoin thérapeutique non couvert.

S'ils estiment qu'elle pourrait donner lieu à une RTU, toute prescription d'une spécialité non conforme à son AMM peut également être signalée à l'ANSM par (ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament), Octobre 2012) :

- le ministre chargé de la santé,
- le ministre chargé de la sécurité sociale,
- la Haute Autorité de Santé (HAS),
- l'Union nationale des caisses d'assurance maladie (UNCAM),
- l'Institut National du Cancer (INCA),
- les centres de référence/compétence en charge des maladies rares,
- les associations agréées de patients.

Dans tous les cas, l'initiative d'engager la procédure d'élaboration d'une RTU relève de la compétence exclusive de l'ANSM (c'est-à-dire que l'ANSM décidera ou non de s'autosaisir après ce signalement).

4.2.5.2. Instruction d'une recommandation temporaire d'utilisation

L'ANSM procède en trois étapes successives pour mener à bien la procédure d'élaboration d'une RTU :

- la collecte des informations nécessaires à l'instruction,
- l'expertise scientifique de ces informations,
- le rendu de sa décision.

i. Collecte des données

✓ Pour le titulaire de l'AMM :

L'ANSM demande au(x) laboratoire(s) concerné(s) de lui transmettre dans un délai de 3 mois toute information utile et notamment :

- toutes les données cliniques et non cliniques permettant de contribuer à l'évaluation de l'efficacité et de la sécurité du médicament utilisé dans la situation identifiée,
- la liste des essais cliniques en cours / programmés en France ou à l'étranger dans l'indication visée,
- une estimation du nombre de patients potentiellement concernés en France,
- un projet de protocole de suivi des patients,
- le cas échéant, une copie de toute AMM délivrée dans un autre Etat dans cette indication avec le RCP et le dernier PSUR (*Periodic Safety Update Report*),
- le cas échéant, une copie de tout retrait ou refus d'AMM dans cette indication par un autre état,
- le cas échéant, une copie de tout avis scientifique de l'EMA ou d'une autre autorité compétente dans cette indication.

✓ Pour les maladies rares et/ou graves :

L'ANSM sollicite de plus et en parallèle dans le même délai des 3 mois, l'avis :

- du centre de référence de la maladie rare concernée s'il existe,
- de l'INCA si la pathologie relève de la cancérologie.

ii. Expertise interne du dossier

L'ANSM évalue le rapport bénéfices/risques présumé de la situation pouvant relever de la RTU à partir des données recueillies auprès du laboratoire et, le cas échéant, de l'Inca ou du centre de référence de la maladie rare concernée.

L'évaluation de l'efficacité et de l'ampleur du bénéfice clinique présumé est réalisée par l'agence en se fondant sur les principes de l'évaluation scientifique. Plusieurs critères comme la qualité de ses preuves scientifiques (caractéristiques méthodologiques de ses études et de l'ensemble de ses résultats disponibles), le caractère innovant, le profil de sécurité du médicament, le pronostic et la fréquence de la pathologie ainsi que l'existence d'essai clinique en France dans l'indication sont pris en compte.

L'exigence peut être adaptée en fonction de situations particulières, telles que les maladies rares ou les pathologies cancéreuses. Dans ces cas, l'évaluation prend en compte, s'ils existent, les protocoles nationaux de diagnostic et de soins, ainsi que les données transmises par les centres de référence.

iii. Décision

Si l'évaluation effectuée par l'ANSM permet de présumer que le bénéfice présumé par rapport aux effets indésirables potentiels est favorable, l'ANSM élabore un projet de RTU avec en annexe le protocole de suivi et, en tant que de besoin, un projet de convention avec le(s) laboratoire(s) concerné(s).

Dans le cas contraire, la notification d'avis défavorable de la RTU est notifiée au demandeur (c'est-à-dire la personne ayant identifié le besoin) et publiée sur le site internet de l'ANSM. La RTU n'aura pas lieu et le laboratoire reste garant du bon usage de son médicament.

4.2.6. Contenu d'une recommandation temporaire d'utilisation

- La RTU mentionne :
 - indication dérogatoire,
 - posologie et mode d'administration,
 - contre-indications, mises en garde et précautions d'emploi,
 - effets indésirables,
 - classement de la spécialité, le cas échéant.
- Durée de validité (au maximum 3 ans)
- Argumentaire comprenant les données disponibles permettant de présumer d'un rapport bénéfices/risques favorable
- Périodicité et modalités d'envoi de rapports de synthèse à l'ANSM de ces données

4.2.7. Les annexes d'une recommandation temporaire d'utilisation

4.2.7.1. Le protocole de suivi des patients

Le Protocole de Suivi définit les critères de prescription, de dispensation et d'administration du médicament ainsi que les modalités de surveillance des patients traités.

Il est élaboré à partir d'un projet soumis à l'ANSM par le titulaire de l'AMM sur la base d'un modèle de protocole transmis par l'ANSM.

Il décrit également les modalités de recueil des données issues de ce suivi notamment les données d'efficacité, de sécurité d'emploi et les conditions réelles d'utilisation du produit.

Il est obligatoire et financé par le laboratoire.

Le Protocole de Suivi comporte les documents suivants (ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament), Octobre 2012) :

- des fiches de suivi (initiale, de suivi et d'arrêt du traitement médicamenteux) permettant le recueil des données d'efficacité et de sécurité des patients traités dans le cadre de la RTU,
- un argumentaire sur l'utilisation du médicament concerné dans le cadre de la RTU,
- une information à destination des prescripteurs sur les conditions d'utilisation du médicament dans le cadre de son AMM telles que décrites dans le RCP et dans le cadre de la RTU,
- une note d'information destinée aux patients décrivant les modalités d'utilisation du médicament dans le cadre de la RTU ainsi que la Notice-Patient validée dans le cadre de son AMM,
- un rappel des modalités de déclaration des événements indésirables, ainsi que les formulaires de signalement des effets indésirables susceptibles d'être liés à un médicament à destination d'une part des professionnels de santé et d'autre part des patients.

4.2.7.2. La convention

Elle est conclue entre l'ANSM et le titulaire d'AMM ou l'exploitant.

Elle précise (ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament), Octobre 2012) :

- les modalités de collecte et de communication à l'ANSM des informations issues du suivi des patients par le(s) laboratoire(s),
- le rôle des intervenants dans le cadre du suivi notamment et en particulier de l'ANSM, des professionnels de santé et du (des) laboratoire(s),
- l'engagement, le cas échéant, du laboratoire à déposer une demande de modification d'AMM dans un délai déterminé par l'ANSM.

Si plusieurs laboratoires sont impliqués dans la RTU, une convention unique est conclue :

- dans la mesure du possible, lorsqu'il s'agit d'un médicament ayant un mécanisme d'action similaire, après accord entre les laboratoires,
- obligatoirement lorsqu'il s'agit d'un médicament princeps et de ses génériques.

La répartition du financement de suivi se fait au prorata du chiffre d'affaires respectif réalisé sur le marché par chacune de ces spécialités, l'année civile précédente.

La décision du 26 octobre 2012 fixe le modèle type de convention qui devra être utilisée (République Française, 22 novembre 2012).

4.2.8. Notification, mise en place et suivi d'une recommandation temporaire d'utilisation

4.2.8.1. Finalisation et notification

L'ANSM envoie par lettre recommandée avec accusé de réception le projet de RTU et le projet de convention au laboratoire.

Le laboratoire dispose d'un délai de un mois (et un mois supplémentaire s'il en fait la demande) à partir de la date de réception du projet pour retourner à l'ANSM la convention signée. A l'expiration de ce délai, le directeur de l'ANSM signe la RTU et la convention.

La RTU et ses mises à jour sont notifiées au laboratoire.

4.2.8.2. Diffusion

Les RTU ainsi que leurs mises à jour sont adressées au ministre chargé de la santé, à la HAS, à l'UNCAM et au Comité Economique des Produits de Santé (CEPS) ainsi qu'à l'INCA et aux centres de référence le cas échéant par l'ANSM. Elles sont rendues publiques sur le site internet de l'ANSM.

Elles sont aussi envoyées aux ordres professionnels concernés (médecins, pharmaciens,...) et sociétés savantes concernées.

Les ordres professionnels concernés informent leurs adhérents de :

- l'existence, la modification, la suspension ou le retrait de la RTU,
- la mise en place d'un suivi de patient,
- la nécessité de remplir une fiche de recueil de suivi dans le cadre de la RTU,
- la nécessité de transmettre la fiche de recueil de suivi au destinataire identifié dans la RTU.

4.2.8.3. Surveillance

L'ANSM s'assure de la sécurité du médicament utilisé dans le cadre d'une RTU, notamment à partir des données collectées dans le cadre du suivi de patients et de celles issues de la pharmacovigilance :

- dans le cadre du protocole de suivi des patients, tout effet indésirable grave dont le laboratoire est informé doit être signalé par le laboratoire à l'ANSM dans les plus brefs délais,
- dans le cadre de la pharmacovigilance comme pour tout médicament, tout effet indésirable constaté par un professionnel de santé, un patient, ou une association agréée de patients doit être signalé par le biais de l'ANSM ou directement au Centre Régionale de Pharmacovigilance (CRPV) dont il dépend géographiquement.

4.2.9. Durée

Une RTU est temporaire, elle ne peut excéder 3 ans.

4.2.10. Modifications, suspension, ou abrogation

L'ANSM se réserve le droit de modifier, suspendre ou retirer la RTU par l'exercice de ses pouvoirs de police sanitaire, dans les cas suivants :

- suspicion de risque pour la santé publique,
- manquement à l'obligation de suivi des patients et de recueil d'informations,
- les conditions légales ne sont plus remplies (nouvelles alternatives thérapeutiques disponibles).

Avant toute décision définitive, une procédure contradictoire obligatoire est mise en œuvre :

- dans un délai d'un mois,
- sauf en cas d'urgence (à justifier au cas par cas).

Dans ce cas, l'ANSM en informe le ministre chargé de la santé, la HAS, l'UNCAM et le CEPS, l'INCA et les centres de référence le cas échéant, les ordres professionnels concernés et les sociétés savantes.

Dans les 6 mois précédant le terme de la RTU, l'ANSM :

- analyse les données de suivi collectées (efficacité et sécurité),
- s'informe sur l'avancement du développement du médicament,
- recherche d'éventuelles nouvelles alternatives disponibles.

4.2.11. Rôle des intervenants : Synthèse

Tableau V : Synthèse des rôles des intervenants dans une recommandation temporaire d'utilisation

ANSM	LABORATOIRE	PRESCRIPTEUR	ORDRES
<ul style="list-style-type: none"> - S'autosaisit lorsqu'elle a connaissance d'une utilisation « hors-AMM » - Demande au laboratoire de lui fournir un dossier comportant toutes les données utiles à l'évaluation de la situation « hors-AMM » - Évalue le rapport Bénéfices/Risques à partir des données transmises par le laboratoire (+ INCA et/ou centre de référence, le cas échéant) et de ses données internes - Signe une convention avec le laboratoire - Approuve le Protocole - Publie la RTU sur son site ou l'avis défavorable 	<ul style="list-style-type: none"> - Transmet les données disponibles - Signe une convention avec l'ANSM « en tant que de besoin » - Met en place un protocole de suivi avec un recueil de données sur l'efficacité, les effets indésirables (avec l'aide du centre de référence dans le cadre des maladies rares) - Informe les prescripteurs - Responsable du bon usage 	<ul style="list-style-type: none"> - Informe le patient que la prescription est « hors-AMM » - Transmet les données du suivi au laboratoire 	<ul style="list-style-type: none"> - Informe leurs adhérents : <ul style="list-style-type: none"> *Existence/Modification/Suspension de RTU *Mise en place suivi patient *Mise en place fiche de recueil

5. Conclusion

Cette partie a étudié les possibilités réglementaires françaises pour mettre à disposition l'ICG pour un usage thérapeutique en France. Deux voies différentes ont été analysées. Au vu de cette analyse, elles semblent complémentaires.

En effet, pour pouvoir obtenir une extension d'indication, un dossier de variation de type II c'est-à-dire un dossier de modification majeure doit être déposé auprès de l'ANSM pour évaluation. Dans le cas de l'ICG, en France seule l'Infracyanine[®] est disponible sur le marché et elle est enregistrée selon une procédure nationale. Les essais cliniques actuellement en cours utilisent l'ICG en tant que photosensibilisateur pour un traitement de thérapie photodynamique. Au vu des données à fournir dans le cadre d'une extension d'indication, il semble qu'il n'y ait à ce jour pas assez de résultats d'efficacité et de sécurité concernant l'ICG en tant que PS pour pouvoir déposer cette demande en l'état. L'ANSM n'aurait pas les données nécessaires pour évaluer le rapport bénéfice/risque de ce médicament dans cette indication et émettre un avis.

Cependant, une autre solution semble être envisageable afin de mettre à disposition ce PS sur le marché français : la recommandation temporaire d'utilisation. Cette spécificité française permet d'encadrer les prescriptions hors AMM. Ne pouvant être initiée par le laboratoire, il faudrait d'abord qu'une société savante ou une association de patient saisisse l'ANSM pour en faire la demande. Cela semble envisageable, par exemple, pour son utilisation dans le traitement de certains cancers après échec des traitements habituels. L'évaluation du rapport bénéfice/risque se baserait sur les données scientifiques (les données cliniques et non cliniques et sur la liste des essais cliniques en cours ou programmés), mais aussi sur le profil de sécurité de l'ICG, et le pronostic et la fréquence de la pathologie à traiter. L'exigence de cette évaluation serait adaptée en fonction de la situation particulière, par exemple, dans le cas de pathologies cancéreuses.

Ainsi, la mise en place de cette RTU permettrait, dans un premier temps, de rendre l'ICG disponible sur le marché français dans le traitement de pathologies sans alternative thérapeutique disponible. Les données recueillies dans le cadre de cette RTU pourraient, ensuite, être versées au dossier de demande de modification de l'AMM existante. Reste que les données ne seront peut-être pas suffisantes, mais viendraient en complément des données des essais cliniques.

Conclusion

L'objectif de cette thèse était, dans un premier temps, de répondre à la question suivante : l'ICG peut-elle être considérée comme un PS pour la PDT? Pour répondre à cette interrogation, nous avons effectué une recherche bibliographique, et recensé tous les articles qui faisaient part de l'utilisation de l'ICG, non pas comme un fluorophore, mais comme un agent thérapeutique.

Cette question reste, en l'état des connaissances actuelles sur cette molécule, non résolue. En effet, une molécule photo-activable peut posséder des propriétés à la fois de fluorescence, et de phosphorescence. Cependant, si elle présente un bon rendement de fluorescence, normalement, son rendement de formation de triplet sera faible. Les résultats des différentes publications, présentant l'ICG comme un bon PS, ne démontrent pas cette propriété de façon directe, c'est-à-dire qu'aucune ne montre la production d'espèces réactives de l'oxygène ou d'oxygène singulet. Cette question, non élucidée, doit continuer d'être étudiée pour comprendre le fonctionnement de l'ICG, et pouvoir démontrer son efficacité tant au niveau scientifique qu'au niveau clinique.

Dans un second temps, l'objectif de cette thèse était d'explorer les voies réglementaires pour mettre à disposition en France cette molécule en tant que PS dans la PDT. La voie la plus envisageable semble être la mise en place d'une RTU. En effet, cette spécificité du droit français permet d'encadrer l'utilisation d'un médicament hors AMM. Cependant, cette solution reste un dispositif temporaire pour une durée maximale de 3 ans après lequel, si les données d'efficacité et de sécurité recueillies sont bonnes et suffisantes, le laboratoire commercialisant l'ICG pourrait déposer une extension d'indication pour le médicament auprès de l'ANSM.

Cependant, les recherches pour comprendre les différentes propriétés de l'ICG doivent se poursuivre pour s'assurer que le rapport bénéfice/risque sur son utilisation en tant que PS sera bien positif.

Références

- ANGHILERI, L et ROBERT, J. 1986.** Hyperthermia in cancer treatment. *CRC Press*. 1986.
- ANSM (Agence N ationale d e S écurité d u M édicament).** Autorisations T emporaires d'Utilisation. [En ligne] [Citation : 08 Mai 2014.] [http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-Temporaires-d-Utilisation-ATU/Autorisations-Temporaires-d-Utilisation/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-Temporaires-d-Utilisation-ATU/Autorisations-Temporaires-d-Utilisation/(offset)/0).
- . Définition e t m o d a l i t é d e s A M M. [En l i g n e] [C i t a t i o n : 0 2 M a i 2 0 1 4 .] [http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/Definition-et-modalite-des-AMM/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/Definition-et-modalite-des-AMM/(offset)/0).
- . Les e s s a i s c l i n i q u e s. [En l i g n e] [C i t a t i o n : 0 5 M a i 2 0 1 4 .] [http://ansm.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Les-essais-cliniques/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Les-essais-cliniques/(offset)/0).
- . **Octobre 2012.** *RTU - Principes et éléments d'information sur les modalités d'élaboration et de mise en oeuvre par l'ANSM*. Octobre 2012.
- Association F rançaise d 'Ophtalmologie.** Dégénérescence M aculaire Liée à l 'âge. *Association Française d'Ophtalmologie*. [En l i g n e] [C i t a t i o n : 0 1 M a i 2 0 1 4 .] <http://www.ophtalmologie.fr/degenerescence-macula-dmla.html>.
- BARTH, B -M, e t a l. 2 0 1 1.** Targeted Indocyanine-Green-Loaded C alcium P hosphosilicate Nanoparticles for in vi vo Photodynamic Therapy of Leukemia. *ACS Nano*. 2011, Vol. 5, 7 (p.5325-5337).
- BÄUMLER, W, e t a l. 1999.** Photo-oxidative ki l l i n g o f h u m a n c o l o n i c c a n c e r c e l l s u s i n g i n d o c y a n i n e g r e e n a n d i n f r a r e d l i g h t. *British Journal of Cancer*. 1999, V ol. 80, 3 -4 (pp.360-36).
- BECHET, D, e t a l. 2008.** Nanoparticles a s v e h i c l e s f o r d e l i v e r y o f p h o t o d y n a m i c t h e r a p y a g e n t s. *Trends Biotechnol*. 2008, Vol. 26, 11 (pp.612-621).
- BENSON, R-C e t KUES, H-A.** Fluorescence properties of indocyanine green a s r e l a t e d t o a n g i o g r a p h y. *Phys Med Biol*. 1978, Vol. 23, 1.
- Biologie et Multimedia.** *Biologie et Multimedia - UPMC - UFR des Sciences de la Vie (UFR 927)*. [En l i g n e] [C i t a t i o n : 0 8 M a i 2 0 1 4 .] <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/>.
- BISCHOFF, P -M e t FLOWER, R -W. 1985.** T e n y e a r s e x p e r i e n c e w i t h c h o r o i d a l a n g i o g r a p h y u s i n g i n d o c y a n i n e g r e e n d y e : a n e w r o u t i n e e x a m i n a t i o n o r a n e p i l o g u e. *Doc Ophthalmol*. 1985, Vol. 60, pp.235-91.

CE (Commission Européenne). Novembre 2007. Guidance on a new therapeutic indication for a well established substance. *Notice To Applicants*. Novembre 2007. Vol. Volume 2C - Regulatory Guideline.

— **September 2009.** Guideline on Summary of Product Characteristics - SmPC. *Notice To Applicants*. September 2009. Vol. Volume 2C - Regulatory Guideline.

— **May 2008.** Presentation and format of the dossier Common Technical Document (CTD). *Notice To Applicants*. May 2008. Vol. Volume 2B.

— **2008.** Règlement (CE) n° 1234/ 2008 concernant l'examen des modifications des termes d'une autorisation de mise sur le marché de médicaments à usage humain et de médicaments vétérinaires. *Journal officiel de l'Union européenne*. 2008.

— **2012.** Règlement (CE) n°712/2012. *Journal officiel de l'Union européenne*. 2012.

CE (Commission Européenne). June 2013. Procedures for marketing authorisation. *Notice To Applicants - Medicinal products for human use*. June 2013. Vol. 2A, Chapter 1 - Marketing Authorisation.

CHERRICK, G-R, et al. 1960. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J. Clin. Invest.* 1960, Vol. 39, pp. 592-600.

CHOUIKRAT, R, et al. 2012. Non Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications: Recent Developments. *Curr. Med. Chem.* 2012, Vol. 19, 6 (pp.781-792).

COULEAUD, P . 2011. Fonctionnalisation par des peptides de nanoparticules hybrides multifonctionnelles pour la thérapie photodynamique ciblant neuropiline-1. *Université de Lorraine*. 2011.

COULEAUD, P , et al. 2010. Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale*. 2010, Vol. 2, 7 (p.1083).

DESMETTRE, T, et al. 1999. Propriétés de fluorescence et particularités métaboliques du vert d'indocyanine (ICG). *J Fr. Ophthalmol.* Masson, 1999, Vol. 22, 9.

DOUGHERTY, T-J, et al. 1998. Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998, Vol. 90, pp. 889-905.

DUCK, F.A. 1990. Properties of tissue including ultraviolet and infrared radiation. *Physical properties of tissue*. 1990.

EMA (Agence Européenne du Médicament). How to prepare and review a summary of product characteristics. [En ligne] [Citation : 05 Mai 2014.]
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000357.jsp&mid=WC0b01ac05806361e1.

- FICKWEILER, S, et al. 1997.** Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1997, Vol. 38, 2 (pp.178-183).
- FLOCK, S-T et JACQUES, S-L. 1993.** Thermal damage of blood vessels in a ratskin-flap window chamber using indocyanine green and a pulsed alexandrite laser: A feasibility study. *Laser Med. Sci.* 1993, Vol. 8, 3 (pp.185-196).
- FLOWER, R-W et HOC HHEIMER, B-F. 1973.** A clinical technique and apparatus for simultaneous angiography of separate retinal and choroidal circulations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1973, Vol. 12, pp.248-61.
- FOX, U e t WOOD, E-H. 1960.** Indocyanine Green : physical and physiologic properties. *Proc Mayo Clin.* 1960, Vol. 35, pp.732-44.
- HALLER, M , e t al . 1 993.** Determination of Plasma-Volume with Indocyanine Green in Man. *Life Sciences*. 1993, Vol. 53, 21.
- HOLLINS, B , N OE, B e t H ENDERSON, JM. 1987.** Fluorometric determination of indocyanine green in plasma. *Clin Chem.* 1987, Vol. 33, pp.765-8.
- HOLLINS, B, N OE, B e t H ENDERSON, J-M. 1987.** Fluorometric determination of indocyanine green in plasma. *Clin Chem.* 1987, Vol. 33, pp.765-8.
- HOPEROSS, M, e t al . 1994.** Adverse reactions due to indocyanine green. *Ophthalmology*. 1994, Vol. 101, 3.
- JANG, M -S et al . 201 1.** A comparative split-face study of photodynamic therapy with indocyanine green and indole-3-acetic acid for the treatment of acne vulgaris. *British Association of Dermatologists*. 2011.
- KERNT, M , e t al . 2 010.** Indocyanine green increases light-induced oxidative stress, senescence, and matrix metalloproteinases 1 and 3 in human RPE cells. *Acta Ophthalmologica*. 2010, Vol. 90, 6 (pp.571-579).
- KLEIN, A, et al. 2013.** Indocyanine green augmented diode laser therapy vs long pulse Nd : YAG (1064 nm) laser treatment of telangiectatic leg veins : A randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2013, Vol. 169, 2 (pp.365-373).
- KUO, W-S, et al. 2010.** Gold Nanorods in Photodynamic Therapy, as Hyperthermia Agents, and in Near-Infrared Optical Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010, Vol. 49, 15.
- . 2011. Near-infrared Au nanorods in photodynamic therapy, hyperthermia agents, and near-infrared optical imaging. *Proceedings of Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications*. 2011, Vol. III.

LABORATOIRES B IOLITECH P HARMA L td. 21 N ovembre 2013. Résumé d es Caractéristiques Produit (RCP) de Foscan 4 mg/ml, solution injectable. 21 Novembre 2013.

LABORATOIRES G ALDERMA I NTERNATIONAL. 7 Dé cembre 2 010. Résumé d es Caractéristiques Produit (RCP) de Metvixia 168 mg/g, crème. 7 Décembre 2010.

LABORATOIRES IPSEN PHARMA. 17 Ju in 2013. Résumé des Caractéristiques Produit (RCP) de Hexvix 85 mg, poudre et solvant pour solution pour administration intravésicale. 17 Juin 2013.

LABORATOIRES NO VARTIS E UROPHARM L td. 2 7 No vembre 2012. Résumé d es Caractéristiques Produit (RCP) de Visudyne 15 mg, poudre pour solution pour perfusion. 27 Novembre 2012.

LABORATOIRES P INNACLE B IOLOGICS B .V. 7 J anvier 2 014. Résumé d es Caractéristiques Produit (RCP) de Photofrin 75 mg, poudre pour solution injectable. 7 Janvier 2014.

LABORATOIRES SERB. 1 M ars 2013. Résumé de s C aractéristiques P roduit (RCP) de l'Infracyanine[®] 25 mg/10 ml, poudre et solvant pour solution injectable. 1 Mars 2013.

LANDSMAN, M -L, e t al . 1976. Light-absorbing p roprieties s tability and s pectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol.* 1976, Vol. 40, 4 (pp.575-83).

LASSALLE, H-P. Cours de photomedecine. *Centre Alexis Vautrin.*

LEEM (Les E ntreprises d u Méd icament). Essais C liniques : pour quoi s ont-ils indispensables ? [En l igne] [Citation : 07 M ay 2014.] http://www.leem.org/sites/default/files/Essais_cliniques.pdf.

—. La r églementation d u m édicament. *Extranet du LEEM .* [En ligne] [Citation : 0 7 M ai 2014.] <http://www.leem.org/sites/default/files/Reglementation-02.pdf>.

—. **26 Jan vier 2012.** Loi n°2011 -2012 du 29 D écembre 2011. *Circulaire n° 12-0059.* 26 Janvier 2012.

MA, Y e t al ., et. 201 2. Biodistribution of i ndocyanine green-loaded n anoparticles w ith surface modifications of PEG and folic acid. *Int J Pharmaceut.* 2012.

MC E VOY, G . 1990. AHFS D rug Information . *American Society of Health System Pharmacists.* 1990, pp.1311-1312.

MOHAMMAD, A e t al , e t. 2009. Biodistribution of E ncapsulated Indocyanine Green i n Healthy Mice. *Molecular pharmaceutics.* 2009.

NOMIKOU, N, e t al . 2012. The E ffects of Ultrasound a nd Light on Indocyanine-Green-Treated Tumour Cells and Tissues. *ChemMedChem.* 2012, Vol. 7, 8 (pp.1465-1471).

OMAR, G -S, WILSON, M e t S -P, N AIR. 2008. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. *BMC microbiology*. 2008, Vol. 8, 1 (p.111).

OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Dossier cancer. [En ligne] [Citation : 01 Mai 2014.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/index.html>.

OTT, P, et al. 1994. Hepatic removal of two fractions of indocyanine green after bolus injection in anesthetized pigs. *Am J Physiol*. 1994, Vol. 266, pp.1108-1122.

PARK, H -S, e t al. 2012. Hyaluronic Acid/Poly (beta-Amino Ester) Polymer Nanogels for Cancer-Cell-Specific NIR Fluorescence Switch. *Macromol. Rapid Commun*. 2012, Vol. 33, 18.

PERNOT, M, et al. Advances in photodynamic therapy.

PHILIP, R , et al . 20 10. Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green. *J. Phys. Condens. Matter*. 2010, Vol. 22, 33.

REINDL, S , e t al . 19 97. Quantum yield of triplet formation for indocyanine green. *J. Photochem. Photobiol*. 1997, Vol. 105, 1 (pp.65-68).

République Française. 22 novembre 2012. Décision du 26 octobre 2012 fixant le modèle type de convention mentionnée l'article L. 5121-12-1 du code de la santé publique. *Journal Officiel de la République Française*. 22 novembre 2012. Texte 13 sur 107.

—. **10 mai 2012.** Décret n° 2012-740 du 9 mai 2012 relatif à la prise en charge dérogatoire par l'assurance maladie des spécialités pharmaceutiques bénéficiant d'une recommandation temporaire d'utilisation ou de certains produits et prestations. *Journal Officiel de la République Française*. 10 mai 2012. 96 sur 308.

—. **10 mai 2012.** Décret n° 2012-742 du 9 mai 2012 relatif aux recommandations temporaires d'utilisation des spécialités pharmaceutiques. *Journal Officiel de la République Française*. 10 mai 2012. Texte 98 sur 308.

—. **20 Janvier 2013.** Décret n°2013-66 du 18 janvier 2013 relatif aux autorisations temporaires d'utilisation des médicaments. *Journal Officiel de la République Française*. 20 Janvier 2013. 4 sur 62.

—. **30 décembre 2011.** Loi n° 2011-2012 du 29 décembre 2011 relative au renforcement de la sécurité sanitaire du médicament et des produits de santé. *Journal Officiel de la République Française*. 30 décembre 2011. Texte 1 sur 170.

RUSSIN, T -J, e t al . 2 010. Measuring the fluorescent quantum efficiency of indocyanine green encapsulated in nanocomposite particulates. *J. Phys. Condens. Matter*. 2010, Vol. 22, 33.

SADOQI, M, et al. 2006. *Biological and pharmaceutical nanomaterials*. 1st ed. Weinheim, 2006.

SAXENA, V, SADOQI, M et SHAO, J. 2003. Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* 2003, Vol. 92, 10 (pp.2090-2097).

SHARMA, P, et al . 2012. Gadolinium-Doped Silica Nanoparticles Encapsulating Indocyanine Green for Near Infrared and Magnetic Resonance Imaging. *Small*. 2012, Vol. 8, 18.

SIBATA, C -H, e t al . 2000. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000, Vol. 33, pp. 869-880.

TAICHMAN, G -C, HENDRY, P-J e t KEON, W -J. 1987. The use of cardio-green for intraoperative visualization of the coronary circulation evaluation of myocardial toxicity. *Text Heart Inst J*. 1987, Vol. 14, 2.

TOPAGLU, N , Y UKSEL, S e t G ULSOY, M . 2012. Optimization of parameters in photodynamic therapy to kill *P.Aeruginosa* with 809 nm diode laser and Indocyanine Green. *Proceedings of the SPIES 8210 Photonics*. 2012, Vol. XXI, pp.21-26.

U.S. National Institutes of Health, ClinicalTrials.gov. Essais Cliniques en cours avec l'ICG. [En ligne] [Citation : 24 Avril 2014.] <http://www.clinicaltrials.gov>.

VAN DE N B LESEN, P -R et J ONGSMA, F -H. 1995. Yield of fluorescence from indocyanine green in plasma and flowing blood. *Ann Biomed Eng.* 1995, Vol. 23, 4 (pp.475-81).

VARRIALE, L , e t al . 2000. Selective light-induced modulation of bcl-XL and bax expressions in indocyanine green-loaded U937 cells: effects of continuous or intermittent photo-sensitization with low IR-light using a 805 nm diode laser. *Journal of photochemistry and photobiology*. 2000, Vol. 57, 1 (p.66-75).

VIDAL. Acide-5-aminolevulinique. VIDAL. [En ligne] [Citation : 4 Mai 2014.] http://www.vidal.fr/substances/23012/acide_5_aminolevulinique/.

XIE, J. 2003. *Establishment of a two-dimensional electrophoresis map of human mitochondrial proteins*. BERLIN : Medizinischen Fakultät Charité, 2003.

YASEEN, M, et al. 2007. Stability assessment of indocyanine green within dextran-coated mesocapsules by absorbance spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 2007, Vol. 12, 6 (pp. 064-031).

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 20 Juin 2014

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par : Camille GIRAUDEAU

Sujet : INDOCYANINE GREEN :
FLUOROPHORE OU
PHOTOSENSIBILISATEUR ?**POSSIBILITES REGLEMENTAIRES POUR UNE
MISE A DISPOSITION EN USAGE
THERAPEUTIQUE**Jury :Président : Francine KEDZIEREWICZ, Vice Doyen de la
Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, Nancy
Directeur : Céline FROCHOT, Directeur de Recherche au
CNRS, Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés,
UMR 7274 CNRS, Université de Lorraine, Nancy

Juges :

Véronique FALK, Maître de Conférence, UMR 7274 CNRS,
Université de Lorraine, Nancy
Géraldine MENIN, Docteur en Pharmacie, Directeur du
Service Affaires Pharmaceutiques France, Sanofi Pasteur
MSD, Lyon

Vu,

Nancy, le 15 mai 2014

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

Mme KEDZIEREWICZ

M.

me FROCHOT

Vu et approuvé,

Nancy, le 19.05.2014

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,

Vu,

Nancy, le 27 MAI 2014

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement :

6543

TITRE :

INDOCYANINE GREEN : FLUOROPHORE OU PHOTSENSIBILISATEUR ?
POSSIBILITES REGLEMENTAIRES POUR UNE MISE A DISPOSITION EN USAGE
THERAPEUTIQUE

Thèse soutenue le 20 Juin 2014
Par Camille GIRAUDEAU

RESUME :

L'Indocyanine Green (ICG) est une molécule de la famille des tricarbocyanines qui a été développée durant la seconde Guerre Mondiale. Elle a été approuvée pour la première fois en tant que médicament en 1956 par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis. En France, elle est commercialisée sous le nom d'Infracyanine® et est utilisée pour un usage diagnostique uniquement. Sa principale utilisation est pour l'imagerie médicale en raison de ses propriétés photophysiques d'absorption et de fluorescence dans le proche infra-rouge. Cependant, des chercheurs ont émis l'hypothèse que l'ICG pourrait servir de photosensibilisateur pour la thérapie photodynamique (PDT) grâce à ses potentiels effets phototoxiques *in vitro* et *in vivo* en présence de lumière à une longueur d'onde adaptée. Cette dernière propriété de l'ICG est actuellement à l'étude dans différents essais cliniques dans le monde. Nous avons recensé, dans cette thèse, toutes les études de la littérature qui traitent de l'utilisation de l'ICG comme potentiel agent thérapeutique. D'autre part, compte tenu de l'importance de cette nouvelle indication thérapeutique, il est intéressant d'étudier les différentes voies réglementaires permettant d'être à disposition des patients et traitement. La première voie réglementaire est la demande de variation pour obtenir une extension d'indication. En complément de cette voie "classique", nous avons également étudié la possibilité d'une mise à disposition anticipée selon une voie réglementaire alternative, la recommandation temporaire d'utilisation (RTU), qui a été introduite dans la réglementation française par la Loi du 29 décembre 2011, concernant le renforcement de la sécurité sanitaire du médicament et des produits de santé. Au vu des données disponibles, cette dernière voie semble dans un premier temps la plus envisageable pour la mise à disposition en usage thérapeutique de l'ICG. Elle permettra de recueillir plus de données sur l'ICG dans cette indication et ainsi d'envisager dans un second temps une demande d'extension d'indication.

MOTS CLES : Indocyanine Green – Vert d'Indocyanine - effet cytotoxique – fluorescence – thérapie photodynamique – extension d'indication – Loi Bertrand – recommandation temporaire d'utilisation

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Céline FROCHOT	Directeur de Recherche au CNRS, Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274 CNRS, Université de Lorraine, Nancy	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 3

THEMES : 1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle