(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
13 juin 2019 (13.06.2019)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2019/110485 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/483 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2018/083305

(22) Date de dépôt international :
03 décembre 2018 (03.12.2018)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1761651 05 décembre 2017 (05.12.2017) FR

(71) Déposant : **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR] ; 3 rue Michel Ange, 75016 PARIS Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs : **LARRIEU, Guilhem** ; LAAS, 7, avenue du Colonel Roche, 31400 Toulouse (FR). **CASANOVA, Adrien** ; LAAS, 7, avenue du Colonel Roche, 31400 Toulouse (FR).

(74) Mandataire : **VIDON BREVETS & STRATÉGIE** ; P. O. Box 90333 Technopôle Atalante, 16B rue de Jouanet, 35703 Rennes Cedex 7 (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,

WO 2019/110485 A1

(54) **Title:** NANOSTRUCTURE PLATFORM FOR CELLULAR INTERFACING AND CORRESPONDING MANUFACTURING PROCESS

(54) **Titre :** PLATEFORME DE NANOSTRUCTURES POUR L'INTERFAÇAGE CELLULAIRE ET PROCEDE DE FABRICATION CORRESPONDANT

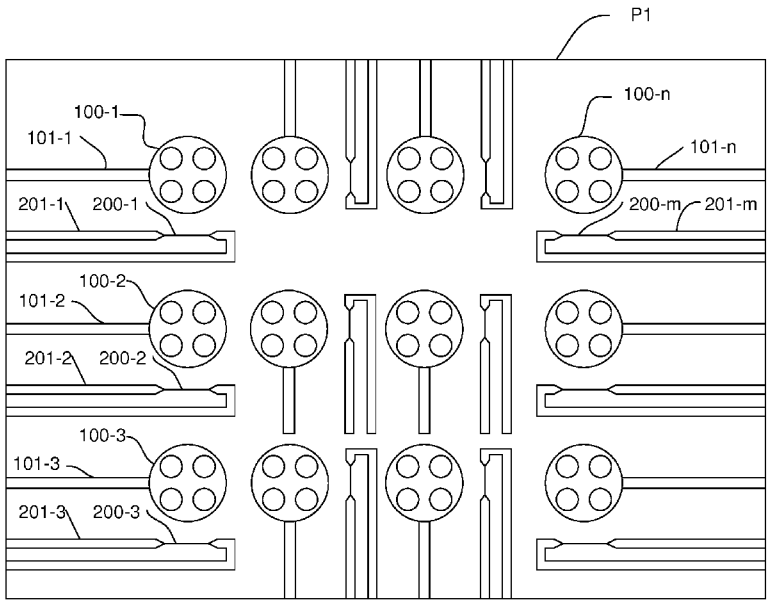


Figure 2

(57) **Abstract:** The invention relates to a platform for cellular interfacing, comprising at least one nanoprobe based on nanowires, each of which comprises a conductive end intended to be in contact with a cell. According to the invention, such a platform comprises at least one field effect transistor, referred to as a nano-FET, placed at a predetermined distance from said nanoprobe.

(57) **Abrégé :** L'invention se rapporte à une plateforme pour l'interfaçage cellulaire, comprenant au moins une nano-sonde à base de nano-fils comprenant chacun une extrémité conductrice destinée à être en contact avec une cellule. Selon l'invention, une telle plateforme comprend au moins un transistor à effet de champs, dit nano-FET positionné à une distance prédéterminée de ladite nano-sonde.

[Suite sur la page suivante]

SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

Plateforme de nanostructures pour l'interfaçage cellulaire et procédé de fabrication correspondant

1. Domaine

La présente technique se rapporte aux domaines des nanostructures et plus particulièrement des nanostructures à destination de captation de phénomènes biologiques. Plus particulièrement, la présente technique se rapporte à une plateforme de mesure et de stimulation de cellules de type neurales ou encore de cardiomyocytes, et plus généralement à tout type de cellules dont il est envisageable de capter une activité électrique ou électrophysiologique, pouvant être des cultures cellulaires dissociées (neurones, cellules musculaires cardiaques, ...), des cultures tissulaires d'organe ou des tranches de tissus (hippocampe, cervelet, moelle épinière, rétine, ...) ou des cultures de cellules dérivées de cellule souches.

2. Art Antérieur

L'étude des états électrophysiologiques des cellules excitables (neurones, cardiomyocytes) et des groupes et réseaux formés par ces cellules permet d'améliorer la compréhension des états fonctionnels et pathologiques des organes auxquels ces cellules se rapportent. L'état électrophysiologique de la cellule est traditionnellement étudié avec des sondes qui peuvent avoir accès à l'intérieur (cytoplasme) de la cellule, permettant ainsi les mesures des fluctuations de potentiels d'une ou plusieurs cellules dans un réseau de cellules. Ces sondes comprennent des « patch-clamp » avec micropipette en verre, des matrices de microélectrodes/ nanoélectrodes (MEAs / NEA), et des nano-fils (nano-sonde) à effet de champs (FET), et avec différents matériaux, tels que des réseaux de nano-fils verticaux en sillicium (Si), platine (Pt) et oxyde d'iridium (IrOx).

Des électrodes de micropipette en verre avec un procédé de « patch-clamp » ont traditionnellement été utilisées. Elles permettent de réaliser des mesures de bonne qualité, mais d'une part elles ne peuvent pas être utilisées pour un grand nombre de cellules de manière simultanée (de fait de la difficulté de mise en œuvre de ces sondes) et d'autre part elles entrainent la mort des cellules à relativement court terme, de fait de la pénétration de la micropipette au sein de la cellule.

Plus récemment, les développements technologiques ont permis de développer des réseaux de microélectrodes planaires qui sont devenus des plateformes standards de l'étude des réponses électrophysiologiques des réseaux cellulaires sur de longues périodes (plusieurs

semaines). Ces réseaux de microélectrodes présentent l'avantage de ne pas altérer l'enveloppe de des cellules et donc de ne pas entrainer la mort prématurée de celles-ci. Cependant, les réseaux de microélectrodes planaires présentent l'inconvénient de ne pas pouvoir accéder au cytoplasme cellulaire et donc de ne pas pouvoir mesurer les variations de potentiel à l'intérieur de la cellule de manière aussi précise que les électrodes à micropipette. Or la mesure des variations de potentiels est une donnée importante qu'il convient de mesurer. Le problème principal réside cependant de ces réseaux existants et de ces plateformes est la faible interaction cellule/microélectrodes qui induit des signaux (potentiel d'action) très dégradés en termes d'amplitude et donc difficilement utilisables.

Les plateformes et réseaux à base de microélectrodes ont fait l'objet de développements technologiques importants, tels que ceux présentés dans les documents US7,905,013 et WO2017127551.

Dans l'exemple de US7,905,013, une couche diélectrique sur une couche conductrice est gravée sélectivement à l'état humide, formant des trous de contact avec des parois inclinées dans la couche diélectrique et exposant des régions de la couche conductrice. Des interfaces neuronales de nano-fils IrOx sont ensuite développées à partir des régions exposées de la couche conductrice. Les interfaces neuronales à nano-fils IrOx ont chacune une section transversale comprise entre 0,5 et 10 micromètres, une hauteur moyenne comprise entre environ 10 nanomètres (nm) et environ 10 micromètres (µm) et un diamètre d'extrémité proximal moyen dans une plage d'environ 1 nm à environ 1 µm. Zhang rapporte des grappes de sondes sur des puces allant de 1 à 100 millimètres carrés. Les groupes comprennent chacun de 2 à jusqu'à 12 électrodes, situées dans un diamètre de groupe compris entre 5 et 50 micromètres, le nombre de groupes sur la puce étant compris entre 2 et 100.

Dans l'exemple de WO2017127551, un réseau de capteurs à sonde neurale est décrit. Un tel réseau comprenant un substrat avec un motif métallique sur celui-ci. Un réseau de sondes de nano-fils verticaux semi-conducteurs s'étend à distance du substrat, et les sondes sont adressées électriquement, de manière individuelle, à travers le motif métallique. Le motif métallique est isolé avec un diélectrique, et les parties de base et les tiges des nano-fils sont également de préférence isolées. Cette plateforme permet de stimuler individuellement les cellules qui prennent place sur les nano-fils.

Bien que permettant de mesurer les potentiels électriques des cellules qui ont une activité électriques, voire de les grouper en réseaux ordonnés de cellules, ces plateformes ne permettent

pas de mesurer tout à la fois les potentiels électrique et les concentrations d'ions extracellulaires. Or l'obtention de ces deux informations est préférable afin de permettre une meilleure analyse des phénomènes électrochimiques qui parcourent les réseaux de cellules.

3. Résumé

La présente technique a été construite sur la base de ces problèmes de l'art antérieur. Plus particulièrement, la présente technique se rapporte à une plateforme de mesure et de stimulation de cellules de type neurales ou encore de cardiomyocytes, et plus généralement à tout type de cellules dont il est envisageable de capter une activité électrique ou électrophysiologique. Plus particulièrement, une plateforme de ce type améliore les plateformes connues en ce qu'elle permet tout à la fois de mesurer des potentiels électriques et des concentrations ioniques avec des résolutions cellulaires..

Plus particulièrement, il est proposé une plateforme pour l'interfaçage cellulaire, comprenant au moins une nano-sonde à base de nano-fils comprenant chacun une extrémité conductrice destinée à être en contact avec une cellule, plateforme caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un transistor à effet de champs, dit nano-FET positionné à une distance prédéterminée de ladite nano-sonde.

Ainsi, il est possible, avec cette plateforme, de disposer de nano-dispositifs de détection et/ou de mesure de potentiel et de concentration ionique, sur un même dispositif (la plateforme). Plus particulièrement, grâce à cette plateforme, il est possible de permet de mettre en corrélation le potentiel électrique et les courants ioniques mesurés sur ces cellules.

Selon un mode de réalisation particulier, la plateforme comprend un ensemble de nano-capteurs, chaque nano-capteur comprenant un couple formé d'une nano-sonde et d'un nano-FET espacé d'une distance comprise entre 1 et 5 micromètres.

Ainsi, il est proposé une plateforme comprenant des nano-capteurs, par exemple répartis selon un schéma prédéterminé, qui permet de détecter et/ou mesure l'activité électrophysiologique de cellules en culture et ou en développement, sans qu'il soit nécessaire de conformer la croissance ou le développement de ces cellules. Une plateforme de ce type permet de mesurer les potentiels et les concentrations d'ion d'ensembles de cellules avec une sensibilité supérieure à celle des plateformes antérieures, de par le couplage nano-sonde et nano-FET.

Selon un mode de réalisation particulier, la plateforme comprend un ensemble de nanosondes et un ensemble de nano-FETs répartis sur ladite plateforme pour former au moins un réseau de nano-capteurs comprenant au moins un parcours prédéterminé.

Ainsi, il est proposé une plateforme qui permet tout à la fois de mesurer un potentiel électrique, à l'aide d'au moins une nano-sonde et un courant d'ion en extracellulaire avec un transistor. Dès lors, les mesures réalisables à l'aide d'une telle plateforme sont plus précises et plus fiables que celle réalisées avec les plateformes et méthodes de l'art antérieur.

Selon une caractéristique particulière, la plateforme comprend en outre, des zones hydrophiles localisées au niveau des nanosondes et dudit au moins un nano-FET.

Selon une caractéristique particulière, la plateforme comprend une pluralité de parcours prédéterminés, chaque parcours prédéterminé reliant au moins deux nanosondes dudit réseau de nanosondes.

Selon une caractéristique particulière, la plateforme comprend en outre, des zones hydrophiles localisées au niveau desdits parcours prédéterminés.

Ainsi, il est possible de favoriser la croissance des cellules sur les zones hydrophiles, et donc il est possible de conformer la croissance et le développement des cellules aux emplacements ou sont disposés les nano-dispositifs de mesure et de stimulation des cellules.

Selon une caractéristique particulière, chaque parcours prédéterminé entre deux nanosondes comprend une pluralité de nano-FETs, chaque nano-FET étant implanté à intervalles réguliers le long du parcours.

Selon une caractéristique particulière, chaque parcours prédéterminé entre deux nanosondes comprend une pluralité de nanosondes de parcours, chaque nano-sonde de parcours étant implantée à intervalles réguliers le long du parcours.

Selon un mode de réalisation particulier, ladite au moins une nano-sonde comprend entre un et neuf nano-fils.

Ainsi, la constitution de ces nanosondes, à base de un à neuf fils, permet de favoriser l'interaction entre la sonde et la cellule ; En effet, les inventeurs ont constaté qu'un nombre de fil réduit (et donc une densité de fil moins importante) sur une sonde permet à la cellule, et plus particulièrement au soma, d'épouser plus complètement la sonde, et in fine, favorise la mesure ou la stimulation. Dans un mode de réalisation particulier, une nano sonde de soma comprend quatre nano-fils.

Selon un mode de réalisation particulier, le nano-FET est un transistor à ailette de type fin-FET.

Selon un autre aspect, l'invention se rapporte également à un procédé de fabrication d'une plateforme pour l'interfaçage intracellulaire, procédé de type descendant. Selon l'invention, un tel procédé comprend, postérieurement à une étape de structuration verticale d'au moins une nano-sonde à base de nano-fils, une étape de structuration planaire d'au moins un transistor à effet de champs, dit nano-FET.

Selon une caractéristique particulière, postérieurement à l'étape de structuration planaire dudit au moins un nano-FETs, ledit procédé comprend une étape de siliciuration de platine, provoquant l'implantation d'une couche de siliciure de platine (PtSi) sur ladite au moins une nano-sonde et sur des zone source (S) et de drain (D) dudit au moins un nano-FET.

Selon une caractéristique particulière, ledit procédé comprend en outre une étape d'adjonction, sur les nano-fils de ladite au moins une nano-sonde, d'un matériau organique conducteur, tel que le PEDOT:PSS.

Selon une caractéristique particulière, postérieurement à l'étape de structuration planaire dudit au moins un nano-FETs, ledit procédé comprend une étape de fonctionnalisation de la surface de ladite plateforme définissant une pluralité de zones hydrophiles.

4. Dessins

D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront plus clairement à la lecture de la description suivante d'un mode de réalisation préférentiel, donné à titre de simple exemple illustratif et non limitatif, et des dessins annexés, parmi lesquels :

- la figure 1 décrit le principe de spécialisation de surface optionnellement mis en œuvre sur une plateforme de la présente technique ;
- la figure 2 décrit un premier mode de réalisation d'une plateforme de la présente technique ;
- la figure 3 décrit un deuxième mode de réalisation d'une plateforme de la présente technique ;
- la figure 4a est une représentation microscopique d'une nano-sonde de la présente technique ;
- la figure 4b est une représentation microscopique d'un nano-FET de la présente technique ;
- la figure 5 est une représentation microscopique d'un nano capteur comprenant une nano-sonde et un nano-FET ;

- la figure 6 est une représentation simplifiée du procédé de fabrication d'une plateforme dans un mode de réalisation particulier.

5. Description

5.1. Rappels des principes

Comme exposé précédemment, la présente technique se rapporte à une plateforme de détection, de mesure et de stimulation pour l'interfaçage intra-neuronal à l'échelle de la cellule individuelle. La plateforme repose sur des nano-dispositifs à base de nanostructures à ratio surface/volume très élevés (nano-fils (NFs), nano-ailettes (Fin) qui combinent des réseaux verticaux (clamps) et des réseaux horizontaux (nano-transistors). Ces nano dispositifs permettent de réaliser des mesures de haute sensibilité.

Ainsi, des nanostructures forment la base de nos nano dispositifs (nanosondes, nano-FETs) d'enregistrement comprenant une interface à base de « PtSi ») qui rendent possibles un enregistrement de très bonne résolution tout en restant isolé du milieu de culture. Plus particulièrement une plateforme de la présente technique comprend à la fois des nanosondes de mesure et de stimulation de cellules, à base de nano-fils verticaux et des transistors à effet de champs (nano-FETs) de mesure des concentrations d'ions traversant les cellules. La combinaison de ces deux types de nanodispositif sur la plateforme permet de réaliser des mesures de plus grande précision tout en garantissant une survie sur le « long » terme des cellules (plusieurs jours, voire semaines), de fait du caractère faiblement intrusif des nanostructures ainsi que de l'isolation entre le milieu de culture de la cellule et de la plateforme. Coupler sur la même plateforme mais surtout à une distance très réduite (de la taille d'une cellule individuelle, et ce quelle que soit la cellule en question) une nanosonde de mesures de potentiel d'action avec un nano transistor pour la mesure de concentration d'espèces ioniques ouvre de nouveaux champs d'étude en biologie. La distance séparant les deux nanodispositifs est déterminée en fonction de la cellule de destination. Cette distance peut être de quelques dizaines de nanomètre à plusieurs micromètres. Ce couple de capteurs peut être distribué sur la plateforme afin de mesurer l'activité électrique dans un réseau de cellules électriquement excitable ou des tissus ou tranches d'organes comprenant des cellules électriquement excitables. Les mêmes dispositifs peuvent simultanément exciter localement (stimuler électriquement) une cellule ou une zone de cellules puis mesurer l'activité sur cette cellule ainsi que sur l'ensemble du réseau après cette stimulation.

Selon la présente technique, un premier mode de réalisation de la plateforme se compose de couples de capteurs (nanosondes verticales et transistors à effet de champs, par exemple de type planaire, espacés par exemple de 1 à 5 µm l'un de l'autre) qui sont distribués régulièrement sur la partie utile de la surface de la plateforme afin de pouvoir accéder à une résolution spatiale du réseau de cellules et/ou de la coupe d'organe étudié, sans conformation de culture (à la différence du deuxième mode de réalisation). Il s'agit de permettre, dans ce mode de réalisation, l'étude de cellules auto-organisées. Par partie «utile de la plateforme, on entend la partie qui sert à effectuer une culture de cellules.

Selon la présente technique, un deuxième mode de réalisation de la plateforme définit un ou plusieurs réseaux de nano-dispositifs qui définissent des emplacements de positionnement et des chemins (parcours) de croissance des prolongements des cellules de sorte à former, lors de la mise en œuvre d'un processus biologique de culture et/ou de croissance de cellules, des réseaux de cellules conformés aux réseaux de nano-dispositifs de la plateforme. Il s'agit de permettre des cultures organisées de cellules.

Quel que soit le mode de réalisation, une plateforme objet de la présente peut tout à la fois être utilisée comme plateforme de détection et/ou de mesure de potentiel et de concentration ionique, mais également comme plateforme de stimulation

Selon la présente technique, dans un autre aspect, la mise en œuvre de ces nano-dispositifs est couplée à une fonctionnalisation de surface capable de précisément localiser les cellules et de guider la croissance des prolongements de celles-ci. Ainsi, les réseaux de dispositifs implantés sur la plateforme permettent de stimuler et d'enregistrer précisément les potentiels d'action générés par ces cellules, directement dans les somas mais aussi le long des prolongements dendritiques et axonals et cela sur plusieurs semaines.

Selon la présente technique, des transistors à nano-fils horizontaux disposés le long de ces prolongements permettent également de pouvoir comparer les enregistrements intra et extracellulaire.

Ainsi, selon la présente technique, les réseaux formés sur la plateforme sont soumis à un traitement surfacique dont la particularité est de favoriser l'implantation et la croissance des cellules à des localisations prédéfinies sur la plateforme. Plus particulièrement, la plateforme est soumise à une fonctionnalisation de surface, qui permet, en culture, de localiser les somas et de guider la croissance des prolongements neuronaux. Il est ainsi possible de stimuler et d'enregistrer précisément les potentiels d'action générés par ces neurones sur la plateforme.

Plus particulièrement, il est optionnellement mis en œuvre, sur la plateforme, une fonctionnalisation de surface auto alignée (S-A-F). Selon la présente technique, cette fonctionnalisation est mise en œuvre postérieurement à la création de la plateforme. Plus particulièrement, la fonctionnalisation de surface est réalisée après la construction des réseaux de nano-dispositifs sur la plateforme. En effet, bien que la problématique de contrôle de la localisation des somas et de leurs extensions pour pouvoir coupler ces cultures organisées avec des dispositifs d'enregistrement nanométriques, ne soit pas nouvelle, les approches actuelles tendent à mixer la micro fabrication de la plateforme et le protocole biologique (consistant à déposer une couche attractive (peptides) sur la surface hydrophile pour favoriser le développement des cellules). Plus particulièrement, dans l'approche conventionnelle *(AC, figure 1) (M. Kwiat, R. Elnathan, A. Pevzner, A. Peretz, B. Barak, H. Peretz, T. Ducobni, D. Stein, L. Mittelman, U. Ashery, and F. Patolsky, "Highly Ordered Large-Scale Neuronal Networks of Individual Cells Toward Single Cell to 3D Nanowire Intracellular Interfaces," ACS Appl. Mater. Interfaces, vol. 4, no. 7, pp. 3542–3549, Jul. 2012.)*, l'étape de photolithographie permettant de définir des zones attractives et répulsives sur la puce, doit être réalisée après le traitement hydrophobe (HPhob) de l'intégralité du substrat. C'est une étape critique puisque la résine (RES) adhère très difficilement sur de telles surfaces (Hphob) et que la qualité du traitement doit être dégradée pour atteindre un niveau d'hydrophobicité compatible avec l'étape de photolithographie. Selon la présente technique (AP, Fig 1), en sus de la capacité à mesurer à la fois les concentrations d'ions et les potentiels électriques, et compte tenu des limitations de l'approche conventionnelle, une méthode de fonctionnalisation chimique complémentaire a été construite, permettant de tirer parti d'un traitement hydrophobe non dégradé, tout en dissociant complètement le protocole de microfabrication (FAB) et le protocole biologique (BIO). Contrairement à l'approche classique, pour laquelle la molécule d'adhésion (AM) se dépose seulement sur les zones ouvertes de la résine structurée par lithographie, la localisation de la molécule d'adhésion est uniquement contrôlée à l'aide du contraste hydrophile/hydrophobe de la surface.

Afin d'être le plus proche possible de la surface finale des puces formant la plateforme de capteurs (SiO_2), les développements sont réalisés sur un substrat de silicium (Si) recouvert de d'environ 600 nm d'oxyde de silicium (SiO_2). La structuration des motifs est effectuée par lithographie à l'aide d'un photo-répéteur i-line sur résine positive ECI (1.1 µm), permettant d'obtenir une résolution inférieure au micron, ainsi qu'une excellente précision d'alignement. Un traitement hydrophobe (HPhob) en phase gaz est ensuite réalisé sur le substrat et ne se fixe que

sur les zones ouvertes de la résine. La résine est alors retirée par bains successifs d'acétone puis de « piranha » (H2O2/ H2SO4 1:1). A ce stade du procédé de fonctionnalisation, la surface de SiO2 présente des zones hydrophiles (zones précédemment protégées par la résine) et des zones hydrophobes (zones ouvertes, HPhob). Le greffage des molécules d'adhésion (AM) (de la solution d'adhésion, par exemple polylysine, polyornithine) est ensuite réalisé sélectivement sur les parties hydrophiles. Grâce à ce procédé de fonctionnalisation auto-aligné, une parfaite dissociation entre le protocole de microfabrication en salle blanche et le protocole biologique est obtenu. La solution d'adhésion n'est déposée qu'au moment de la culture et ne risque pas d'être dégradée lors du retrait de la résine. De plus, la photolithographie s'effectue avant le traitement hydrophobe de la surface ce qui permet d'éviter les problèmes liés à une mauvaise accroche de celle-ci sur le substrat hydrophobe et qui autorise l'utilisation d'un traitement hydrophobe le plus performant possible.

A partir d'une telle plateforme, il est possible de provoquer des stimulations de neurones par des agents chimiques (type simulant de gaz neurotoxiques ou induisant des dépolarisations) ou biologiques pour étudier au plus près des cellules en culture, les réactions et les processus mis en jeu et ce dans un objectif de mise au point de traitements ou de molécules adaptés à curation de maladies et notamment de maladies neuro dégénératives. Les nanosondes captent les potentiels principalement en extracellulaire. Dans quelques cas les sondes peuvent percer spontanément la membrane (très peu de cas) et mesurer le potentiel intracellulaire. On peut forcer l'entrée des sondes en ouvrant la membrane lipidique par stimulation électrique.

A noter que le potentiel électrique intracellulaire ou extracellulaire désigne la même mesure (ce ne sont pas deux potentiels différents). La différence est qu'en extracellulaire le potentiel est écranté par la membrane de la cellule et sa résolution est théoriquement plus faible. Néanmoins grâce aux nanosondes, l'affinité entre la nano-sonde et la cellule est très grande ce qui permet bien qu'étant en mesure extracellulaire d'accéder à des résolutions de signaux qui sont de très bonne qualité, bien meilleures que celles mesurées avec des microélectrodes conventionnelles. Quel que soit le mode de réalisation envisagé, la plateforme objet de l'invention offre la possibilité d'interfacer une même cellule avec deux types de nanodispositifs différents, offrant ainsi de nouvelle possibilités d'étude des cellules.

5.2. Description d'un premier mode de réalisation

Comme explicité, la présente technique a été mise en œuvre pour définir une plateforme de détection, de mesure et de stimulation de cellules, et plus particulièrement de cellules électro-sensibles. La présente technique concerne une plateforme de détection et/ou de mesure et/ou

stimulation à base de nanosondes et un procédé d'utilisation d'une telle plateforme pour effectuer des mesures électrophysiologiques. Dans ce premier mode de réalisation de la plateforme de la présente technique, comme illustré sur la Figure 2, des couples {nanosondes, nano-FET} sont régulièrement implantés sur la plateforme. L'objectif, dans ce mode de réalisation est d'obtenir des mesures de potentiels d'action et de concentration ionique au niveau des cellules. Chaque couple {nanosondes, nano-FET} forme un nano capteur indépendant. Au sein d'un capteur, chaque nano dispositif est adressable indépendamment : chaque nano dispositif dispose d'une ligne d'accès à partir de la périphérie de la plateforme. Dans ce mode de réalisation, des nano-FET sont des transistors à effet de champs à ailette, également appelés fin-FET. La disposition des nano-capteurs est effectuée en fonction des besoins : l'espacement entre les nano-capteurs, notamment, peut être fonction de la destination de la plateforme, c'est-à-dire d'une spécialisation de la plateforme, notamment au niveau des types de cellules à cultiver : certains types de cellules peuvent requérir des espacements plus grands ou plus petits entre les capteurs, par exemple pour éviter que deux capteurs ne soient positionnés sous une cellule unique. On note que les nanosondes ne sont pas constitués de deux nanodispositifs fabriqués indépendamment les uns des autres, mais bien de deux nanodispositifs fabriqués conjointement.

Dans ce premier mode de réalisation de la plateforme de la présente technique, comme illustré sur la figure 2, la plateforme P1, dispose d'un ensemble de nanosondes (100-1,...100-n) comprenant un à neuf nano-fils verticaux (par exemple quatre pour favoriser la descente de la cellule sur la nano sonde) directement en contact avec une ligne d'accès conductrice (101-1,... 101-n). Cet ensemble est destiné à accueillir des cellules en culture ou en observation. Chaque nano-sonde, excepté sa pointe et sa ligne d'accès conductrice (101-1...), est recouverte d'une couche isolante (non représentée). Les nanosondes (100-1,...100-n) sont en communication avec un pourtour de la plateforme via une ligne d'accès conductrice (101-1,... 101-n) dédiée, qui est connectable (connectée) électriquement à un instrument (également non représenté) pour générer ou détecter un signal électrique. La plateforme peut ainsi être utilisée pour étudier les interactions neurones-neurones, par exemple en envoyant un signal électrique dans un neurone d'un réseau neuronal via une ou plusieurs nano-sonde(s) en contact électrique avec ce neurone puis en détectant les signaux électriques d'un autre neurone du réseau via les nanosondes en contact avec cet autre neurone.

En sus de ces nanosondes, la plateforme P1 comprend des transistors à ailettes de silicium (fin-FET) permettant de détecter et mesurer les *concentrations d'ion en extracellulaire*

(concentration ionique). Ces fin-FETs (200-1,...200-m) sont disposés au plus proches des nanosondes pour mesurer les concentrations ioniques résultantes. Chaque fin-FET est associé à une nano-sonde afin de former un couple {nano-sonde, fin-FET} appelé nano-capteur. Les nano-FETs (200-1,...200-m) sont en communication avec un pourtour de la plateforme via une ligne d'accès conductrice (201-1,... 201-m) dédiée, qui est connectable (connectée) électriquement à un instrument (également non représenté) pour détecter un signal électrique et plus particulièrement une concentration d'ion en extracellulaire. Ainsi, lorsqu'une activité électrique se propage dans les cellules, les nanosondes peuvent mesurer le potentiel se propageant (et notamment la vitesse de propagation de celui-ci) d'une cellule à l'autre, tout autant que les potentiels électriques de départ et d'arrivée, ainsi que les concentrations ioniques. Seuls quelques capteurs sont représentés sur la figure pour plus de lisibilité. La figure 4a est une représentation microscopique d'une nano-sonde à quatre fils verticaux de la plateforme. La figure 4b est une représentation microscopique d'un fin-FET de la plateforme. La figure 5 est une représentation microscopique d'une nano-sonde à un fil vertical associé à un fin-FET pour former un nano-capteur tel que présenté précédemment.

Dans ce premier mode de réalisation, l'objectif est de permettre une observation des comportements de groupes de cellules en croissance et/ou en culture, sans contraindre ces dernières.

5.3. Description d'un deuxième mode de réalisation.

Dans ce deuxième mode de réalisation de la plateforme de la présente technique, comme illustré sur la Figure 3, une cellule neuronale CN0 (ses axones ou dendrites étant marqués CN0a) est mise en contact avec la surface de la plateforme P1, qui dispose d'un réseau de nanosondes de somas (100-1,... 100-n) comprenant un à neuf nano-fils (par exemple quatre) verticaux directement en contact avec une ligne d'accès conductrice (101-1,... 101-n). Ce réseau, primaire, est appelé réseau de nanosondes de somas car il est destiné à accueillir les somas des cellules, à la différence, comme cela est exposé ci-après, de nanosondes de parcours. Chaque nano-sonde, excepté sa pointe et la ligne d'accès conductrice, est recouverte d'une couche isolante (non représentée). Les nanosondes de somas (100-1,... 100-n) sont en communication avec un pourtour de la plateforme via une ligne d'accès conductrice (101-1,... 101-n) dédiée, qui est connectable (connectée) électriquement à un instrument (également non représenté) pour générer ou détecter un signal électrique. La plateforme peut ainsi être utilisée pour étudier les interactions neurones-neurones, par exemple en envoyant un signal électrique dans un neurone d'un réseau neuronal via une ou

plusieurs nano-sonde(s) en contact électrique avec ce neurone puis en détectant les signaux électriques d'un autre neurone du réseau via les nanosondes en contact avec cet autre neurone.

En sus de ces nanosondes, la plateforme P1 comprend des transistors à ailettes de silicium (nano-FET) permettant de détecter et mesurer les *concentrations d'ion en extracellulaire (concentration ionique). Ces nano-FETs* (200-1,... 200-m) sont disposés au plus proches des nanosondes de soma pour mesurer les concentrations ioniques résultantes. Des capteurs (nanosondes ou nano FETs) sont également répartis sur les chemins pour suivre la propagation Ces chemins permettent de relier les différentes nanosondes de somas (100-1,... 100-n) entre elles pour former un réseau de nano sondes de somas. L'objet de ces chemins (parcours) préétablis, comme exposé précédemment, est de guider la culture des cellules selon des paramètres prédéterminés. L'objectif de ce guidage étant de constituer un réseau de cellules reliées entre elles, de sorte à pouvoir mesurer des valeurs de potentiels et de quantité de courant ionique entre ces cellules lorsqu'elles sont positionnées (cultivées) sur le réseau de nanosondes et que les dendrites ou axones permettent la propagation de courant électrique d'une cellule à l'autre. Afin de garantir des mesures précises, les nanosondes ou nano-FETs sont positionnés le long de parcours (chemins) dont on sait, de par la spécialisation de surface de la plateforme, qu'ils seront les réceptacles des dendrites ou axones des cellules lors de leur croissance. Les nano-FETs (200-1,... 200-m) sont en communication avec un pourtour de la plateforme via une ligne d'accès conductrice (201-1,... 201-m) dédiée, qui est connectable (connectée) électriquement à un instrument (également non représenté) pour détecter un signal électrique et plus particulièrement un courant d'ion. Ainsi, lorsqu'une activité électrique se propage dans les cellules, les nanosondes peuvent mesurer le potentiel se propageant (et notamment la vitesse de propagation de celui-ci) d'une cellule à l'autre, tout autant que les potentiels électriques de départ et d'arrivée ainsi que les concentrations ioniques.

Dans au moins un mode de réalisation, tel que celui présenté en relation avec la figure 3 un parcours entre deux nano sondes de soma comprend des nano-FETs (300-1,..., 300-l) et/ou des nanosondes de parcours (400-1,..., 400-j). Ces nanosondes de parcours permettent de mesurer le potentiel électrique à différentes localisations de la dendrite ou de l'axone (seuls deux chemins sont représentés sur la figure pour plus de lisibilité).

Les nanosondes et nano-FET (transistors à ailettes de silicium) utilisés dans la présente technique peuvent être formés de n'importe quel matériau électriquement conducteur, de préférence un matériau inorganique, tel que du silicium, un métal, un semi-conducteur composé,

un oxyde conducteur et un siliciure. La couche isolante revêtue sur les composants de cette plateforme est formée d'un matériau à faible cytotoxicité, tel que l'oxyde de silicium, l'oxyde d'aluminium et le nitrure de silicium. Les pointes des nano-sonde sont soit exposées (c'est-à-dire exemptes d'une couche de revêtement isolante) soit revêtues d'une couche électriquement conductrice, comme cela est explicité par la suite dans le cadre de la présentation du procédé de fabrication de ladite plateforme, selon une approche descendante. La couche conductrice électrique est également formée d'un matériau à faible cytotoxicité, tel que l'or, l'argent et le platine, un alliage de ces métaux ou un matériau organique conducteur (par exemple pedot :pss).

5.4. Détails du procédé de fabrication de plateforme en co-intégration

Une plateforme de mesure à base de nano-fils, telle que présentée précédemment, est obtenue à partir d'un substrat 4 pouces de silicium sur isolant (SOI) (Si actif 4µm/Oxyde enterré 1µm/substrat 400µm). Une approche (descendante) *« top-down »* est utilisée avec un procédé de fabrication en photolithographie UV à l'aide d'un photorépéteur i-line suivi d'une gravure plasma RIE, afin de réduire les coûts de fabrication et de faciliter une fabrication à grande échelle. Pour augmenter la reproductibilité du procédé sur l'ensemble du substrat, une couche anti-réflective (BARC) est utilisée sous la résine photosensible.

Plus particulièrement, en relation avec la figure 6, le procédé de fabrication comprend les étapes suivantes, qui sont réalisées sur une base comprenant un substrat sur lequel est déposée une couche de 1µm de dioxyde de silicium (SiO_2), elle-même recouverte d'une couche de silicium (Si) monocristallin de 4µm :

- fabrication (E10) de nano-Fils verticaux : structuration verticale de la plateforme ;
    - cette fabrication se base sur une technique de Photolithographie, comprenant un dépôt local d'un motif de résine qui sert de masque de protection (nano-plot résistant de 500 nm de diamètre), en utilisant une résine organique conventionnelle (par exemple de type ex : ECI 3012) ; et
    - gravure RIE (gravure ionique réactive profonde) de 3,5 µm : gravure sèche par bombardement d'ions (issus d'un plasma) ; cette technique présente l'avantage d'une forte anisotropie de la gravure: la frontière entre les zones gravées et non gravées sera la plupart du temps rectiligne et verticale ; la résine restante est retirée par gravure chimique (résine issue de la sous étape précédente) ;

- à l'issue de cette première étape, on dispose sur la plateforme de nano fils verticaux, formant des groupes constitués de 1 à 4 nano-fils et répartis sur la plateforme pour former un embryon de réseau, qui est retravaillé dans les étapes suivantes afin de leur adjoindre la propriétés attendues ;

- création (E20) des nano-FET et des lignes d'accès : structuration planaire de la plateforme :
  - dépôt d'une photo-résine épaisse (5 µm) pour protéger et ne pas détériorer les nano-fil précédemment obtenus ;
  - photolithographie pour définir la zone à masquer selon un procédé identique à celui de l'étape précédente pour dessiner les nano-FETs (canaux et lignes d'accès), ainsi que les lignes d'accès des nanosondes ;
  - gravure jusqu'à atteindre l'oxyde enterré (ou Burried Oxide – BOx) du SOI : le silicium est creusé sur une profondeur d'environ 0,5µm.
  - à l'issue de cette deuxième étape, on dispose sur la plateforme de nano fils verticaux et d'embryon de nano-FET , rattachés par les lignes d'accès à des contacts électriques au bord de la plateforme, qui comme les nano-fils, sont répartis sur la plateforme pour compléter le ou les réseaux de groupes de nano-fils ;

- amincissement (E30) conjoint des volumes des nano-fils et des ailettes des nano-FETs par oxydation sacrificielle :
  - une oxydation humide à environ 850 °C pendant une durée de 60 mn pleine plaque est réalisée ; cette opération permet de préparer la réduction de diamètre des nano-fils d'environ 500 nm à environ 200 nm et de préparer l'amincissement du canal du nano-FET à environ 20nm ;
  - cette opération permet également d'éliminer les défauts de surface induits par la gravure plasma et d'améliorer l'anisotropie de la nano-sonde ;
  - le canal de chaque nano-FET est ensuite protégé par de la résine par photolithographie ;
  - puis une gravure humide Buffer HF (5%) est effectuée : elle permet de retirer l'oxyde sur l'ensemble des surfaces, à l'exception de celles des canaux des nano-FET car la résine n'est pas attaquée: chaque canal est, de reste, recouvert d'oxyde (SiO_2).

- dopage (E40) de type P des zones source (S) et drain (D) des nano-FET, des nano-Fil et des lignes d'accès :

- cette étape consiste en une implantation de Bore à 10^{20}atm/cm3 sur l'ensemble de la plateforme à l'exception des canaux des nano-FET, qui restent protégés par la résine de l'étape précédente ;
- le canal n'est pas dopé afin de conserver la sensibilité de celui-ci.

- retrait de la résine de masquage du canal des nano FET et recuit d'activation du dopant :
  - La résine est retirée du canal et le dopant est activé par température (environ 1000°c pendant environ 30 minutes) ;
  - cette phase de recuit active électroniquement le dopant dans le silicium ;
  - à l'issue de cette étape, on dispose d'une plateforme comprenant les nano-Fils verticaux, les zones S et D des nano-FET et les lignes d'accès en Si dopé : seuls les canaux restent recouverts d'oxyde.
- siliciuration (E50) du platine :
  - pour créer des zones S et D (des nano FET) faiblement résistives et améliorer l'interface entre la nano-sonde et le milieu liquide, une étape de dépôt isotrope de platine pleine plaque est effectuée ;
  - un recuit d'activation (500°C pdt 3 mn) permet ensuite de créer l'alliage *PtSi* ; L'avantage ici est que le *PtSi* ne se crée que lorsque le *Pt* est en contact direct avec le *Si* et non du SiO_2 : la technique employée permet donc de ne pas avoir de *PtSi* sur le BOx (constitué de SiO_2), ni sur le canal des nano-FETs, permettant ainsi de conserver la sensibilité de mesure de ceux-ci.

On note ici un avantage du procédé de fabrication tel que proposé : il n'est pas nécessaire de réaliser une étape de lithogravure pour l'implantation sur le métal : on n'a pas besoin de couvrir le canal par de la résine car il est déjà protégé par de l'oxyde de Si. Il ne s'agit cependant pas du seul avantage : cette étape de siliciuration du platine permet d'augmenter fortement l'intégration des nano-dispositifs, tout en autorisant une forte biocompatibilité avec le milieu vivant et ce grâce au recuit d'activation du platine sur le *Si*.

- gravure (E60) sélective du *Pt* par rapport au *PtSi* à l'eau régale (mélange chimique de HCl : HNO_3 : EDI qui permet de graver seulement le métal : le silicium n'est pas attaqué) :
  - il s'agit d'une étape de gravure chimique sélective qui permet de graver le *Pt* non transformé (issu de l'étape précédente) sans attaquer le *PtSi* : le *Pt* (non transformé) est donc ôté du BOX et des canaux des nano-FET ;

- L'intérêt du PtSi est double : du point de vue des nanosondes il ne s'oxyde pas (en comparaison du Si seul) et permet de conserver une faible impédance d'interface électrolyte/sonde dans le temps ; du point de vue des nano-FETs : il délivre une faible résistance de contact surface/volume améliorant la sensibilité des nano-FETs.

- métallisation (E70) à l'aluminium (Alu) permettant réduire la résistance des lignes d'accès :
  - un dépôt conforme sur l'ensemble de la plateforme d'Alu (500 nm) suivi d'une photolithographie et d'une gravure chimique de l'alu non protégé par la résine *« etch-back »* sont ensuite mis en œuvre pour métalliser les lignes d'accès ;
  - l'alu n'est conservé que sur les lignes d'accès.
- isolation (E80) de la plateforme par rapport au milieu :
  - Un oxyde (oxyde d'isolation) est ensuite déposé de manière conforme pour isoler les nano fils et les nano-FETs du (futur) milieu de culture : l'oxyde employé peut être du SiO2, de AL2O3 ou du HfO2, ou un diélectrique spécifique ;
- ouverture (E90) du sommet des nano-fils, des contacts extérieurs et du canal des nano-FET (structure cœur-coquille) :
  - une étape de photolithographie est utilisée à l'aide d'une résine épaisse (5 µm) pour graver l'oxyde (d'isolation), précédemment déposé, au niveau des contacts extérieurs (des lignes d'accès) et du canal du nano-FET (entre la source et le drain) ;
  - la résine restante est ensuite réduite en épaisseur par gravure plasma O2 pour libérer le haut de la nano-sonde ;
  - la hauteur de résine peut varier entre 1 et 3 µm en fonction de la dimension du contact sensible désirée pour la nano-sonde.
- gravure (E100) chimique de l'oxyde ouvert :
  - Les zones ouvertes de la résine sont gravées chimiquement à l'aide d'une solution de HF tamponnée (buffer HF) de (5%) ; cette gravure permet de libérer le sommet de la nano-sonde, de désoxyder les contacts extérieurs et de réduire l'épaisseur d'oxyde sur le canal pour améliorer la détection et/ou la mesure ;
  - la résine est ensuite éliminée ;
  - à l'issue de cette étape, on dispose d'une plateforme comprenant un réseau de nano-fils formant des groupes de nano-fils (un groupe comprenant de un à quatre nano-fils), des nano-FETs disposés à proximité des nanosondes ; et de lignes d'accès

à l'ensemble de ces composants, à partir de la périphérie de la plateforme, et ce quelle que soit la cartographie de celle-ci.

En l'état, à l'issue de cette étape de gravure chimique d'oxyde, cette plateforme, fabriquée selon le procédé précédemment exposé, permet de résoudre la problématique liée à la mesure *conjointe*, à l'aide d'une même plateforme, d'un potentiel électrique, à l'aide d'au moins une nano-sonde et de concentration d'ion en extracellulaire avec un ou plusieurs transistors (nano-FET). L'ensemble de ces étapes permet d'obtenir un dispositif, ou une plateforme, en une seule passe, ce qui n'est pas permis par les méthodes de fabrication de l'art antérieur. Cependant, afin de permettre ultérieurement, des expérimentations sur des cultures neuronales avec une croissance dirigée des cellules sur la plateforme, les inventeurs ont mis en œuvre une étape supplémentaire de spécialisation de la surface de la plateforme, cette étape supplémentaire permettant de contraindre la culture et la croissance des cellules à des localisations prédéterminées, comme cela a été présenté précédemment. Plus particulièrement, selon la présente technique, le procédé de fabrication comprend en outre une étape de fonctionnalisation (E110) chimique comprenant une photolithogravure de définition de motifs d'accroche des cellules et plus spécifiquement de motifs hydrophiles.

Ces motifs sont réalisés au niveau des zones spécifiques de plateforme sur lesquelles on souhaite favoriser la croissance des cellules. Des zones hydrophiles de plus grandes surfaces sont créées au niveau des nanosondes, aux endroits où on souhaite favoriser l'implantation de soma. Des zones hydrophiles sont également créées dans le prolongement des nanosondes, afin de permettre aux prolongements de cellules (axones, dendrites si nécessaires) afin de diriger la croissance de ces prolongements vers d'autres nanosondes, sur lesquelles d'autres somas seront fixés.

5.5. divers

Toutes les caractéristiques décrites peuvent être combinées et ce dans n'importe quelle combinaison. Chaque caractéristique divulguée dans cette spécification peut être remplacée par une caractéristique équivalente servant le même objectif. Ainsi, sauf indication contraire, chaque caractéristique décrite n'est qu'un exemple d'une série générique de caractéristiques équivalentes ou similaires.

De manière complémentaire aux aspects précédemment décrit, la plateforme objet de la présente peut être mise en œuvre de différentes manières. Un avantage de cette plateforme, apporté par le fait que chaque nano-dispositif est adressable, est qu'elle permet de réaliser une

localisation des cellules déposées (et/ou mise en développement) à des endroits très précis de la plateforme, ce qui n'est pas permis par l'art antérieur. Par ailleurs, l'utilisation de la plateforme n'est pas limitée à des cellules de type neurone, mais peut être mise en œuvre pour tout type de cellules, avec une modification de la distance séparant les composantes des nanosondes. Les nanosondes peuvent être utilisées pour mesurer un potentiel d'une part et transmettre une impulsion électrique aux cellules, d'autre part. Cette transmission d'impulsion peut être utilisée pour ouvrir localement la paroi de la cellule stimulée, de manière précise et réversible. La transmission d'impulsion peut également être utilisée, dans certaines conditions, pour provoquer une excitation de la cellule.

REVENDICATIONS

1. Plateforme pour l'interfaçage cellulaire (P1, P2), comprenant au moins une nano-sonde (100-1,...100-n) à base de nano-fils comprenant chacun une extrémité conductrice destinée à être en contact avec une cellule, plateforme caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un transistor à effet de champs, dit nano-FET (200-1, 200-m) positionné à une distance prédéterminée de ladite nano-sonde.

2. Plateforme selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend un ensemble de nano-capteurs, chaque nano-capteur comprenant un couple formé d'une nano-sonde (100-1) et d'un nano-FET (200-1) espacé d'une distance comprise entre 1 et 5 micromètres.

3. Plateforme selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend un ensemble de nanosondes et un ensemble de nano-FETs répartis sur ladite plateforme pour former au moins un réseau de nano-capteurs comprenant au moins un parcours prédéterminé.

4. Plateforme selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, des zones hydrophiles localisées au niveau des nanosondes et dudit au moins un nano-FET.

5. Plateforme selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend une pluralité de parcours prédéterminés, chaque parcours prédéterminé reliant au moins deux nanosondes dudit réseau de nanosondes.

6. Plateforme selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, des zones hydrophiles localisées au niveau desdits parcours prédéterminés.

7. Plateforme selon la revendication 5, caractérisée en ce que chaque parcours prédéterminé entre deux nanosondes comprend une pluralité de nano-FETs, chaque nano-FET étant implanté à intervalles réguliers le long du parcours.

8. Plateforme selon la revendication 5, caractérisée en ce que chaque parcours prédéterminé entre deux nanosondes comprend une pluralité de nanosondes de parcours, chaque nano-sonde de parcours étant implantée à intervalles réguliers le long du parcours.

9. Plateforme selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ladite au moins une nano-sonde comprend entre un et neuf nano-fils.

10. Plateforme selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le nano-FET est un transistor à ailette de type fin-FET.

11. Procédé de fabrication d'une plateforme pour l'interfaçage intracellulaire, procédé de type descendant, caractérisé en ce qu'il comprend, postérieurement à une étape de structuration verticale d'au moins une nano-sonde à base de nano-fils, une étape de structuration planaire d'au moins un transistor à effet de champs, dit nano-FET.

12. Procédé de fabrication d'une plateforme pour l'interfaçage intracellulaire, selon la revendication 11, caractérisé en ce que postérieurement à l'étape de structuration planaire dudit au moins un nano-FET, ledit procédé comprend une étape de siliciuration de platine, provoquant l'implantation d'une couche de siliciure de platine (PtSi) sur ladite au moins une nano-sonde et sur des zone source (S) et de drain (D) dudit au moins un nano-FET.

13. Procédé de fabrication d'une plateforme pour l'interfaçage intracellulaire, selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d'adjonction, sur les nano-fils de ladite au moins une nano-sonde, d'un matériau organique conducteur, tel que le PEDOT:PSS.

14. Procédé de fabrication d'une plateforme pour l'interfaçage intracellulaire, selon la revendication 11, caractérisé en ce que postérieurement à l'étape de structuration planaire dudit au moins un nano-FETs, ledit procédé comprend une étape de fonctionnalisation de la surface de ladite plateforme définissant une pluralité de zones hydrophiles.

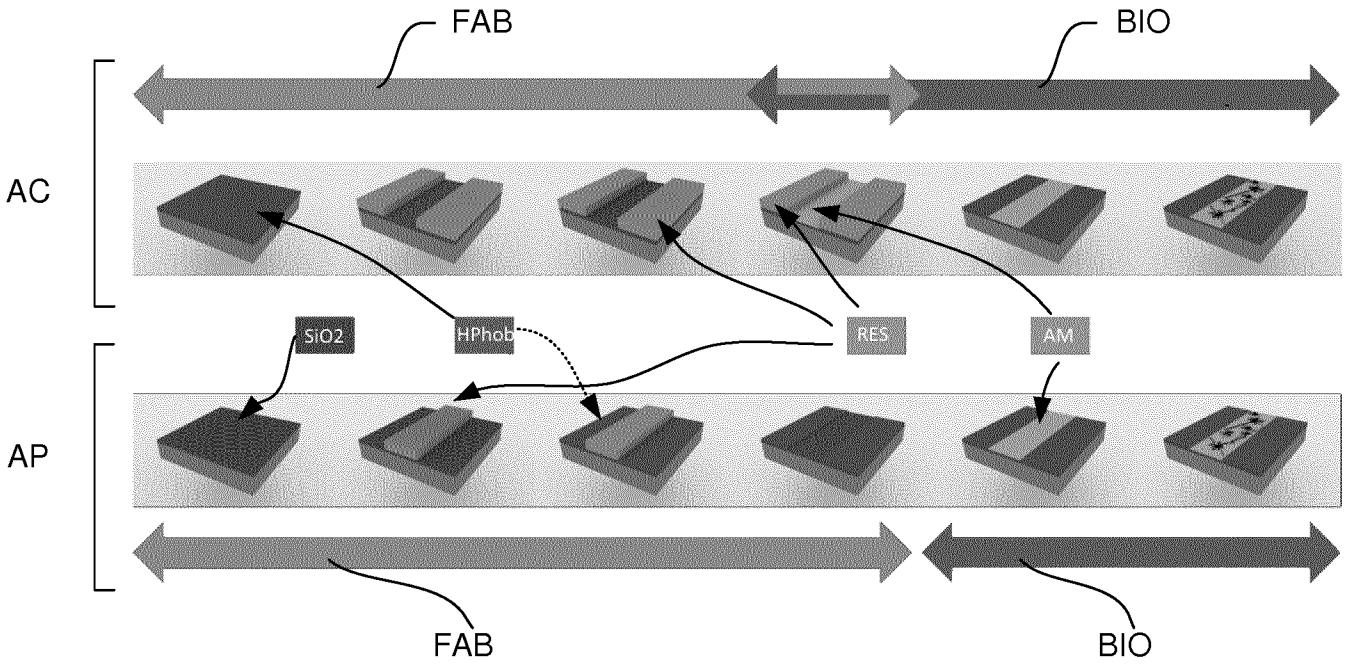


Figure 1

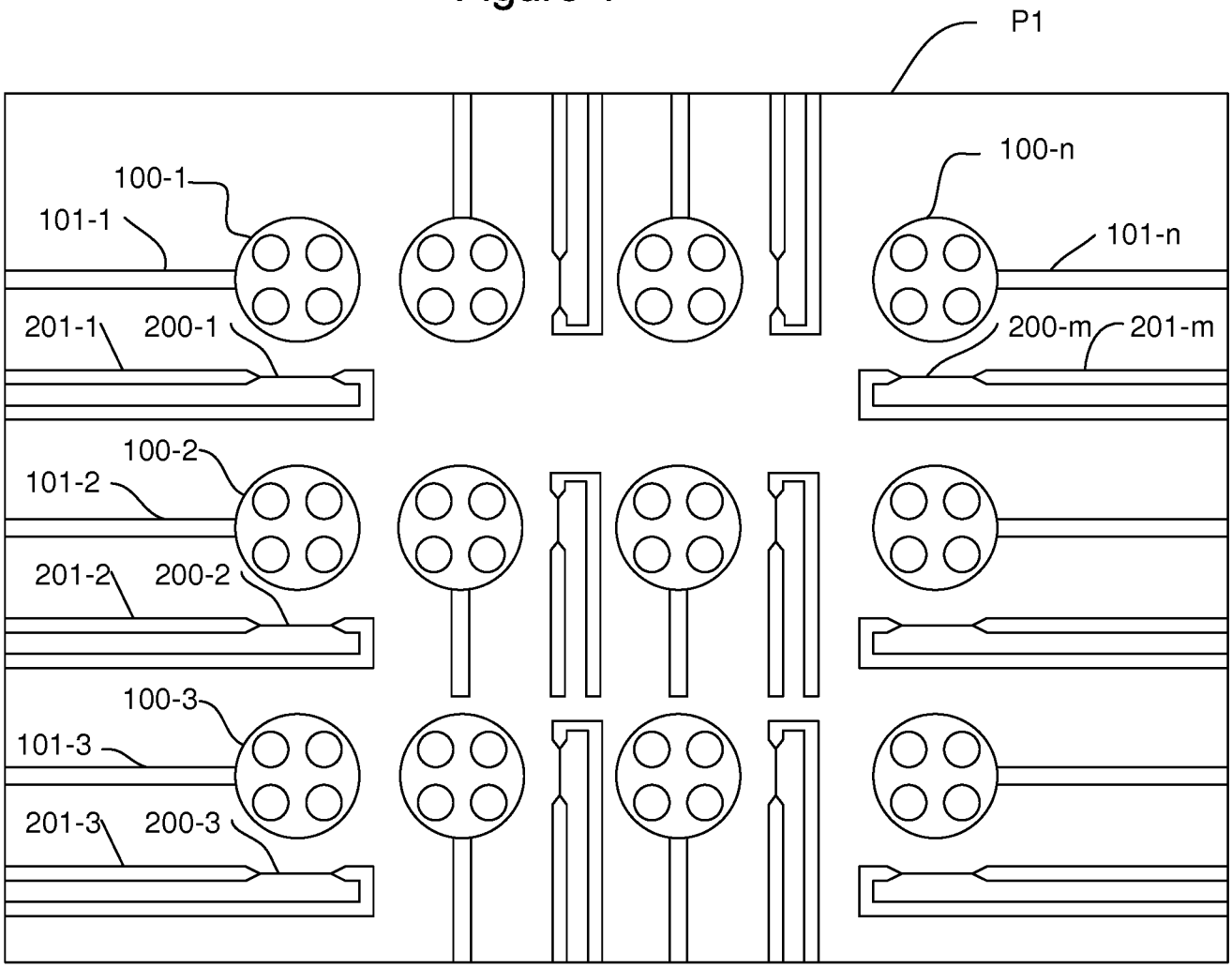


Figure 2

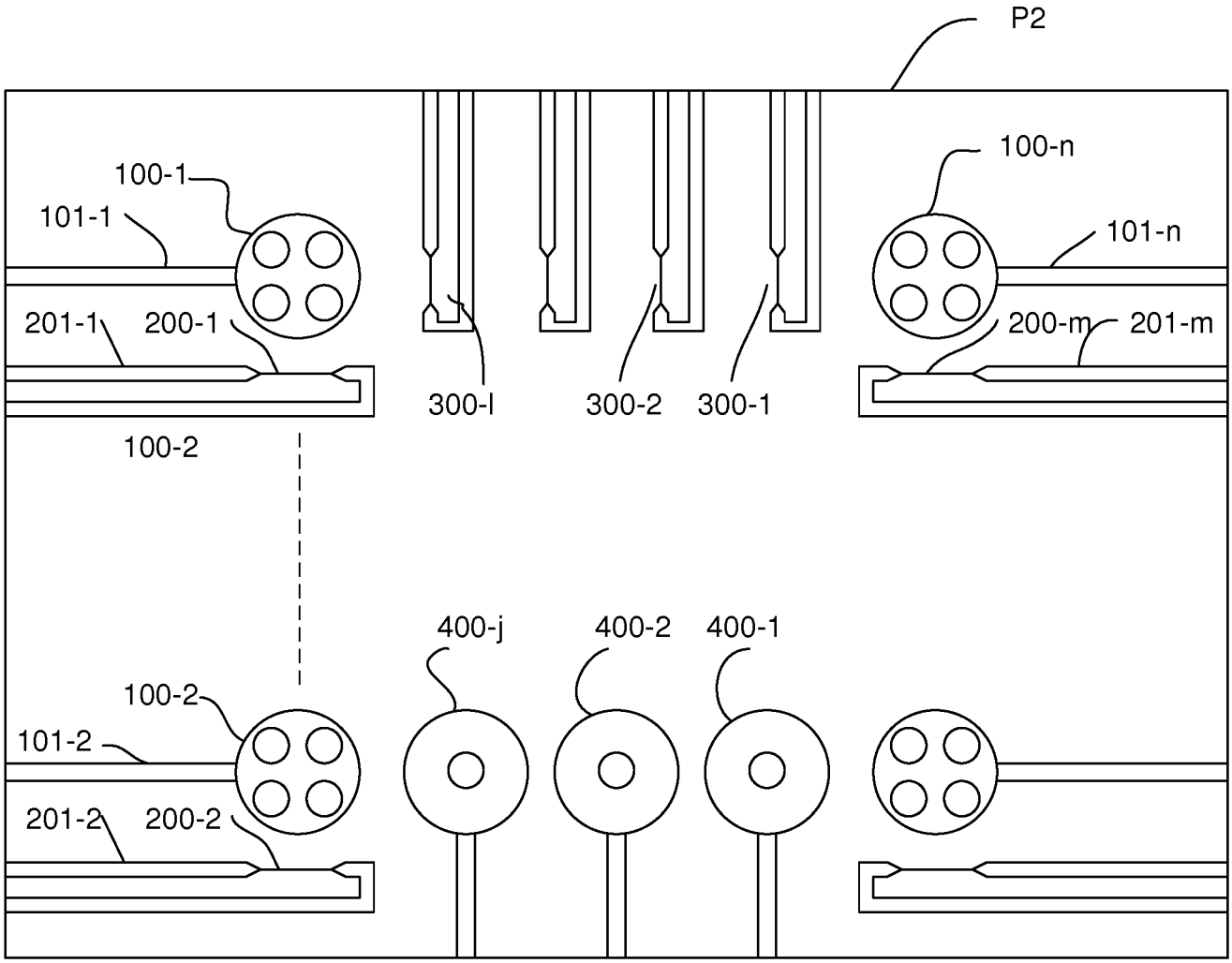


Figure 3

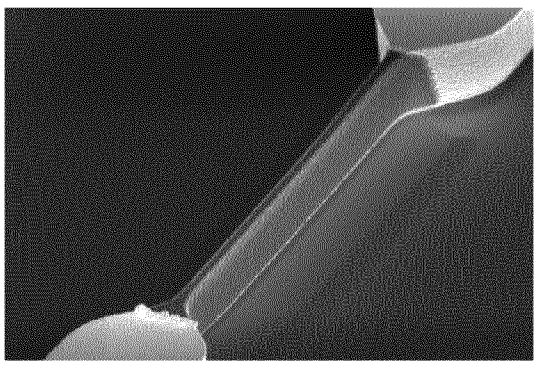


Figure 4b

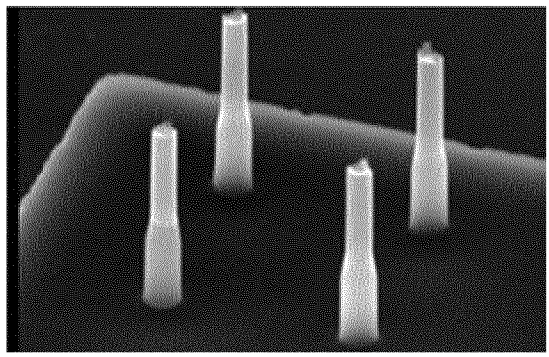


Figure 4a

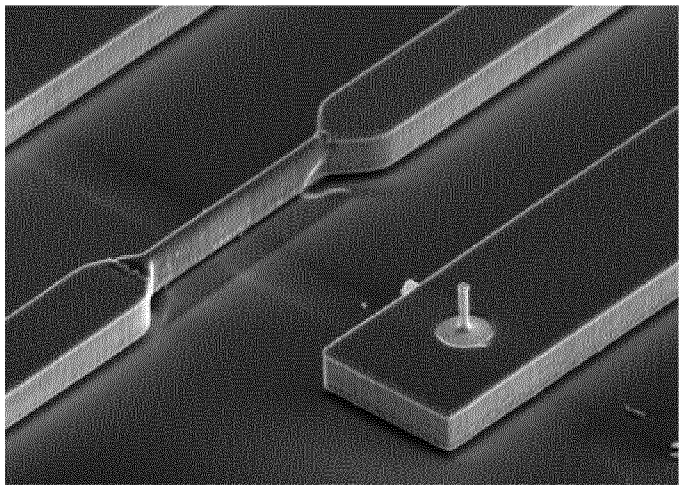


Figure 5

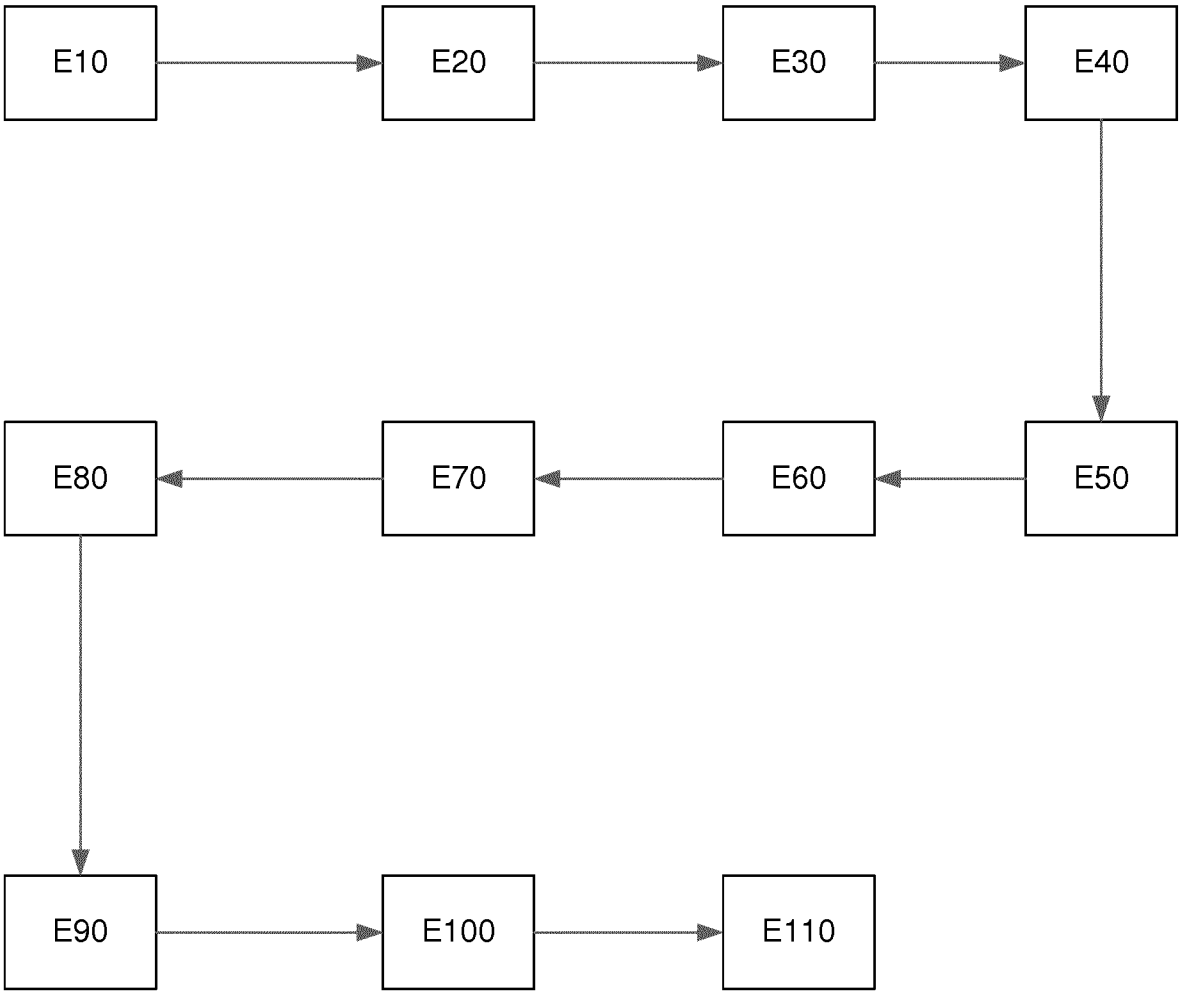


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/083305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/483
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N A61B H01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADRIEN CASANOVA ET AL: "Probing electrical activity of single neurons based on ID nanostructures: From extra to intracellular interfacing", 2016 IEEE NANOTECHNOLOGY MATERIALS AND DEVICES CONFERENCE (NMDC), 1 October 2016 (2016-10-01), pages 1-2, XP055501324, DOI: 10.1109/NMDC.2016.7777156 the whole document	1-14

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 January 2019	15/01/2019

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gilow, Christoph

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MORIA KWIAT ET AL: "Highly Ordered Large-Scale Neuronal Networks of Individual Cells - Toward Single Cell to 3D Nanowire Intracellular Interfaces", ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES, vol. 4, no. 7, 22 June 2012 (2012-06-22), pages 3542-3549, XP055501471, US ISSN: 1944-8244, DOI: 10.1021/am300602e Section "results and discussion"; figures 1,4,5	1-14
A	WO 2012/069606 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; LARRIEU GUILHEM [FR]) 31 May 2012 (2012-05-31) page 9, line 22 - page 14, line 10; figures 5-11	12-14
A	MICHELE DIPALO ET AL: "Intracellular and Extracellular Recording of Spontaneous Action Potentials in Mammalian Neurons and Cardiac Cells with 3D Plasmonic Nanoelectrodes", NANO LETTERS, vol. 17, no. 6, 24 May 2017 (2017-05-24), pages 3932-3939, XP055501265, US ISSN: 1530-6984, DOI: 10.1021/acs.nanolett.7b01523 abstract; figure 1	1-14
A	LONG YANG ET AL: "Nanodevices for Cellular Interfaces and Electrophysiological Recording", ADVANCED MATERIALS, vol. 25, no. 28, 26 July 2013 (2013-07-26) , pages 3881-3887, XP055501488, DE ISSN: 0935-9648, DOI: 10.1002/adma.201301194 the whole document	1-14

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2018/083305

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012069606 A2	31-05-2012	EP 2643848 A2	02-10-2013
		FR 2968125 A1	01-06-2012
		JP 6035245 B2	30-11-2016
		JP 2014503998 A	13-02-2014
		KR 20140024836 A	03-03-2014
		US 2013240983 A1	19-09-2013
		WO 2012069606 A2	31-05-2012

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2018/083305

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. G01N33/483
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
G01N A61B H01L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ADRIEN CASANOVA ET AL: "Probing electrical activity of single neurons based on ID nanostructures: From extra to intracellular interfacing", 2016 IEEE NANOTECHNOLOGY MATERIALS AND DEVICES CONFERENCE (NMDC), 1 octobre 2016 (2016-10-01), pages 1-2, XP055501324, DOI: 10.1109/NMDC.2016.7777156 le document en entier	1-14

-/--

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
2 janvier 2019	15/01/2019

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gilow, Christoph

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MORIA KWIAT ET AL: "Highly Ordered Large-Scale Neuronal Networks of Individual Cells - Toward Single Cell to 3D Nanowire Intracellular Interfaces", ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES, vol. 4, no. 7, 22 juin 2012 (2012-06-22), pages 3542-3549, XP055501471, US ISSN: 1944-8244, DOI: 10.1021/am300602e Section "results and discussion"; figures 1,4,5	1-14
A	WO 2012/069606 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; LARRIEU GUILHEM [FR]) 31 mai 2012 (2012-05-31) page 9, ligne 22 - page 14, ligne 10; figures 5-11	12-14
A	MICHELE DIPALO ET AL: "Intracellular and Extracellular Recording of Spontaneous Action Potentials in Mammalian Neurons and Cardiac Cells with 3D Plasmonic Nanoelectrodes", NANO LETTERS, vol. 17, no. 6, 24 mai 2017 (2017-05-24), pages 3932-3939, XP055501265, US ISSN: 1530-6984, DOI: 10.1021/acs.nanolett.7b01523 abrégé; figure 1	1-14
A	LONG YANG ET AL: "Nanodevices for Cellular Interfaces and Electrophysiological Recording", ADVANCED MATERIALS, vol. 25, no. 28, 26 juillet 2013 (2013-07-26), pages 3881-3887, XP055501488, DE ISSN: 0935-9648, DOI: 10.1002/adma.201301194 le document en entier	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2018/083305

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2012069606 A2	31-05-2012	EP 2643848 A2	02-10-2013
		FR 2968125 A1	01-06-2012
		JP 6035245 B2	30-11-2016
		JP 2014503998 A	13-02-2014
		KR 20140024836 A	03-03-2014
		US 2013240983 A1	19-09-2013
		WO 2012069606 A2	31-05-2012