



## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIS - Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Paul VILLARD**

Thèse dirigée par **Blaise YVERT**

et co-encadrée par **Gaëlle OFFRANC PIRET**

préparée au sein du **Laboratoire Braintech Inserm U1205**  
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement**

**Réalisation d'un implant réseau de haute densité d'électrodes intra-corticales pour la détection stable de potentiels d'action et de potentiels de champs locaux**

**Development of an implant with a high density intra-cortical electrode array for the stable recording of action potentials and local field potentials**

Thèse soutenue à huis clos le **14 juin 2019**,  
devant le jury composé de :

**Madame CHRISTELLE PRINZ**

PROFESSEUR, UNIVERSITE DE LUND - SUEDE, Rapportrice

**Monsieur CHRISTIAN BERGAUD**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION MIDI-PYRENEES,  
Rapporteur

**Monsieur PASCAL MAILLEY**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA GRENOBLE, Examineur

**Madame CATHERINE PICART**

PROFESSEUR, GRENOBLE INP, Présidente

**Monsieur SERGE PICAUD**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION PARIS,  
Examineur



# Table des matières

Table des matières .....	3
Tables des figures .....	7
Liste des tableaux .....	12
Acronymes.....	13
Introduction.....	15
1 Implant neuronaux.....	19
1.1 Enregistrement intracellulaire.....	20
1.2 Enregistrement extracellulaire .....	20
1.3 Enregistrement extracellulaire multiélectrodes in vitro .....	21
1.4 Enregistrement In vivo .....	22
1.5 Micro EcoG .....	23
1.6 Implants intracorticaux .....	24
1.6.1 Fils, électrode neurotrophique et tétrode .....	24
1.6.2 Implant rigide haute densité .....	25
1.6.3 Implant flexible.....	27
1.7 Matériaux de la partie Isolante de l'implant .....	28
1.7.1 Le silicium .....	28
1.7.2 Parylène.....	28
1.7.3 SU-8 .....	29
1.7.4 Polyimide .....	29
1.7.5 Tableau comparatif .....	30
1.8 Matériaux de la partie conductrice .....	30
1.8.1 Or.....	31
1.8.2 Platine.....	31
1.8.3 Nitrure de titane.....	31
1.8.4 Oxyde d'iridium .....	32
1.8.5 Nanotube de carbones .....	32
1.8.6 Diamant .....	33
1.8.7 Graphene.....	33
1.8.8 Polymère PEDOT.....	34
1.8.9 Tableau comparatif des matériaux conducteur .....	35
1.9 Caractérisation des matériaux utilisés pour l'électrode .....	35
1.9.1 Transfert de charge .....	36

1.9.2	Spectroscopie d'impédance .....	37
1.9.3	Bruit .....	38
1.9.4	Voltamétrie cyclique.....	40
1.9.5	Transitoire de tension .....	41
1.10	Méthode de Fabrication.....	42
1.10.1	Premiers Implants .....	42
1.10.2	Microfabrication d'Implants rigides .....	43
1.10.3	Microfabrication d'implants souples.....	44
1.10.4	Connectique .....	46
1.11	Méthode d'insertion de l'implant .....	47
1.11.1	Insertion Manuelle/Motorisée/magnétique .....	47
1.11.2	Support d'implantation .....	49
1.11.3	Encapsulation d'implant.....	51
1.11.4	Choix du lieu d'implantation .....	52
1.11.5	Effet de la vitesse.....	53
1.12	Biocompatibilité .....	53
1.12.1	Cellules gliales .....	54
1.12.2	Immuno-marquage.....	55
1.12.3	Inflammation court et long terme.....	56
1.12.4	Méthode d'amélioration de la biocompatibilité .....	56
2	Conception, fabrication et caractérisation d'un implant haute densité.....	61
2.1	Géométrie des implants .....	61
2.1.1	Implant 256 .....	61
2.1.1.1	Implant mini porc 256 .....	63
2.1.1.2	Implant rat 256.....	65
2.1.1.3	Limitation de la connectique 256.....	65
2.1.2	Connecteur 71 première génération.....	65
2.1.3	Connecteur 71 deuxième génération.....	66
2.2	Matériaux utilisés .....	68
2.2.1	Electrodes.....	68
2.2.2	Isolant .....	69
2.3	Etapas de fabrication.....	69
2.3.1	Fabrication de l'implant 256.....	70
2.3.1.1	Couche sacrificielle .....	70
2.3.1.2	Couche inférieure .....	70
2.3.1.3	Création des pistes et des électrodes.....	71

2.3.1.4	Ouverture des électrodes.....	72
2.3.1.5	Création des pads de contact.....	72
2.3.1.6	Création de la forme de l'implant.....	73
2.3.1.7	Suppression de l'aluminium.....	74
2.3.1.8	Décollement de l'implant.....	74
2.3.1.9	Motif test.....	74
2.3.2	Fabrication de l'implant 71 version 1.....	75
2.3.3	Evolution de la méthode de fabrication de l'implant 71 version 2.....	76
2.3.4	Implants en fin de fabrication.....	76
2.3.4.1	Processus de fabrication numéro 1.....	77
2.3.4.2	Processus de fabrication numéro 2.....	81
2.3.5	Connexion de l'implant.....	81
2.4	Caractérisation des implants.....	85
2.4.1	Test de la passivation.....	85
2.4.2	Impédance.....	86
2.4.2.1	Mesure avec SP-200.....	86
2.4.2.2	Mesure avec système Intan.....	87
2.4.3	Bruit.....	88
2.4.3.1	Carte PCB.....	88
2.4.3.2	Head stage et système d'enregistrement.....	88
2.4.3.3	Montage pratique pour les mesures de bruit.....	90
2.4.3.4	Bruit des électrodes.....	90
2.4.4	Voltamétrie cyclique (CV).....	92
2.5	Perspectives.....	94
3	Méthode d'insertion de l'implant, enregistrements in vivo et mise en place du protocole pour l'analyse de la biocompatibilité de l'implant.....	99
3.1	Méthode d'insertion de l'implant.....	99
3.1.1	Insertion magnétique.....	99
3.1.2	Insertion avec pointe biodégradable.....	100
3.1.3	Insertion avec véhicule de transport.....	103
3.2	Enregistrements in vivo chez le rat.....	106
3.3	Immunomarquage.....	111
3.4	Perspectives.....	113
4	Méthode de caractérisation avec colorant fluorescent.....	116
4.1	Matériaux des électrodes.....	116
4.2	Caractérisation des MEA.....	118

4.2.1	Mesure de l'impédance et du bruit.....	118
4.2.2	Caractérisation par voltampérométrie cyclique.....	118
4.2.3	Mesure du potentiel transitoire .....	119
4.2.4	Caractérisation des différents matériaux par fluorescence .....	121
4.3	Résultats et discussion .....	122
4.3.1	Bruit et impédance .....	122
4.3.2	Cohérence de la fluorescence .....	123
4.3.3	Comparaison fluorescence/CV .....	124
4.3.4	Périmètre Vs Surface .....	126
4.4	Perspectives.....	127
5	Conclusion .....	129
6	Annexe.....	133
6.1	Annexe 1 : ZIF .....	133
6.2	Annexe 2 : Fabrication.....	134
6.3	Annexe 3 : ACF.....	137
6.4	Annexe 4 : Autoclave .....	138
6.5	Annexe 5 : Kapton .....	139
6.6	Annexe 6 : Chirurgie .....	140
6.7	Annexe 7 : Protocole d'immunomarquage .....	143
7	Bibliographie.....	144

## Tables des figures

Figure 1 : Stabilité des signaux corticaux sur 19 jours (Ganguly and Carmena, 2009).....	16
Figure 2 : Schéma d'un potentiel d'action (Heuschkel, 2001).....	19
Figure 3 : Schémas montrant les différentes méthodes d'enregistrement cellulaire. (Hamill et al., 1981).....	20
Figure 4 : a : MEA avec cuve b : Exemple de configuration des électrodes d'un type de MEA (MCS MEA Manual) c : MEA et zoom au niveau des électrodes qui sont de tailles variables. (Heim et al., 2012).....	21
Figure 5 : Outils disponibles pour l'enregistrement neuronal (Thèse F. Bocquelet).....	22
Figure 6 : Différence entre l'enregistrement des LFP en surface ou en profondeur (Buzsáki et al., 2012).....	23
Figure 7 : Schéma de principe de la tétrade à quatre canaux parmi quatre cellules pyramidales (O'Keefe and Recce, 1993) .....	24
Figure 8 : Electrode "Cone"(Kennedy, 1989).....	25
Figure 9 : a : Aiguilles de l'implant Michigan ( <a href="http://ece.umich.edu/bicentennial/stories/the-michigan-probe.html">http://ece.umich.edu/bicentennial/stories/the-michigan-probe.html</a> ) b : Implants directement connecté à un câble ruban très flexible (Herwik et al., 2009) c : Sites d'enregistrement compacts sur une tige en silicium pour un enregistrement neuronal (Scholvin et al., 2016) .....	26
Figure 10 : a : Utah Array (Maynard et al., 1997) b : Réaction immunitaire suite à l'implantation chronique d'un implant en silicium (Marin, 2010).....	26
Figure 11 : a : Implant en polyimide (Xiang et al., 2014) b : Implant en SU-8 (Altuna et al., 2012) c : Implant en polyimide avec électrode sur les deux faces (Tooker et al., 2012) d : Implant en SU-8 de 1 µm d'épais (Luan et al., 2017) e : Implant en polyimide photosensible avec une structure ouverte (Kato et al., 2012) f : Filet d'électrode (Liu et al., 2015).....	27
Figure 12: Structure chimique du parylène C.....	28
Figure 13: Structure chimique du polyimide (Georgiev et al., 2012) .....	29
Figure 14: Electrodes CNT (Khalifa et al 2015) .....	32
Figure 15: Micro électrodes en diamant nanostructuré en 3D (Piret et al., 2015a) .....	33
Figure 16: Structure du PEDOT (Green et al., 2008) .....	34
Figure 17 : Transfert de charge à l'interface électrode/électrolyte (Merrill et al., 2005).....	37
Figure 18 : Comparaison de l'impédance du TiN plat et du TiN rugueux (Cogan, 2008) .....	38
Figure 19 : Exemple d'enregistrements de bruit de fond avec des électrodes de différents diamètre (Heim et al., 2012).....	39
Figure 20: Modèle de la source des bruits liés aux amplificateurs (Godin et al., 1991) .....	39
Figure 21: CV de AIROF dans une solution PBS à 50 mV s <sup>-1</sup> (Cogan, 2008) .....	40
Figure 22: Un transitoire de tension d'AIROF en réponse à un créneau symétrique (Cogan, 2008) ....	41
Figure 23: Différentes formes d'électrodes formées par gravure électrochimique (Wesson Ashford et al., 1985).....	42
Figure 24: Etapes de fabrication de l'Utah Array (Bhandari et al., 2010) .....	43
Figure 25: Illustration du processus de thermoformage du parylène (Hara et al., 2015).....	45
Figure 26: Impression sur substrat parylène (Kim et al. 2017) .....	45
Figure 27: Wire Bonding (Schuettler and Stieglitz, 2013) .....	46
Figure 28: Flip chip Process (Schuettler et al. 2013) .....	46
Figure 29: a : Connexion de l'implant avec un connecteur FPC (Xiang et al., 2014) b : Système ZIF permettant de brancher et débrancher l'implant (Schuhmann et al., 2017) .....	47
Figure 30: Insertion magnétique d'électrodes corticales (Dryg et al., 2015).....	48

Figure 31: Implantation d'une électrode de CNT grâce à un système microfluidique (Vitale et al., 2018).....	49
Figure 32: Injection d'un filet d'électrode dans le cerveau grâce à un ensemble seringue aiguille (Liu et al., 2015).....	49
Figure 33 : a : Illustration de l'insertion d'un implant avec un véhicule (Kozai and Kipke, 2009) b : Insertion grâce à une fibre de carbone de 7 um (Luan et al. 2017) .....	50
Figure 34 : a : Revêtement en silicone sur un implant (Bhatti et al., 2015) b : Erosion du polymère rigide autour de l'implant (Lewitus et al., 2011) .....	51
Figure 35: Relation entre les différentes cellules du système nerveux central (Mihailoff and Haines, 2018).....	54
Figure 36: Principe de l'immunomarquage à un anticorps ou deux anticorps (Genton, 2006).....	56
Figure 37: Nombre d'électrode enregistré après implantation d'une Utah Array en fonction du temps (Barrese et al., 2013) .....	57
Figure 38 : a : Implant à l'architecture ouverte afin de favoriser la repousse neuronale (Seymour and Kipke, 2007) b : Implant de forme sinusoïde (Sohal et al., 2014) .....	58
Figure 39 : Couches de l'implant 256 .....	62
Figure 40: Forme globale de l'implant 256 pour mini porc.....	63
Figure 41 : a : Pad de connexion b : Pad de connexion (zoom).....	63
Figure 42: Division du tentacule en 4 puis 16 parties .....	64
Figure 43 : Zoom sur le tentacule comportant les tétrodes.....	64
Figure 44 : Implant rat vue de la couche avec les pistes .....	65
Figure 45 : Implant ZIF 71 voies première version .....	66
Figure 46 : implant ZIF 71 voies version 2 .....	67
Figure 47 : Formes (zone entourée) permettant de reconnaître chaque électrode lors de l'immunomarquage .....	67
Figure 48: Formule chimique de la SU-8 ( <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/SU8_photoresist#/media/File:SU-8_photoresist.png">https://en.wikipedia.org/wiki/SU8_photoresist#/media/File:SU-8_photoresist.png</a> ).....	69
Figure 49 : Processus de fabrication de l'implant 256 .....	70
Figure 50 : Motif de test. Fil de 11 µm de large et 1,4 cm de long .....	74
Figure 51 : Processus de fabrication de l'implant .....	75
Figure 52 : Nouveau processus de fabrication de l'implant .....	76
Figure 53 : Implant rat et miniporc 256 sur wafer .....	77
Figure 54 : Image au microscope optique des fils des implants avec des électrodes en or sur wafer. Colonne de gauche : fils droits de 50 µm de large. Colonne de droite : fils de 20 µm de large ondulés .....	77
Figure 55 : a : wafer d'implant 71 en platine connecté au cicor (voir 2.3.5). b et c : Image au microscope optique des fils de 50 µm de large avec des électrodes en platine d'implant 71 version 2 .....	78
Figure 56 : a : image de la pointe du profilomètre ainsi que des fils du tentacule étudié. b : diagramme du profilomètre montrant que les fils d'un tentacule sont d'une épaisseur de 8 µm. ...	78
Figure 57 : Image MEB d'une électrode de 15 µm de diamètre en platine .....	78
Figure 58 : A gauche : Electrode nanostructuré en Or. A droite : fil d'électrode nanostructuré.....	79
Figure 59 : Spectre résultant de l'EDX sur une électrode nanostructuré en or montrant la présence d'or et d'un peu d'aluminium.....	79
Figure 60 : En haut : Electrode de platine nanostructurée à gauche, zoom sur les nanostructures à droite. En bas : spectre EDX au niveau des nanostructures (présence de platine et d'aluminium) et du fond de l'électrode (présence de platine et d'un faible résidu d'aluminium). En vert, on observe le	



spectre d'un point situé sur une nanostructure. En orange plein, on observe le spectre d'un point en dehors des nanostructures.....	80
Figure 61 : Image de microscope optique d'implants réalisé grâce second procédé de fabrication. Colonne de gauche : le connecteur ainsi que la grande référence sont très bien réalisés. Colonne de droite : On remarque qu'au bout des tentacules de 20 (en haut) et 50 (en bas) $\mu\text{m}$ aucune ouverture n'est visible, la couche supérieure de SU-8 ne tient pas sur les petites structures. ....	81
Figure 62 : a : CICOR. b : Vue de côté du montage lors du soudage de l'ensemble implant/cicor c et d : Vue de dessus de la connexion implant/cicor c. pad de l'implant en bleu et pad du cicor (les contacts sont sur la face opposée) en jaune et marron. Les deux éléments ne sont pas alignés. d. Alignement parfait de l'ensemble implant/cicor réalisé grâce aux « oreilles » servant de points de repère situés sur les bords. ....	82
Figure 63 : a : thermopresse b : Wafer de 6 implants avec Cicor .....	82
Figure 64 : Exemple de connexion implant/cicor après décollement du wafer silicium .....	83
Figure 65 : Jonction implant/cicor renforcé avec du kapton .....	84
Figure 66 : Montage pour autoclaver l'implant recouvert de PLGA .....	84
Figure 67 : Formation d'une bulle (flèche noire) suite à l'hydrolyse de l'eau au niveau de l'électrode d'un fil de 50 $\mu\text{m}$ de largeur .....	85
Figure 68 : Formation de bulles le long des fils de 11 $\mu\text{m}$ de large de l'implant suite à la stimulation. A gauche : résultats après 5-6 impulsions. A gauche : résultats après 2-3 impulsions .....	86
Figure 69 : a) Montage pour mesure d'impédance, pointe de mesure sur le pad de l'implant. b) Détérioration de l'implant suite au contact avec la pointe.....	86
Figure 70 : Carte PCB avec module de l'Intan .....	87
Figure 71 : Carte PCB de petite taille. A droite : modèle 3D. A gauche : vues des différentes couches de la carte.....	88
Figure 72 : Headstage MCS et station d'enregistrement .....	89
Figure 73 : connecteur de l'Omnetics .....	89
Figure 74 : Exemple de montage des headstages pour 8 électrodes.....	89
Figure 75 : Montage pour les mesures de bruit .....	90
Figure 76 : Bruit d'une électrode de 15 $\mu\text{m}$ de diamètre de platine après filtrage (passe haut 400 Hz ordre 6).....	90
Figure 77 : Correspondance entre la moyenne des impédances et la moyenne des bruits pour chaque implant .....	91
Figure 78 : Photos de la connexion implant/cicor. En haut : Mauvaise connexion (impédance élevée) En bas : Bonne connexion (impédance faible) .....	92
Figure 79 : CV de 5 électrodes situées au bout de fils de 50 $\mu\text{m}$ de large .....	93
Figure 80 : Voltamétrie cyclique (100 mV/s) de 4 électrodes différentes .....	94
Figure 81 : Vue de dessus de la connexion implant/cicor a : pad de l'implant en bleu et pad du cicor (les contacts sont sur la face opposée) en jaune et marron. Les deux éléments ne sont pas alignés. b : Alignement parfait de l'ensemble implant/cicor réalisé grâce aux « oreilles » servant de points de repère situés sur les bords. ....	96
Figure 82 : Vue de côté du montage lors du soudage de l'ensemble implant/cicor. a : Montage idéal b : Montage comportant les problèmes rencontrés. 1 : décalage entre la machine et la zone de connexion. 2 : Repli en relief au niveau du film en Téflon. 3 : glissement du cicor lors de la mise sous pression. ....	97
Figure 83 : Schéma de principe de la région de poussée (Shapiro et al.2010) .....	99
Figure 84 : "Stylet" permettant de pousser des particules métalliques .....	99
Figure 85 : Schéma de principe de l'insertion avec pointe biodégradable .....	100

Figure 86 : Pointe en PLGA avec fils de SU-8, découpée par découpe laser. Des fils de SU-8 sont englobés dans le PLGA (cercle noir) .....	100
Figure 87 : a. Modèle 3D des moules utilisés pour couler le PLGA liquide. b. Moule avec des formes de pointe en silicium cassé suite au passage dans la DRIE c. Exemple de pointes PLGA découpées au laser. ....	101
Figure 88 : Insertion de pointe PLGA dans le cortex de rat. La flèche indique le lieu de l'insertion...	102
Figure 89 : Schéma de principe de l'insertion par utilisation d'un véhicule de transport .....	103
Figure 90 : Extrémité d'un tentacule avec 9 fils de 20 $\mu\text{m}$ de largeur après dissolution du PEG.....	104
Figure 91 : A gauche : Implant connecté au cicor et renforcé au niveau de la jonction cicor/implant. A droite : Implant monté sur un support avec chaque tentacule collé à un fil d'acier. ....	104
Figure 92 : A gauche : Implantation des fils avec le fil d'acier dans le cortex de rat. A droite : Position des fils après avoir retiré le fil d'acier, un fil est resté à la surface du cortex (flèche noire). Le site d'insertion est indiqué par une flèche grise.....	105
Figure 93 : Rat implanté avec l'ensemble carte PCB, headstages et batteries connecté au cicor.....	106
Figure 94 : 12 canaux enregistrés avec un headstage sur le rat anesthésié (échelle optimisée pour chaque canal). Pressions sur la queue représentées par les flèches noires. ....	107
Figure 95 : a : Signal brut après soustraction de la référence commune d'une électrode implantée lors d'un enregistrement sur un rat anesthésié. Les 4 variations importantes sur le signal correspondent aux instants de pression sur la queue. b : Signal obtenu après avoir filtré le signal brut avec un filtre passe bande [4-12 Hz]. c : Signal obtenu après avoir filtré le signal avec un filtre passe bande [300-3000 Hz]. d : Spectrogramme du signal brut après avoir réalisé un Z-score pour chaque fréquence	108
Figure 96 : En haut : Signal filtré [300-4000 Hz] enregistré sur le 3ème rat. Deux types de potentiels d'actions sont observables (pics rouges et pics noirs). En bas : Zoom signal filtré [300-4000 Hz] enregistré sur un rat.....	109
Figure 97 : En haut : Ensemble des potentiels d'actions positifs (noirs) et négatifs (rouges) superposés. En bas : moyenne et écart type de l'ensemble des signaux superposés sur la figure du haut. ....	110
Figure 98 : Distribution des intervalles inter-spikes pour le neurone positif (à gauche) et le neurone négatif (à droite). La courbe bleue correspond à une distribution exponentielle.....	111
Figure 99 : Histologie Ex Vivo 8 semaines après l'implantation d'un morceau de SU-8 de dimension 1x2x0,012 mm .....	112
Figure 100 : Coupe de cerveau de rat implanté, avec un fil entouré de de tissu nécrosé.....	112
Figure 101 : a : Marquage de la microglie (en rouge) et des astrocytes (en vert) d'une coupe de cerveau de rat implanté avec un tentacule avec des fils droits. La flèche montre une cicatrice. b : Marquage de la microglie (en rouge) d'une coupe de cerveau de rat implanté avec les fils ondulés d'un tentacule. ....	113
Figure 102 : MEA .....	117
Figure 103 : Image MEB des différentes électrodes : a : Nitrure de titane 30 $\mu\text{m}$ . b : Diamant plat. c : Diamant poreux. d : platine plat. e : platine poreux. f : nitrure de titane 10 $\mu\text{m}$ . ....	117
Figure 104 : CV d'une électrode de PEDOT de 30 $\mu\text{m}$ de diamètre .....	119
Figure 105 : Graphique représentant la méthode transitoire. Un créneau de courant est appliqué sur un fil de platine, les graphiques montrent la réponse en tension. En haut, le créneau est d'une longueur de 3 ms et d'une amplitude de 100 $\mu\text{A}$ . En bas, le créneau est d'une longueur de 100 ms et d'une amplitude 500 $\mu\text{A}$ . La flèche montre le changement de pente .....	120
Figure 106 : A droite Schéma du montage utilisé pour la fluorescence. Au centre : Montage utilisé pour la fluorescence. A droite : Graphe montrant l'intensité de fluorescence en fonction du temps. Des pics sont observables au moment des stimulations .....	121

Figure 107 : Différents types de stimulation. De gauche à droite : cathodique (C), anodique (A), biphasique cathodique (CA), biphasique anodique (AC).....	121
Figure 108 : En haut : graphique des valeurs de gris en fonction du temps. En bas : Images enregistrées par la caméra montrant l'évolution de la fluorescence entre 3 temps donnés au niveau de l'électrode (cercle bleu). Corrélation entre l'augmentation de l'intensité de la solution fluorescente et le moment de la stimulation (pic du graphique) .....	122
Figure 109 : Bruit en fonction de l'impédance .....	122
Figure 110 : Capacité d'injection de charge (moyenne sur 196 mesures sur 98 électrodes différentes) en fonction du type de stimulation .....	123
Figure 111 : Charge pouvant être injectée de manière purement capacitive en fonction des différents matériaux obtenue par la méthode par fluorescence (pour des stimulation cathodique puis anodique biphasique (CAB)) .....	124
Figure 112 : Capacité d'injection de charge obtenue par la méthode CV en fonction de la capacité d'injection de charge obtenue par la méthode par fluorescence (pour des stimulation anodique puis cathodique biphasique).....	125
Figure 113 : Charges injectées en fonction de la vitesse de scan .....	125
Figure 114 : Charge pouvant être injectée de manière purement capacitive en fonction des différents matériaux obtenue par la méthode CV .....	126
Figure 115 : Charge injectée par méthode fluorescente rapporté à la surface .....	127
Figure 116 : Charge injectée par méthode fluorescente rapporté au périmètre .....	127
Figure 117 : Charge injectée par méthode CV rapporté au périmètre .....	127
Figure 118 : Charge injectée par méthode Cv rapporté à la surface .....	127
Figure 119 : Schéma de principe du dépôt CVD .....	134
Figure 120 : Schéma de principe de la photolithographie ( <a href="http://biomechanicalregulation-lab.org/photolithography/">http://biomechanicalregulation-lab.org/photolithography/</a> ) .....	134
Figure 121 : Schéma de principe de l'IBE ( <a href="https://plasma.oxinst.com/campaigns/technology/ibe/">https://plasma.oxinst.com/campaigns/technology/ibe/</a> )	135
Figure 122 : Schéma de principe de l'ICP ( <a href="https://plasma.oxinst.com/campaigns/technology/icp/">https://plasma.oxinst.com/campaigns/technology/icp/</a> )	136
Figure 123 : mise en place de l'animal dans le cadre stéréotaxique.....	140
Figure 124 : Craniotomie réalisé à la dremell .....	140
Figure 125 : Passage du cicor dans la casquette après implantation.....	141
Figure 126 : Casquette rat première version .....	141
Figure 127 : Casquette rat version 2 .....	142
Figure 128 : casquette rat version optimisée, avec (à gauche) et sans chapeau protecteur (à droite) .....	142

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau comparatif des principaux matériaux utilisés comme isolant dans les implants .	30
Tableau 2 : Tableau comparatif des matériaux utilisés pour réaliser les électrodes conductrices .....	35
Tableau 3 : Impédances des différents implants.....	87
Tableau 4 : bruits RMS des différents implants .....	91
Tableau 5 : Nombre de tentacules sur l'implant (casse de certains tentacules) et nombre de tentacules insérés pour chaque rat implanté .....	105
Tableau 6 : Fenêtre de potentiel utilisée pour chaque matériau .....	119

# Acronymes

ACF : Anisotropic Conductive Film

AIROF : Activated Iridium Oxide Film

BCECF : 2',7'-Bis- (2-Carboxyethyl)-5- (And-6)- carboxyfluorescein

BCI : Brain Computer Interface

BDD : Boron Doped Diamond

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives

CIC : Charge Injection capacity

CNT : Carbon NanoTube

CSC : Charge Storage Capacity

CV : Cyclic Voltamétry

DRIE : Deep Reactive Ion Etching

ECOG : ElectroCorticoGraphie

EDX : Energy-dispersive X-ray spectroscopy

EEG : ElectroEncephaloGraphie

ESIEE : Ecole Supérieure d'Ingénieurs en Electrotechnique et Electronique

FDA : Food and Drug Administration

IBE : Ion Beam Etching

ICP : Inductively Coupled Plasma

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IrOx : Iridium Oxide

LFP : Local Field Potential

MCS : Multichannel Systems

MEA : Microelectrode Array

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MEG : MagnétoEncéphaloGraphie

MEMS : Microelectromechanical Systems

MWCNT : Mult-Walled Carbon NanoTube

CVD : Chemical Vapor Deposition

PCB : Printed Circuit Board

PEDOT : Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)

PEG : PolyEthylène Glycol

PI : Polyimide

PLGA : Poly Lactic-co-Glycolic Acid

Pt : Platine

PtB : Platine noir

RUE : Reactive Ion Etching

SAM : Self-Assembled Monolayers

SNC : Système nerveux central

SWCNT : Single-Walle Carbon NanoTube

TEP : Tomographie à émission de positons (TEP)

TiN : Titanium Nitride

ZIF : Zero Force Insertion

# Introduction

La pensée peut être considérée comme un ensemble d'opérations réalisées par le cerveau, un organe permettant de traiter des informations et constitué d'une grande variété et d'un grand nombre de cellules nerveuses. En neurosciences, nous avons besoin de comprendre les processus par lesquels nous percevons les choses, nous agissons, nous apprenons et nous nous souvenons. Les neurosciences ont émergé avec le développement de techniques permettant l'exploration des dynamiques cellulaires du système nerveux ainsi qu'avec la convergence de différentes disciplines liées au cerveau et au comportement : la biologie moléculaire, la neuroanatomie, l'électrophysiologie... Le cerveau est organisé en régions avec des fonctions spécifiques qui sont connectées entre elles. Tous les comportements, de la simple réponse réflexe aux actes mentaux complexes, est le produit des interactions entre neurones interconnectés. Les fonctions cognitives sont médiées par des régions spécifiques du néocortex.

Les progrès de la neurologie et de la psychologie cognitive ont permis de réaliser des analyses comportementales chez des patients présentant des lésions cérébrales perturbant le fonctionnement mental. Des lésions de différentes régions du cerveau peuvent entraîner des troubles cognitifs assez spécifiques. Les conséquences comportementales des lésions cérébrales nous en disent donc beaucoup sur la fonction de voies neuronales spécifiques. Des études sur les lésions ont montré que la cognition est le produit de plusieurs systèmes spécialisés, chacun comportant de nombreux composants. Par exemple, le système visuel dispose de voies spécialisées pour le traitement des informations sur la couleur et la forme, d'une part, et les mouvements, de l'autre.

Le développement de techniques d'imagerie telles que la tomographie à émission de positons (TEP) et l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRM), ainsi que le développement de la magnétoencéphalographie, ont permis de relier les modifications de l'activité de vastes populations de neurones à des troubles mentaux spécifiques. Ces nouvelles techniques permettent d'observer les propriétés du système nerveux. En conséquence, les neurosciences sont en mesure de traiter des hypothèses vérifiables sur la manière dont les fonctions cérébrales conduisent à des processus mentaux tels que la perception, la mémoire, les décisions et les actions.

L'utilisation de colorants sensibles au potentiel membranaire ou à la concentration intracellulaire de calcium a permis l'étude de l'activité neuronale dans de grands ensembles de neurones, à la fois *in vitro* et dans le cerveau d'animaux. L'utilisation récente de canaux ioniques sensibles à la lumière a permis l'activation ou l'inactivation de l'activité de neurones spécifiques ou de groupes de neurones dans les circuits neuronaux de comportement d'animaux. Enfin, l'amélioration de l'informatique et l'émergence d'une puissante sous-discipline des neurosciences computationnelles ont permis de modéliser l'activité de vastes populations de neurones et de tester des idées sur le rôle des composants spécifiques des circuits neuronaux dans le cerveau dans des comportements particuliers. Pour comprendre l'organisation neuronale d'un comportement complexe tel que la parole, nous devons comprendre non seulement les propriétés des cellules et des voies individuelles, mais également les propriétés de réseaux des circuits dans le cerveau. Bien que les propriétés du réseau dépendent des propriétés des neurones individuels du réseau, elles ne sont ni identiques ni similaires à ces propriétés, mais constituent une propriété émergente de la manière dont ces différentes cellules sont interconnectées.

Robert Wurtz et Edward Evarts ont mis au point des techniques permettant d'étudier l'activité de cellules individuelles dans le cerveau d'animaux, y compris de primates (Evarts, 1968). Cela a permis aux chercheurs de corréliser l'activité de populations spécifiques de neurones avec des processus perceptuels et moteurs spécifiques. Ces études sur les microélectrodes ont permis de constater que

les mécanismes de perception sont sensiblement les mêmes chez l'homme, le singe et même chez les animaux plus simples. Ces études cellulaires chez des singes ont également permis d'identifier l'importance de différentes combinaisons de zones du cerveau impliquées dans des fonctions cognitives spécifiques, telles que l'attention et la prise de décision. Ces approches ont changé la façon dont la biologie du comportement est étudiée à la fois chez l'animal de laboratoire et chez l'homme.

Des centaines de milliers de personnes souffrent de déficiences motrices dans lesquelles des zones cérébrales intactes liées au mouvement ne peuvent pas générer de mouvements en raison de lésions de la moelle épinière, des nerfs ou des muscles. Les troubles paralysants limitent profondément l'indépendance, la mobilité et la communication. En revanche, une prothèse neuromotrice est un type d'interface cerveau-ordinateur (BCI) qui peut guider le mouvement en exploitant le substrat neural existant pour réaliser cette action. Une prothèse neuromotrice idéale fournirait un signal sûr, discret et fiable en provenance de la zone motrice déconnectée afin de rétablir la fonction perdue. Les neurones situés dans la zone du bras du cortex moteur principal des singes, par exemple, fournissent des informations sur les trajectoires prévues pour le bras. Ces signaux de commande permettraient un bon fonctionnement des neuroprothèses uniquement si les signaux neuronaux pouvaient être engagés intentionnellement chez des humains paralysés. En principe, les neuroprothèses nécessitent un capteur pour détecter l'activité de plusieurs neurones, un décodeur pour traduire les schémas de déclenchement d'ensemble en commandes motrices et, généralement, une passerelle informatique pour engager les effecteurs.

Le contrôle des dispositifs neuroprothétiques par l'activité corticale nécessite des adaptations neuronales. Compte tenu des preuves mitigées d'une relation stationnaire neurone-comportement dans les aires motrices corticales, la compréhension de cette relation au cours du contrôle neuroprothétique à long terme peut élucider les principes de la plasticité neuronale et améliorer la fonction prothétique. Ganguly et al ont effectué des enregistrements stables d'ensembles de neurones primaires du cortex moteur chez des singes macaques avec un décodeur constant qui transforme l'activité neuronale en mouvements prothétiques. Ils ont découvert qu'un apprentissage rapide des singes ainsi qu'un contrôle efficace étaient étroitement liés à l'apparition d'un schéma étonnamment stable d'activité d'ensemble. Pour réaliser cette étude, il était indispensable d'avoir des signaux neuronaux stables dans le temps comme le montre la figure 1 (Ganguly and Carmena, 2009). Cependant ceux-ci ont été obtenus avec des électrodes intra-corticales faiblement biocompatibles au très long terme et dont la réalisation technologique est non automatisée et fastidieuse.

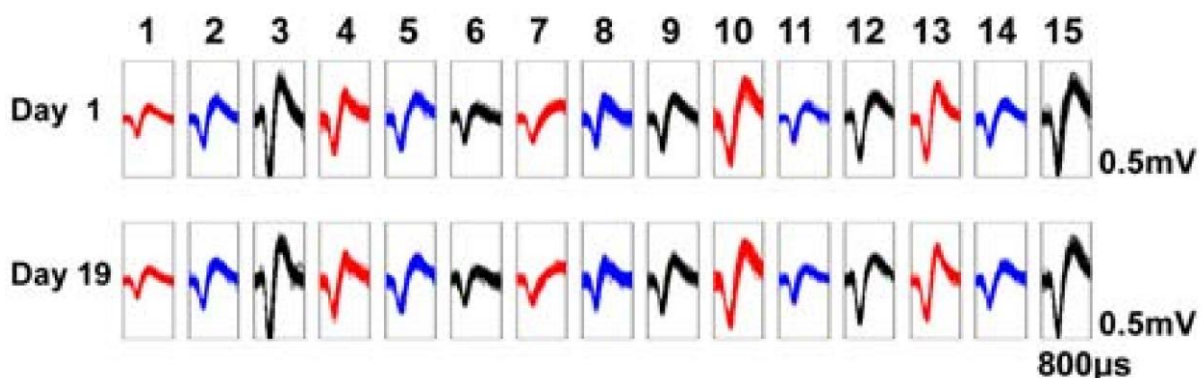


Figure 1 : Stabilité des signaux corticaux sur 19 jours (Ganguly and Carmena, 2009)



Il y a donc un besoin dans le développement d'implants intra-corticaux qui permettent d'enregistrer des signaux stables, de qualité, sur le long terme. Pour répondre à ces exigences, et dans le cadre de cette thèse financée par l'ERC Brain Micro Snooper (2015-2020), nous avons choisi de concevoir un implant très fin, flexible, implantable et facile à connecter.

Dans cette thèse, un premier chapitre fait office d'introduction générale sur les différents types d'enregistrements et dresse l'état de l'art des implants intra-corticaux. Une description des enregistrements intracellulaires et extracellulaires est exposée. Les différentes techniques d'enregistrement des signaux neuronaux sont ensuite décrites, puis une revue des implants existants et des matériaux utilisés pour réaliser les implants intra-corticaux est établie. Les méthodes de fabrication utilisées ainsi que les méthodes d'insertion des implants flexibles sont exposées. Une partie sur la biocompatibilité des implants explique les précautions à prendre lors de l'implantation d'électrodes.

Un deuxième chapitre traite de la conception, la fabrication et la caractérisation des implants intra-corticaux réalisés, avec trois modèles d'implants avec des fils très fins. Une partie sur les matériaux utilisés pour l'élaboration de l'implant est suivie d'une partie qui décrit les étapes de fabrication des différents modèles. Ensuite, sont exposés les résultats de caractérisation de l'implant par microscopie optique, par microscopie électronique à balayage (MEB) et par analyse de l'Energie Dispersive des rayons X (EDX). Enfin, la méthode de connexion de l'implant au système d'enregistrement est présentée ainsi que les performances de l'implant *in vitro* par l'intermédiaire de mesures d'impédance, de bruit ou de voltamétrie cyclique.

Un troisième chapitre expose les techniques d'insertion de l'implant utilisées et optimisées. En effet, trois méthodes ont été étudiées : l'insertion magnétique, l'insertion par encapsulation dans un matériau dégradable et l'insertion avec véhicule de transport. Des résultats préliminaires d'enregistrements *in vivo* et d'immunohistologie montrent une première mise en application de l'implant. Ces résultats très préliminaires sont discutés afin d'améliorer les performances du système complet.

Enfin un quatrième chapitre traite d'une méthode de caractérisation des électrodes de stimulation par fluorescence. Différents matériaux ont été caractérisés et testés avec cette méthode. Les performances en stimulation de ces matériaux sont comparées. La méthode par fluorescence est comparée à la méthode par voltamétrie cyclique. Pour finir, une étude sur la densité de courant lors de la stimulation permet de comprendre une des voies d'optimisation de la stimulation.

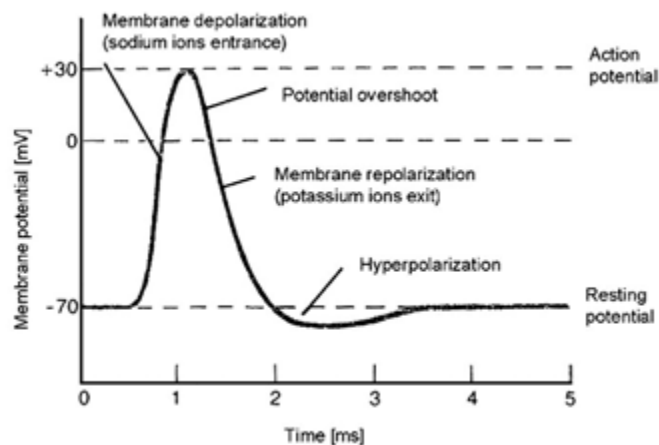
# Chapitre 1 : Implants neuronaux

Ce premier chapitre fait office d'introduction générale sur les différents types d'enregistrements et dresse l'état de l'art des implants intra-corticaux. Une description des enregistrements intracellulaires et extracellulaires est exposée. Les différentes techniques d'enregistrement des signaux neuronaux sont ensuite décrites, puis une revue des implants existants et des matériaux utilisés pour réaliser les implants intra-corticaux est établie. Les méthodes de fabrication utilisées ainsi que les méthodes d'insertion des implants flexibles sont exposées. Une partie sur la biocompatibilité des implants explique les précautions à prendre lors de l'implantation d'électrodes.

# 1 Implant neuronaux

L'électrophysiologie neuronale est l'étude des propriétés électriques des cellules et tissus biologiques du système nerveux. L'électrophysiologie neuronale implique la mesure des tensions ou des courants, à diverses échelles, des canaux ioniques simples au cerveau entier.

Les neurones sont des cellules excitables entourées par une membrane cellulaire. Cette membrane est perméable à certains ions. Différentes concentrations d'ions, telles que le sodium ( $\text{Na}^+$ ), le potassium ( $\text{K}^+$ ) et le chlore ( $\text{Cl}^-$ ) entre l'intérieur de la cellule (liquide intracellulaire) et l'extérieur (liquide extracellulaire) entraînent l'apparition d'un potentiel de membrane. Au repos, ce potentiel est d'environ  $-70$  mV. Les potentiels d'action apparaissent dans les neurones après avoir été stimulés via des entrées synaptiques. Un potentiel d'action est caractérisé par une dépolarisation locale (augmentation du potentiel membranaire) puis une hyperpolarisation (diminution du potentiel membranaire) (figure 2). Un potentiel d'action dure environ 1 à 2 ms.



Les potentiels d'action sont des événements tout ou rien ; l'amplitude ne varie pas en fonction de la taille du stimulus précédent. L'activation d'un neurone est provoquée par l'ouverture d'un nombre croissant de canaux sodiques voltage-dépendants et par l'entrée d'ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule. Après qu'un potentiel d'action se produit, la membrane cellulaire se repolarise rapidement vers son potentiel de membrane au repos. Les potentiels d'action se propagent le long d'un axone pour transmettre des signaux électriques à d'autres cellules. Le flux de courant entrant en un point de l'axone s'étend le long de l'axone et dépolarise les sections adjacentes de la membrane.

L'objectif de cette thèse est de développer des implants permettant d'enregistrer les potentiels d'action (figure 2) de différents neurones individuellement grâce à des micro électrodes extracellulaires.

Le potentiel de champ local intracérébral (LFP) est une mesure de l'activité cérébrale qui reflète le flux d'informations dynamique à travers les réseaux de neurones. Il s'agit d'un signal composite recevant des contributions de sources neuronales multiples. Les potentiels de champ locaux (LFP) représentent principalement l'activité synaptique d'un ou plusieurs neurones. L'objectif de la thèse est aussi d'enregistrer et d'analyser les LFPs. Contrairement aux potentiels d'action qui sont des événements rapides (300-5000 Hz) les LFP sont des événements plus lents. Le principal facteur définissant l'amplitude des LFP est la géométrie des sources de courant (Herreras, 2016).

## 1.1 Enregistrement intracellulaire

Pour étudier les potentiels d'actions, il est possible de réaliser des enregistrements intracellulaires ou des enregistrements extracellulaires.

Les enregistrements intracellulaires de type sharp qui consistent à enregistrer le potentiel de membrane et les courants transmembranaires traditionnels nécessitent l'insertion d'une microélectrode à l'intérieur de la cellule. La plupart des électrodes se présentent sous la forme d'une micropipette en verre avec une pointe inférieure à 1 micron. Ces pipettes sont remplies de solution de liquide intracellulaire. Un fil de chlorure d'argent à l'intérieur de la pipette connecte cette solution à un amplificateur capable d'enregistrer et d'amplifier ce signal.

Dans la technique du patch-clamp la pipette n'est pas insérée dans la cellule et est placée sur un morceau de membrane (figure 3). Les micropipettes patch-clamp ont un diamètre légèrement plus grand que lors des enregistrements intracellulaires traditionnels et sont placées à proximité d'une cellule. Une aspiration douce attire une partie de la membrane dans la pointe, créant une situation appelée mode de fixation cellulaire. L'application d'une plus grande aspiration peut provoquer la rupture du patch en laissant l'électrode en contact avec l'intérieur de la cellule entière. Cela permet d'effectuer des enregistrements intracellulaires stables. Pour réaliser ce type d'enregistrement, cela nécessite de nombreux micromanipulateurs et un environnement sans secousses.

La méthode de potentiel imposé permet aux électrophysiologistes de mesurer les courants ioniques à travers les membranes cellulaires. Il nécessite un amplificateur qui maintient la tension de la membrane à un niveau défini. Pour ce faire, il mesure itérativement le potentiel de la membrane et injecte du courant afin de maintenir la tension à la valeur souhaitée. La méthode de courant imposé permet d'enregistrer le potentiel de la membrane tout en injectant un courant défini dans la cellule.

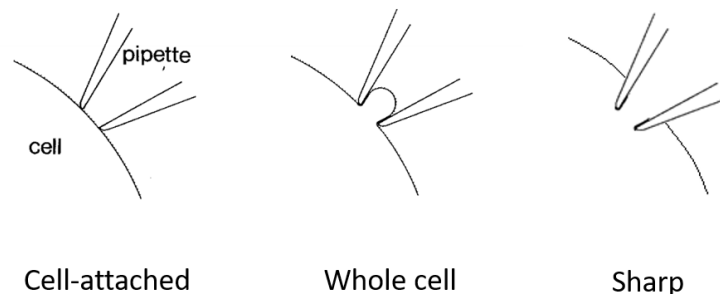


Figure 3 : Schémas montrant les différentes méthodes d'enregistrement cellulaire. (Hamill et al., 1981)

Lors des enregistrements intracellulaires, les tensions mesurées sont de l'ordre de quelques millivolts alors que les tensions mesurées lors de mesures extracellulaires sont de l'ordre du microvolt.

## 1.2 Enregistrement extracellulaire

Les enregistrements intracellulaires sont adaptés aux mesures des conditions ioniques dans une cellule unique. Les courants transmembranaires de la membrane cellulaire peuvent être mesurés par des électrodes placées à l'extérieur de la cellule en détectant les modifications du champ électrique qu'ils engendrent à l'extérieur. Cependant, l'amplitude du signal pouvant être enregistré est un facteur 100 à 1000 plus petit que les variations du potentiel intracellulaire. Les enregistrements extracellulaires montrent les modifications du courant ou du potentiel d'une ou plusieurs cellules entourant une microélectrode. Lorsque plusieurs neurones sont enregistrés, en utilisant deux électrodes ou plus, il

est possible de déterminer le nombre de cellules enregistrées et l'activité qui se produit dans chaque cellule en utilisant des algorithmes informatiques pour analyser les formes d'onde de l'activité électrique de plusieurs électrodes et distinguer l'activité des neurones individuels (Bernert and Yvert, 2017). Les potentiels de champs extracellulaire mesurent le potentiel électrique d'un groupe de cellules dont la source est difficile à déterminer. Les signaux de ces cellules se chevaucheront et l'enregistrement sera la somme de toute l'activité électrique. Ces enregistrements sont les champs de potentiels locaux.

### 1.3 Enregistrement extracellulaire multiélectrodes in vitro

Les réseaux multi-électrodes sont utilisés pour mesurer l'activité extracellulaire des neurones. Par rapport aux électrodes de pipettes en verre, le principal avantage de cette méthode de mesure est la possibilité de surveiller simultanément plusieurs cellules et de pouvoir ainsi obtenir des informations sur la connectivité des cellules dans le tissu ou le réseau cellulaire. Les applications possibles découlent de l'intérêt scientifique des activités électrophysiologiques spontanées et évoquées sur de longues périodes et des tests des effets biologiques d'agents toxicologiques et pharmaceutiques

Le premier réseau multi-électrodes micro-usiné indiqué, adapté au contrôle extracellulaire de l'activité électrique, a été fabriqué il y a environ 50 ans (Thomasjr et al., 1972). Les matrices de microélectrodes in vitro sont des puces contenant plusieurs électrodes autour desquelles une cuve est déposée (figure 4). Le nombre d'électrodes varie de quelques dizaines à des milliers, en fonction de la résolution spatiale et de la quantité de données requises par l'expérience. La taille ainsi que la forme des électrodes peuvent varier d'un MEA à l'autre. Les transistors sont aussi utilisés pour l'enregistrement extracellulaire (Fromherz et al., 1991). Différents types de matrice peuvent être utilisés pour une grande variété d'applications in vitro. Des cellules ou des préparations tissulaires peuvent être déposées dans cette chambre et maintenues en vie sur les électrodes de mesure.

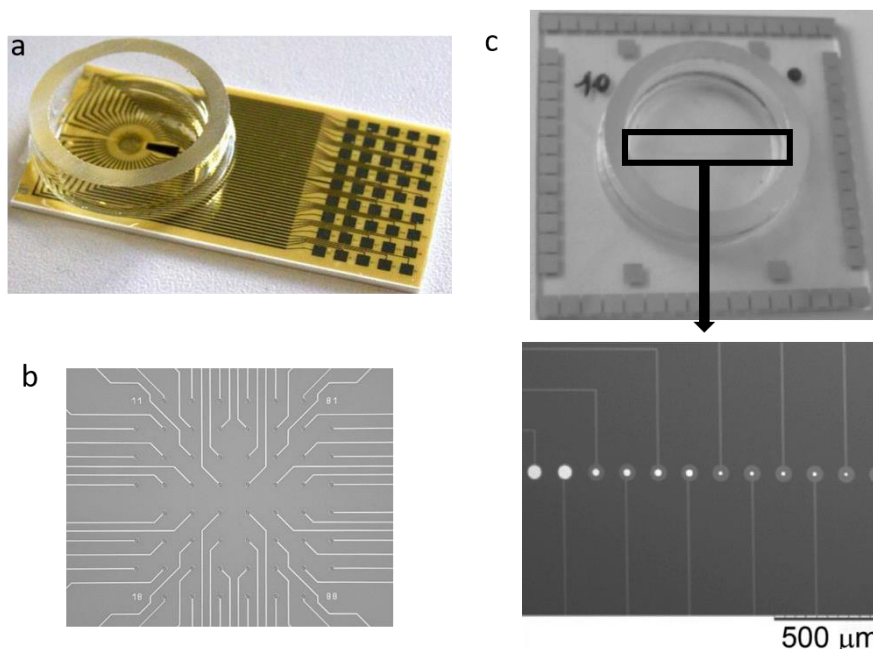


Figure 4 : a : MEA avec cuve b : Exemple de configuration des électrodes d'un type de MEA (©MCS MEA Manual) c : MEA et zoom au niveau des électrodes qui sont de tailles variables. (Heim et al., 2012)

## 1.4 Enregistrement In vivo

Nous avons à notre disposition différents outils permettant d'enregistrer l'activité d'un ou plusieurs neurones in vivo (figure 5).

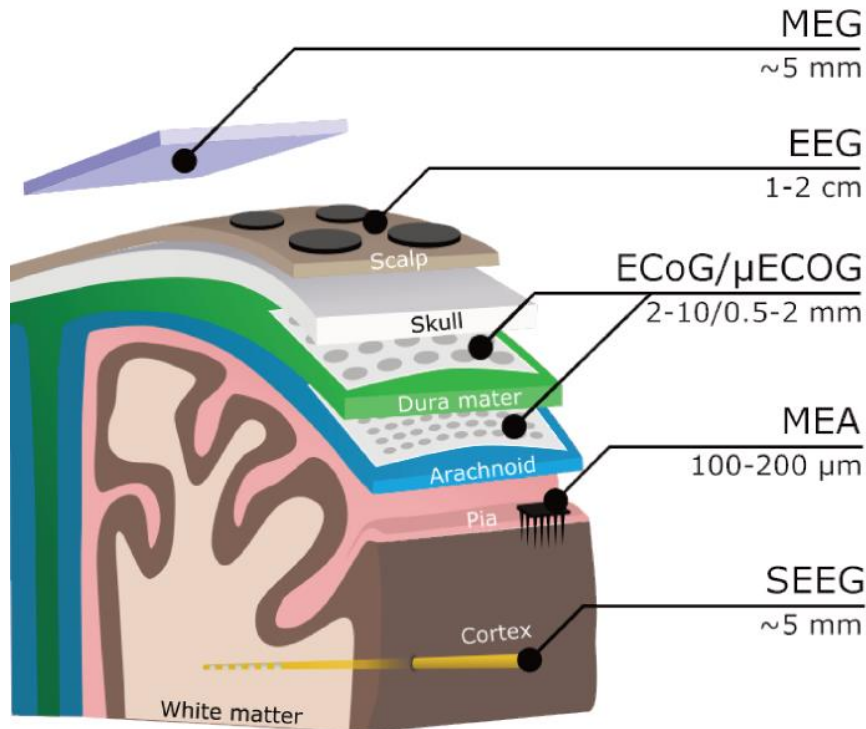


Figure 5 : Outils disponibles pour l'enregistrement neuronal (Thèse F. Bocquelet)

L'EEG et la MEG offrent la possibilité de mesurer directement l'activité neuronale en temps réel sans être invasifs.

L'EEG (Berger, 1929; Millett, 2001) est une méthode permettant d'enregistrer ces champs électriques résultant de l'activité cérébrale par l'intermédiaire d'électrodes placées à la surface du scalp. Sa facilité d'utilisation et son côté non invasif en font un outil intéressant notamment pour les études en sciences cognitives chez l'homme. En contrepartie, le signal mesuré ne permet pas d'obtenir un signal précis (un neurone ou une zone bien définie) et peut être fortement bruité.

La MEG est une méthode non invasive qui mesure les champs magnétiques produits par les courants électriques qui se produisent dans le cerveau. Le signal magnétique à l'extérieur de la tête est acquis à l'aide du dispositif d'interférence quantique supraconductrice (SQUID). Les signaux MEG peuvent interférer avec d'autres signaux magnétiques tels que le champ magnétique terrestre. Cette méthode d'enregistrement nécessite donc une configuration en laboratoire avec des blindages et des équipements spécifiques (Hämäläinen et al., 1993; He et al., 2013). Malgré ces problèmes de portabilité et de coût, les signaux MEG sont moins déformés par l'os du crâne par rapport aux champs électriques.

Contrairement à l'EEG, l'électrocorticographie intracrânienne (ECoG) est une technique invasive dans laquelle les électrodes sont directement posées sur la surface du cerveau. La plupart du temps, les

électrodes sont toutes rassemblées sur le même substrat et forment une feuille d'électrodes (Dong et al., 2017; Insanally et al., 2016; Pistohl et al., 2008). Bien que cette méthode soit plus invasive que l'EEG, les signaux obtenus sont de bien meilleure qualité avec un bruit très diminué et il est plus facile de localiser une région d'intérêt (Buzsáki et al., 2012). Bien que l'ECoG est utilisée pour cartographier le cerveau comme le cortex sensoriel (Crone et al., 1998; Howard et al., 2000) ou pour étudier la perception auditive (Crone et al., 2001), il est d'abord utilisé pour localiser les foyers épileptiques.

L'électroencéphalographie intracrânienne (SEEG) contrairement à l'ECoG permet de réaliser des enregistrements en profondeur dans le tissu cérébral (Yvert et al., 2005). Cette technique est utilisée pour réaliser des bilans pré chirurgicaux chez les épileptiques. En effet, la SEEG permet de localiser les régions épileptogènes. En revanche la taille des électrodes ainsi que la taille de la tige sur laquelle sont positionnées les électrodes sont généralement importantes (0,8 mm de diamètre et 1,5 mm de long en général). Cette technique ne permet donc pas d'enregistrer des neurones seuls.

## 1.5 Micro ECoG

Dans l'optique de réaliser des enregistrements plus localisés, les électrodes présentes sur les ECoG peuvent être plus petites et sont appelées microélectrodes. La technique est alors appelée  $\mu$ ECoG (Khodagholy et al., 2013; Viventi et al., 2011). Le substrat devient de plus en plus fin afin que la feuille d'électrode englobe au mieux les plis du cortex (Muller et al., 2016). Les électrodes qui sont généralement de simples conducteurs en or ou platine peuvent aussi être remplacées par des transistors afin d'augmenter le nombre et la densité des sites d'enregistrement (Hébert et al., 2018). Bien que les micro-ECoG permettent d'enregistrer des cellules neuronales seules, ils ne permettent d'enregistrer que les neurones situés à la surface du cerveau.

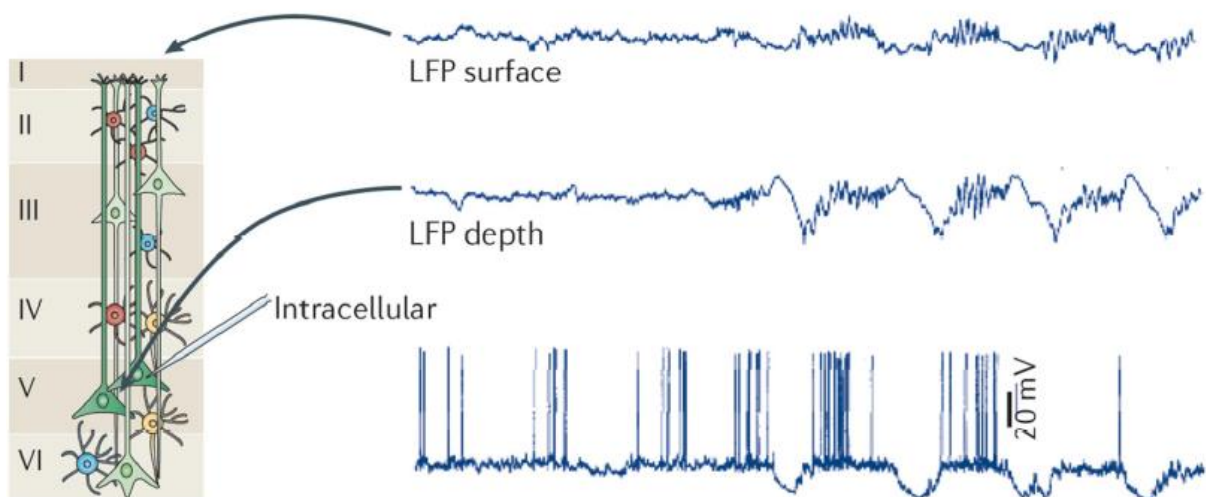


Figure 6 : Différence entre l'enregistrement des LFP en surface ou en profondeur (Buzsáki et al., 2012)

L'implant intra-cortical permet d'enregistrer des signaux au sein même du tissu cérébral. Il est encore plus invasif que l'ECoG mais les signaux enregistrés sont de meilleure qualité, surtout les signaux de spikes (figure 6) (Buzsáki et al., 2012).

## 1.6 Implants intracorticaux

Un implant intracortical intègre des micro électrodes dans un même dispositif et permet d'enregistrer les cellules nerveuses en profondeur dans le cortex. Concrètement un implant est composé typiquement d'une zone d'enregistrement avec des électrodes qui seront au contact du tissu, d'une zone de connexion avec des pads (ou plots) de connexion reliée à la station d'enregistrement et d'une zone de pistes isolées reliant les électrodes aux pads de connexion. Les électrodes, les pads de connexion ainsi que les pistes sont réalisés avec des matériaux conducteurs. Les pistes sont recouvertes de matériaux isolants biocompatibles. Les implants existants se différencient par leur forme, par les matériaux utilisés, par le nombre d'électrodes et par le type de connectique utilisée. La géométrie des implants est un facteur de grande influence sur les performances de l'implant. Elle comprend la taille des électrodes, l'organisation spatiale des électrodes, le design global ainsi que la topographie des implants.

### 1.6.1 Fils, électrode neurotrophique et tétrode

Les premiers enregistrements ont été réalisés avec de simples fils de différents matériaux. Des fils en cuivre ont été utilisés pour enregistrer les impulsions des fibres nerveuses de chats (Adrian and Bronk, 1929). Des fils en argents ont été aussi implantés chez le chat (Rheinberger and Jasper, 1937). Des aiguilles en argent ont aussi été utilisées pour enregistrer le thalamus chez l'humain (Williams and Parsons-Smith, 1949). Des fils de tungstène effilés à une extrémité et isolés avec du vinyle ont permis d'enregistrer le cortex de chat (Hubel and Wiesel, 1959). Ces différents fils sont fonctionnels mais ne permettent d'enregistrer qu'un site à la fois. De plus, les matériaux tel que l'argent ne sont pas toujours très biocompatibles. Les fils n'ont pas montré une grande stabilité d'enregistrement dans le temps.

Les tétrodes ont d'abord été utilisées pour enregistrer les neurones de l'hippocampe (Wilson and McNaughton, 1993) puis ensuite pour les neurones du cortex (Gray et al., 1995). Les tétrodes ont été fabriquées à partir de quatre brins de fil fin en alliage nickel-chrome, isolés aux extrémités et torsadés ensemble (le diamètre total était de 40  $\mu\text{m}$ ). Le principe d'enregistrement utilise les amplitudes relatives des signaux des neurones sur quatre canaux d'enregistrements pour faciliter l'isolation du neurone (figure 8).

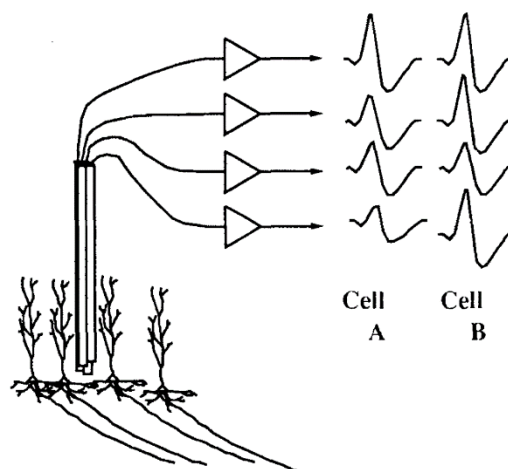


Figure 7 : Schéma de principe de la tétrode à quatre canaux parmi quatre cellules pyramidales (O'Keefe and Recce, 1993)



Kennedy et al ont aussi développé un système simple ne comportant qu'un site d'enregistrement. L'électrode conique consiste en un fil d'or isolé au téflon fixé à l'intérieur d'un cône de verre implanté dans le cortex après l'insertion d'un morceau de nerf sciatique à l'intérieur (figure 7). La longueur du cône est de 1,5 mm, le diamètre des pointes est inférieur à 200  $\mu\text{m}$  (extrémité profonde) et à 300  $\mu\text{m}$  (extrémité superficielle). Il a été démontré que des neurites se développaient et migraient des neurones corticaux au cône en verre (Kennedy, 1989). Cet implant est un des premiers implants à avoir démontré de bon enregistrements corticaux sur le long terme.

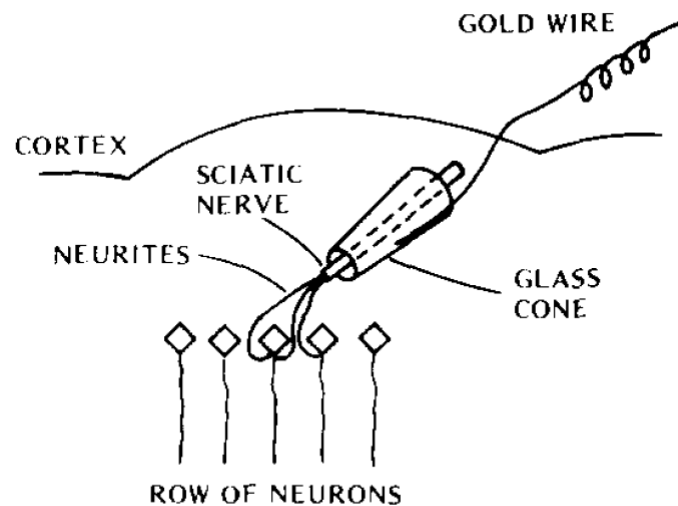


Figure 8 : Electrode "Cone"(Kennedy, 1989)

La majorité des techniques permettant de séparer plusieurs potentiels d'action dans un train de potentiels d'action d'un enregistrement repose sur l'hypothèse que les différentes cellules nerveuses présentent des potentiels d'action ayant des amplitudes et des formes d'onde uniques. Lorsque cette hypothèse échoue en raison de la similarité de la forme des potentiels d'action entre différentes cellules ou de la présence de potentiels d'action complexes avec une amplitude variable dans le temps, ces méthodes conduisent à des erreurs de classification. Comme dans le cas de fils seul, cette électrode ne permet d'enregistrer qu'un site à la fois. Il est cependant possible d'assembler plusieurs fils distincts (Nicollelis et al., 2003) afin de multiplier les sites d'enregistrement.

### 1.6.2 Implant rigide haute densité

L'augmentation rapide du nombre et de la densité des sites d'enregistrement requis pour les enregistrements à grande échelle est toutefois inhibée par des méthodes de fabrication coûteuses en temps (fabrication manuelle), des contraintes spatiales, une complexité accrue de l'implantation de la sonde et des difficultés pour positionner avec précision différents sites d'enregistrement les uns par rapport aux autres, ainsi que par des difficultés à connecter un grand nombre d'électrodes individuelles à la station d'enregistrement. Les réseaux d'électrodes multicanaux à base de silicium réalisés à l'aide de technologies de systèmes microélectromécaniques offrent un agencement précis et automatisé de plusieurs sites d'enregistrement. Différents types d'implants en silicium ont été réalisés.

Les sondes du type Michigan (Wise et al., 1970) sont en formes d'aiguilles, fixés à une base de sonde plus large. Suivant la version, sur chaque aiguille, plusieurs électrodes peuvent être disposés (figure

9a). Les électrodes sont interconnectées aux plages de contact sur la base de la sonde par des lignes métalliques intégrées le long de l'aiguille de la sonde.

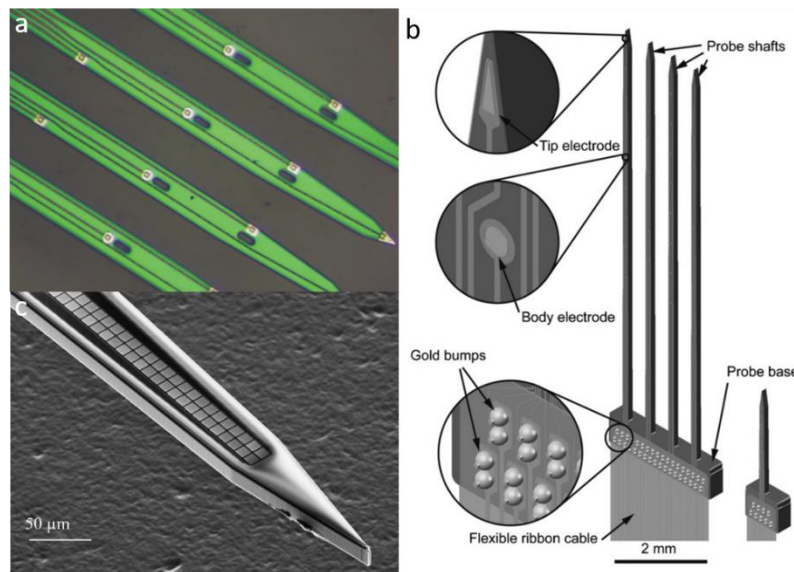


Figure 9 : a : Aiguilles de l'implant Michigan (<http://ece.umich.edu/bicentennial/stories/the-michigan-probe.html>) b : Implants directement connecté à un câble ruban très flexible (Herwik et al., 2009) c : Sites d'enregistrement compacts sur une tige en silicium pour un enregistrement neuronal (Scholvin et al., 2016)

D'autres implants similaires suivant le même principe (un ensemble d'aiguille rattaché à une base) mais utilisant un agencement des aiguilles différent ont aussi été réalisés (Herwik et al., 2009) (figure 9b). Des aiguilles avec une forte densité d'électrodes ont également été fabriquées (Scholvin et al., 2016) (figure 9c).

L'implant Utah array est utilisé en clinique chez l'homme (Hochberg et al., 2006; Simeral et al., 2011). Cet implant est composé d'un ensemble d'aiguilles (plus fines que les aiguilles de l'implant Michigan, 80 μm Vs 150 μm) positionnées sur une base en silicium (Maynard et al., 1997) (figure 10a). Une seule électrode est présente sur chaque aiguille au niveau de son extrémité.

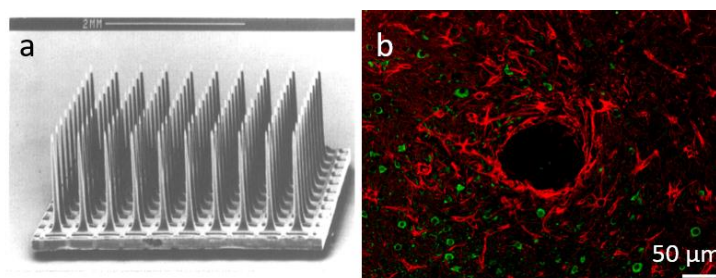


Figure 10 : a : Utah Array (Maynard et al., 1997) b : Réaction immunitaire suite à l'implantation chronique d'un implant en silicium (Marin, 2010)

Comme on peut le voir sur la figure 10b, les implants rigides en silicium induisent une réponse immunitaire et ainsi la migration d'astrocytes autour de l'implant. Cela est donc un problème pour obtenir de bon enregistrements sur le long terme.

### 1.6.3 Implant flexible

L'importance de la rigidité des sondes a été démontrée dans les études comparant la réponse immunitaire à des implants ne se différenciant que par la flexibilité directionnelle, où la prolifération astrocytaire était considérablement réduite dans l'axe dans lequel l'électrode pouvait suivre les mouvements des tissus (Köhler et al., 2015). Les sondes constituées de polymères flexibles implantées dans le modèle de rat ont montré une réponse inflammatoire réduite par rapport aux implants rigides (Nguyen et al., 2014).

Ainsi des implants en polymère flexible ont été développés.

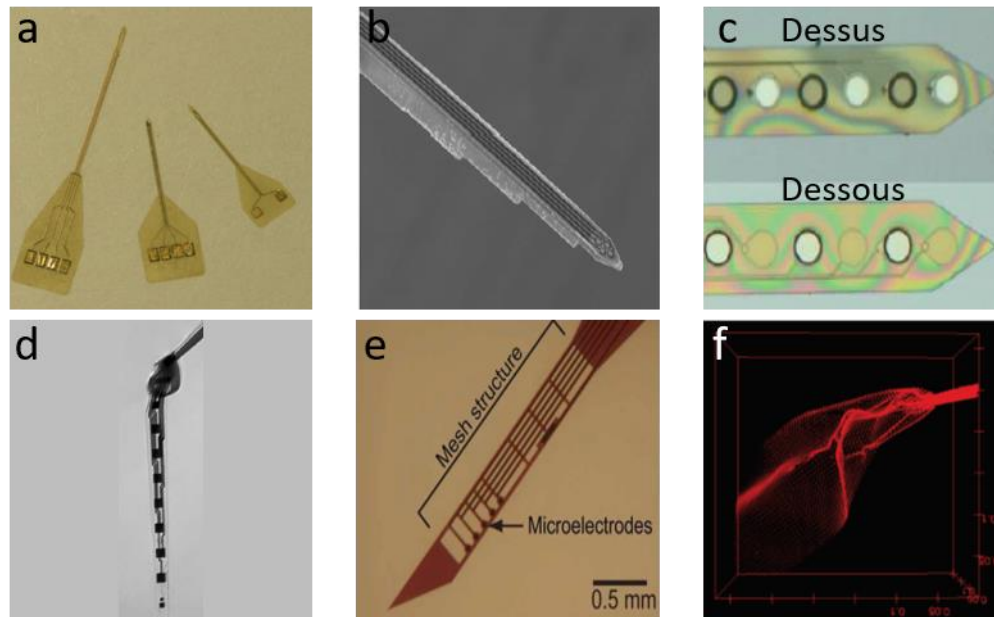


Figure 11 : a : Implant en polyimide (Xiang et al., 2014) b : Implant en SU-8 (Altuna et al., 2012) c : Implant en polyimide avec électrode sur les deux faces (Tooker et al., 2012) d : Implant en SU-8 de 1 µm d'épais (Luan et al., 2017) e : Implant en polyimide photosensible avec une structure ouverte (Kato et al., 2012) f : Filet d'électrode (Liu et al., 2015)

Des implants flexibles sont sous forme de longues pointes (Altuna et al., 2012; Castagnola et al., 2015b; Kim et al., 2014) où les électrodes se situent au bout ou le long de la pointe (figure 11a,b,c,d). Les électrodes sont souvent sur le même plan 2D. Certains implants ont cependant des électrodes sur les deux faces de la tige (figure 11c) (Tooker et al., 2012). D'autres implants sont de formes sinusoïdales (Sohal et al., 2014).

Encore peu d'implant permettent d'enregistrer en haute densité tout en étant flexible. Le filet d'électrode développé par Schuhmann et al permet d'enregistrer 32 voies simultanément (Schuhmann et al., 2017). Un autre implant composé de plusieurs pointes flexibles permettent d'enregistrer jusqu'à 64 électrodes (Wu et al., 2013).

La tendance actuelle est à la miniaturisation des dimensions des implants corticaux. Or la réduction de la taille des électrodes n'est pas sans conséquence. Les électrodes de plus petites tailles sont plus fragiles. Comme il sera décrit dans le paragraphe 1.7, les matériaux utilisés pour réaliser l'implant modifient grandement les performances de l'implant. Lors de la conception d'un implant, la géométrie (nombre d'électrodes, espacement entre les électrodes, longueur des pointes...) de l'implant devra répondre aux exigences de l'utilisateur final (enregistrement dans une ou plusieurs régions du cerveau, enregistrement d'un ou plusieurs neurones par site d'enregistrement).

Il existe aujourd'hui de nombreuses options quant aux matériaux utilisables pour réaliser les différentes parties de l'implant. Le choix du duo isolant/conducteur dépend de nombreux facteurs tels que les performances électriques, la fabrication et la biocompatibilité des matériaux.

## 1.7 Matériaux de la partie Isolante de l'implant

L'isolant a un rôle important tout au long de la vie de l'implant. Sa fonction première est d'assurer un bon isolement des pistes métalliques le plus longtemps possible. Or l'isolant se doit d'être biocompatible afin d'éviter tout rejet du système immunitaire ou toute contamination toxique. Il faut donc trouver des matériaux biocompatibles et résistants dans l'environnement du tissu cérébral. Toute délamination de l'implant est synonyme d'implant inutilisable. En effet, dès lors que l'isolant se détériore ou se délamine, la partie conductrice (hors électrode) est au contact du milieu (des neurones) ce qui conduit à l'apparition de signaux parasites lors des enregistrements. De plus, l'isolant va donner à l'implant ses propriétés mécaniques. Un isolant trop rigide ne conviendra pas pour un enregistrement chronique tandis qu'un isolant flexible complexifiera l'insertion de l'implant dans le tissu cortical. Des matériaux sont aujourd'hui plus utilisés que d'autres car ils répondent relativement bien aux exigences nécessaires à l'élaboration d'implants performants.

### 1.7.1 Le silicium

Les implants rigides sont souvent fabriqués sur un support silicium sur lequel les pistes, électrodes et pads de connexion sont dessinés. La passivation se fait par ajout d'un polymère tel que le parylène C (Bhandari et al., 2010). Le silicium est principalement utilisé pour sa biocompatibilité, sa facilité d'utilisation et sa rigidité. Cette dernière permet une insertion relativement aisée dans le tissu cérébral. Cette rigidité a l'inconvénient de créer des brèches dans la barrière hémato-encéphalique et de ne pas absorber les micromouvements (Barrese et al., 2013). Cela provoque des cicatrices et une réaction du système immunitaire qui conduit à l'endommagement l'implant (Chen et al., 2017a). Les implants intra corticaux les plus populaires en silicium sont l'Utah Array ainsi que le Michigan probe.

### 1.7.2 Parylène

Le parylène C (figure 12) est très utilisé pour réaliser des implants souples. Ce matériau, admis en clinique, offre de très bonnes propriétés diélectriques. Sa souplesse est la raison majeure de son utilisation dans les implants. Il est aussi bien utilisé dans des systèmes pour stimuler les nerfs (de la Oliva et al., 2018) ou des ECoG (Castagnola et al., 2015a; Khodagholy et al., 2013; Toda et al., 2011) que dans des implants intracorticaux (Kim et al., 2014; Sohal et al., 2014). Le problème majeur est sa faible adhésion aux métaux (Seymour et al., 2009) et la faible adhésion entre deux couches de parylène. Plusieurs méthodes existent afin de renforcer l'adhésion de deux couches de parylène. L'utilisation de plasma d'oxygène ou la combinaison d'un traitement en température et en pression sont des solutions pour l'amélioration de l'adhésion du parylène (Seymour et al., 2009). Le dépôt de parylène se fait par voie vapeur et donc nécessite un bâti parylène qui peut être relativement couteux.

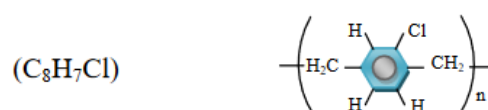


Figure 12: Structure chimique du parylène C

### 1.7.3 SU-8

La SU-8 est une résine de base époxy qui est photosensible. Ce matériau est un très bon isolant. Sa photosensibilité est très intéressante car elle permet de réaliser simplement des motifs complexes et précis (Liu et al., 2015). Le matériau a montré de premiers résultats prometteurs au niveau de sa biocompatibilité (Nemani et al., 2013) mais il n'est pas encore accepté en clinique. Il se dépose avec une simple tournette par spin-coating. Les tests in vitro et in vivo sur un implant SU-8 montrent une faible encapsulation et pas de toxicité (Huang et al., 2014). Un implant de 86  $\mu\text{m}$  d'épais a une rigidité suffisante pour être implanté dans le cortex. La superposition de couche de SU-8 est aussi une méthode afin de profiter de la flexibilité de la SU-8 et de la rigidité du multicouche (Altuna et al., 2012). La SU-8 est aussi utilisée dans avec d'autres résines comme avec le parylène (Márton et al., 2014a). Bien que des implants de 1  $\mu\text{m}$  d'épais soient réalisés en SU-8 (Liu et al., 2015), la manipulation de couches fines de SU-8 reste très délicate.

### 1.7.4 Polyimide

Le polyimide est un polymère qui comporte des groupes imides (figure 13). Il est reconnu pour sa forte résistance mécanique, chimique et thermique. Le polyimide se dépose avec une simple tournette par spin-coating (annexe 2) et peut être photosensible (Kato et al., 2012). Cette photosensibilité permet d'accélérer la phase de fabrication. Il faut cependant faire attention au rétrécissement pendant la cuisson du polyimide. Ce matériau est très utilisé comme isolant dans les implants neuronaux. Le polyimide est aussi bien utilisé dans les implants EcoG (Dong et al., 2017; Kato et al., 2012), intracorticaux (Kato et al., 2012) ou intrafasciculaire (Wurth et al., 2017). Pour améliorer la dégradation et la délamination des implants dans le temps, certains traitements thermiques ou chimiques ou dépôt de couches métalliques intermédiaires peuvent être appliqués (Ceyssens and Puers, 2015). Pour certaines applications le polyimide a été accepté par la FDA (Pacemaker, St Jude Medical).

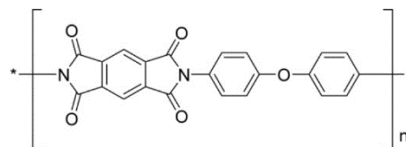


Figure 13: Structure chimique du polyimide (Georgiev et al., 2012)

## 1.7.5 Tableau comparatif

Tableau 1 : Tableau comparatif des principaux matériaux utilisés comme isolant dans les implants

Matériaux	Parylène	SU-8	Polyimide
Module d'Young (Gpa)	2,76	4,02	2,3-8,5
Resistance à la traction (Mpa)	69	60	350
Délamination	Mauvais (Hassler et al., 2010)	Bon (Matarèse et al., 2018)	Moyen (Ceysens and Puers, 2015; Ordonez et al., 2012)
Résistivité volumique (Ohm.cm)	6.10e16	2.8.10e16	>10e16
Coefficient d'expansion thermique (10e6/C°)	35	60	3
Dépôt	Dépôt CVD, pyrolyse 700 °C.	Tournette	Tournette
épaisseur	2 nm- 23 µm	0.5-50 µm	1-13 µm
recuit	aucun	95°C	350 °C ou 200°C si photosensible
gravure	plasma oxygène (Castagnola et al., 2015b)	Lithographie ou plasma argon oxygène	Plasma ou lithographie (Kato et al. 2012)
décollement	Couche sacrificiel (Castagnola et al., 2015b; Sohal et al., 2014)	Couche sacrificielle (Altuna et al., 2012)	Couche sacrificielle ou tirage (Pothof et al., 2014)
Toxicité	FDA approuvé	Pas FDA approuvé	non FDA approuvé mais en bonne voie
biocompatibilité	Bonne (Winslow et al., 2010)	Bonne (Nemani et al., 2013)	Bonne (Lago et al., 2007)
Attachement neurones	Correcte (Winslow et al., 2010)	Bonne (Matarèse et al., 2018)	Bonne (del Valle et al., 2015)
Atout majeur	FDA approuvé	Bonne adhésion sur métaux	Très résistant

## 1.8 Matériaux de la partie conductrice

La plupart des implants neuronaux utilisent des électrodes métalliques (Collinger et al., 2013; Normann, 2007; Shepherd et al., 2013; Wilson and Dorman, 2008). Les électrodes Ag/AgCl sont utilisées pour les casques EEG mais ne sont pas biocompatibles. Les fils utilisés pour réaliser les enregistrements in vivo sont classiquement réalisés en tungstène. Les électrodes de platine, d'or ou de platine-iridium sont aujourd'hui très utilisées pour réaliser des implants corticaux (Geddes and Roeder, 2003). Le platine et l'iridium sont les plus populaires dans la fabrication des implants neuronaux. Le platine est stable électro-chimiquement et est résistant à la corrosion (White and Gross, 1974). Son impact sur le tissu environnant reste donc très limité (Merrill et al., 2005; Polikov et al., 2005).

Cependant, avec la miniaturisation des électrodes, le platine montre des limitations mécaniques et électrique. Il a été démontré que la rétine devait être stimulée avec une densité de charges entre 48 et 357 µC/cm<sup>2</sup> chez les patients atteints de trouble visuel (Mahadevappa et al., 2005). Or le platine a une limite d'injection de charge autour entre 20 et 150 µC/cm<sup>2</sup> (Green et al., 2012; Rose and Robblee, 1990). Une injection de charge plus importante avec le platine pourrait engendrer la création de nouvelles espèces et détériorer la rétine.

Pour faire face à ces nouveaux challenges, d'autres matériaux sont également développés pour réaliser les électrodes ; notamment les polymères conducteurs comme le poly(3,4éthylènedioxythiophène) (PEDOT) ou le diamant. Or ces matériaux doivent encore faire leurs preuves en clinique sur le long terme avant de pouvoir devenir des matériaux de références pour la stimulation et l'enregistrement neuronal. Les matériaux présentés ci-dessous sont les plus utilisés ou les plus prometteurs.

### 1.8.1 Or

L'or est un métal noble et un bon conducteur. Il est utilisé pour réaliser les pistes de connexion entre l'électrode et le pad de connexion (Liu et al., 2015). L'or est utilisé comme couche de base afin d'ajouter une couche sur une électrode par électrodéposition (Mailley et al., 2002). Des couches d'accroches comme le chrome ou le titane (Chung et al., 2015) sont nécessaires pour éviter tout décollement de l'or. La gravure de l'or peut être chimique en utilisant une solution de iodure de potassium iodée ou physique en utilisant un plasma (Green, 2014) bien que la méthode de lift-off soit aussi utilisée (Chung et al., 2015). Il est l'un des premiers matériaux utilisés pour réaliser des électrodes intracorticales ((Kennedy, 1989). Il a depuis été remplacé par le platine, ce dernier possédant de meilleures performances électriques avec une meilleure capacitance malgré une bonne biocompatibilité de l'or (Geddes and Roeder, 2003).

### 1.8.2 Platine

Le platine est un métal noble. Il est très résistant à la corrosion et est très stable chimiquement. Il est très utilisé lors de la fabrication des implants. Il a une bonne conduction électrique. Il est souvent déposé par PVD et modelé par photolithographie. La gravure du platine peut se faire avec un plasma ou par lift off (Márton et al., 2014b; Ong et al., 2016) voir par gravure humide (Köllensperger et al., 2012).

La conductivité du platine n'étant pas optimale pour stimuler ou enregistrer les signaux des techniques sont utilisées pour améliorer son impédance. Le platine noir lui se forme par électrodéposition (Tang et al., 2014). Bien que le platine noir possède une voltamétrie cyclique plus importante que les autres structures, il reste plus fragile mécaniquement et non biocompatible. Le platine noir est aussi être déposé (Marrese, 1987), il améliore bien les performances électriques mais reste très instable mécaniquement (Desai et al., 2010). L'utilisation de cristaux liquide lyotropique permet de créer du platine mesoporeux (Attard, 1997) L'utilisation de colloïdes permet la création de macropores et nanopores. (Heim et al., 2012).

Il est aussi possible de déposer du platine par réaction de réduction ce qui permet d'obtenir des nano-herbes et ainsi avoir une électrode en 3D. Ces nanostructures améliorent l'impédance ainsi que la capacité d'injection de charge (Boehler et al., 2015; Li et al., 2015).

### 1.8.3 Nitrure de titane

Le nitrure de titane (TiN) est un matériau créé à partir de titane et d'azote (Egert et al., 1998). Ce composé est réfractaire, il est dur et est stable chimiquement et thermiquement (Cogan, 2008).. Il est souvent utilisé pour sa bonne résistance à la corrosion (Kuwahara et al., 2001). Ce matériau peut être déposé par dépôt chimique en phase vapeur CVD (Kashani et al., 2000) ou par pulvérisation magnétron à courant continu (Jeyachandran et al., 2007; Lawand et al., 2012). Il est utilisé dans divers domaines tels que dans les implants orthopédiques (van Hove et al., 2015). Il est utilisé comme couche supérieure afin d'améliorer les caractéristiques électriques des électrodes (Jiang and Gao, 2006; Sait and Cross, 2017). Des nanostructures en colonnes peuvent être présentes dans les couche de TiN (Sait and Cross, 2017). Des implants corticaux haute densité avec des électrodes de 20 µm par 20 µm

recouvertes de nitrure de titane ont permis d'enregistrer des potentiels d'action avec un faible bruit (Fiáth et al., 2018).

#### 1.8.4 Oxyde d'iridium

L'oxyde d'iridium est un matériau utilisé pour améliorer la capacité d'injection de charge. Il existe différentes façons de déposer de l'oxyde d'iridium. L'oxyde d'iridium peut être électrodéposé par l'intermédiaire d'une réaction d'oxydation sur une couche d'or. (Mailley et al., 2002). On peut aussi obtenir de l'oxyde d'iridium en activant une couche d'iridium avec les bons signaux électriques. (Pour Aryan et al., 2012). Des processus de fabrication moins coûteux existent tel que la déposition par bain chimique (Chen et al., 2017b). Il est aussi possible de déposer de l'oxyde d'iridium par pulvérisation et de le modeler par lift off (Kang et al., 2016). Negi démontre que l'oxyde d'iridium pulvérisé est plus résistant que l'oxyde d'iridium activé par pulse (Negi et al., 2010).

L'oxyde d'iridium est aussi combiné à d'autres matériaux afin d'améliorer la capacité d'injection de charge. Il peut être utilisé avec du graphène (Pérez et al., 2015) ou du ruthenium (Ullah and Omanovic, 2015). Il est aussi déposé sur du platine noir (Yamagiwa et al., 2015) ou des nanotubes de carbone (Carretero et al., 2014) afin d'avoir une structure en 3D.

#### 1.8.5 Nanotube de carbones

Les nanotubes de carbones (CNT) (figure 14) sont des cylindres creux dont les parois sont en graphène. Les CNT à paroi simple (SWCNT) sont les plus simples avec un diamètre compris entre 0,4 et 2,5 nm et des longueurs allant jusqu'à quelques millimètres. Les nanotubes de carbone à parois multiples (MWCNT) sont composés d'un ensemble de SWCNT organisés de façon coaxiale et ont un diamètre de 2 à 100 nm, tandis que leur longueur peut varier de un à plusieurs centaines de micromètres (Harris, 2009). La chiralité, ainsi que le diamètre du tube et le nombre de parois de graphène, déterminent la conductivité des CNT. En général, les SWCNT peuvent être métalliques ou semi-conducteurs avec des MWCNT présentant un comportement métallique (Charlier et al., 2007). Les CNT sont également mécaniquement stables avec des résistances à la traction et une inertie chimique très élevées (Ciraci et al., 2004; Hayashi et al., 2007). Les CNT sont généralement synthétisés à partir d'un catalyseur par diverses méthodes, notamment par dépôt chimique en phase vapeur (CVD), par décharge à l'arc électrique et par l'ablation au laser (Seah et al., 2011; Thostenson et al., 2001). L'interaction neurone-CNT semble fortement affectée par la rugosité de la surface. Il a été suggéré que la rugosité des CNT permettait une bonne accroche des neurones (Sorkin et al., 2009; Xie et al., 2006; Zhang et al., 2005). En revanche, la biocompatibilité des nanotubes n'est pas prouvée et ils pourraient être toxique (Smart et al., 2006).

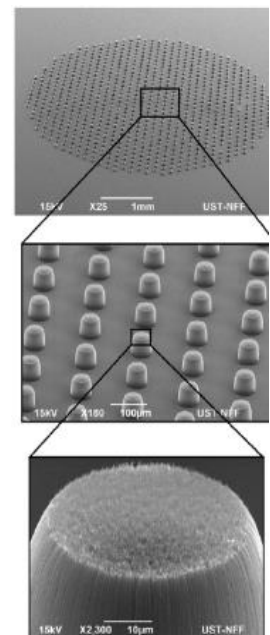


Figure 14:  
Electrodes CNT  
(Khalifa et al 2015)



### 1.8.6 Diamant

Le diamant est composé de carbone cristallisé. Le diamant peut être aussi bien un très bon isolant qu'un bon conducteur (Garrett et al., 2016). Il est utilisé dans différents types d'implants : les implants cochléaire (Cai et al., 2016), les implants rétiniens (Bendali et al., 2015) ou implant nerveux (Halpern et al., 2010). Il existe différents types de diamant. Le diamant peut être plat ou nanostructuré (figure 15) (Hébert et al., 2015). La grande différence des deux types de diamant intervient lors de la fabrication. La structure 3D du diamant poreux est par exemple créée grâce à la formation de nanotube de carbone qui sont eux même recouverts par du diamant. Le diamant dopé et nanostructuré montre un bruit et une impédance bien inférieure à celle du diamant plat (Piret et al., 2015a). Le diamant permet d'enregistrer des potentiels d'actions et de stimuler efficacement (Piret et al., 2015a). De plus, les neurones se multiplient plus facilement sur les structures 3D en diamant (Specht et al., 2004).

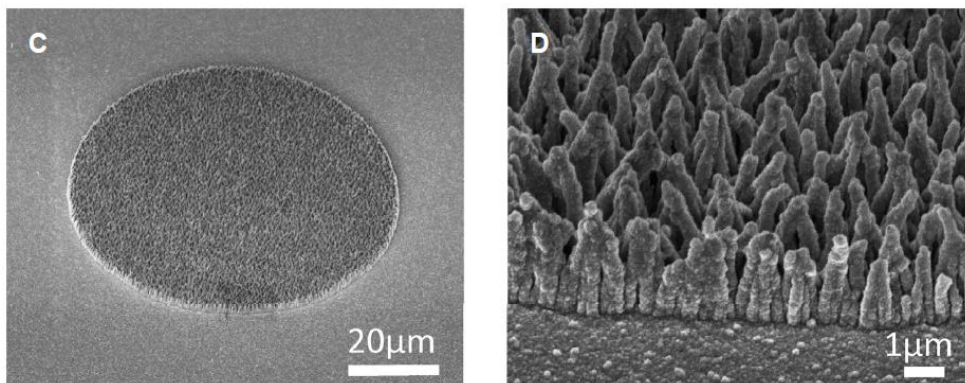


Figure 15: Micro électrodes en diamant nanostructuré en 3D (Piret et al., 2015a)

### 1.8.7 Graphène

Le graphène est un assemblage bidimensionnel d'atomes de carbones sous forme de feuille monoatomique. Il existe différentes manières de produire du graphène : directement par décollage mécanique d'atomes de carbones sur le graphite (exfolié), en éliminant les atomes de silicium du carbure de silicium par une augmentation de la température (1300 °C) (épitaxié) ou par décomposition catalytique à haute température d'un gaz carboné sur un métal (CVD) (Pumera et al., 2010).

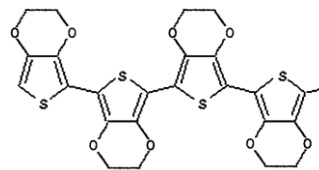
Dans la fabrication d'implants neuronaux, la CVD est la technique la plus souvent utilisée. Une fois le graphène déposé sur un métal (du cuivre dans la plupart des cas), le graphène doit être décollé et déposé sur le substrat souhaité (Kuzum et al., 2014). Le graphène peut aussi être développé directement sur un substrat en polyimide grâce à un laser qui pyrolyse le polyimide qui devient une mousse de graphène. Le principal inconvénient de cette méthode est la taille des électrodes (250 µm de diamètre) qui dépend de la résolution du laser (Lu et al., 2016).

Les grands avantages du graphène sont sa transparence, son côté extensible et sa très bonne conductivité électrique. Le graphène est aussi utilisé pour réaliser des alliages avec de l'oxyde d'iridium (Carretero et al., 2014; Pérez et al., 2015).

### 1.8.8 Polymère PEDOT

Les polymères conducteurs sont synthétisés à partir de composants chimiques (figure 16). Cette particularité d'être conducteur est fortement intéressante pour le revêtement des électrodes. Les polymères conducteurs peuvent aussi bien permettre d'injecter des ions que des électrons. Le Pedot est un polymère conducteur dopé p et très largement utilisé pour recouvrir les implants corticaux (Castagnola et al., 2015a). Il existe différents types de PEDOT. Celui-ci peut être modifié comme le methoxy-PEDOT (PEDOT- MeOH), le PEDOT modifié par acide carboxylique (PEDOT-COOH) et le propylenedioxythiophene (Pro-DOT) (Feldman and Martin, 2012). Le PEDOT est l'un des polymères conducteurs les plus prometteurs grâce à sa stabilité chimique et électriques en milieu aqueux et oxygéné (Cui and Martin, 2003; Green et al., 2013; Guimard et al., 2007). Sa résistance à la corrosion sur le long terme lors de son utilisation dans les électrodes dédiées à la stimulation reste cependant à être démontrée.

Le Pedot peut être fabriqué par des méthodes chimiques et électrochimiques. La synthèse chimique permet de réaliser des structures complexes mais il est relativement difficile de l'utiliser sur des électrodes métalliques. L'électrodéposition permet un dépôt direct sur l'électrode et les paramètres de dépôt (tension, temps de cycle) permettent le contrôle de l'épaisseur et de la rugosité du dépôt (Aregueta-Robles et al., 2014). Les dopants les plus utilisés sont le poly(styrenesulfonate)(PSS) (Pranti et al., 2017), le para- toluenesulphonate(pTS), le dexamethasonephosphate(Dex-P), et le perchlorate(ClO<sub>4</sub>).



ii. Poly(3,4-ethylene dioxythiophene)  
(PEDOT)

Figure 16: Structure du PEDOT (Green et al., 2008)

Le Pedot est utilisé pour réaliser différents types d'implants implants comme des micro-ECOG (Khodagholy et al., 2015).

## 1.8.9 Tableau comparatif des matériaux conducteur

Tableau 2 : Tableau comparatif des matériaux utilisés pour réaliser les électrodes conductrices

Matériaux	Taille élec	CSC	impédance	CIC	Bruit	Reference
<b>Or</b>	615 $\mu\text{m}^2$	2,56 mC/cm <sup>2</sup>	1,3 MOhm			(Chen et al., 2013)
	32 $\mu\text{m}$		30 kOhm 1 Khz		5,5 $\mu\text{V}$	(Zhang et al., 2012) (Seker et al., 2010)
<b>Platine</b>		50-150 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$				(Rose and Robblee, 1990)
	100 $\mu\text{m}$	300-350 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$	25,2 Kohm			(Brummer and Turner, 1977)
	30x30 $\mu\text{m}$	CSCc 3,1 mc/cm <sup>2</sup>	616 Kohm 1 Khz		50 $\mu\text{V}$	(Li et al., 2015) (Márton et al., 2014b)
<b>Platine 3D</b>	12 $\mu\text{m}$		2000 KOhm		8 $\mu\text{V}$	(Heim et al., 2012)
	100 $\mu\text{m}$	CSCc 75 mC/cm <sup>2</sup>	100 Kohm			(Robinson, 1968)
	30x30 $\mu\text{m}$		5,8 Kohm			(Li et al., 2015)
	2.10-5 cm <sup>2</sup>	17 mC/cm <sup>2</sup>	112 Kohm 1 Khz		18 $\mu\text{V}$	(Márton et al., 2014b)
	35 $\mu\text{m}$		30 Kohm	0,5 mC/cm <sup>2</sup>		(Leber et al., 2017)
<b>Titane nitride</b>	12 $\mu\text{m}$	750 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$	25 kOhm (100 Hz)	0,4 mC/cm <sup>2</sup>		(Boehler et al., 2015)
			100 KOhm		3 $\mu\text{V}$	(Heim et al., 2012)
	50 $\mu\text{m}$	0,2 mC/cm <sup>2</sup>	24 Kohm	4,45 mC/cm <sup>2</sup>		(Patan et al., 2006)
	6 mm <sup>2</sup>	CSCc 170 mC/cm <sup>2</sup>	350 Ohm			(Pour Aryan et al., 2012)
<b>Iridium Oxyde</b>	4000 $\mu\text{m}^2$	0,25 mC/cm <sup>2</sup>	11 Kohm	0,9 mC/cm <sup>2</sup>		(Meijs et al., 2015)
		750 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$		0,87 mC/cm <sup>2</sup>		(Cogan, 2008)
						(Weiland et al., 2002)
<b>Graphene</b>	35 $\mu\text{m}$	28,8 mC/cm <sup>2</sup>	50 kOhm (100 Hz)	1,1 mC/cm <sup>2</sup>		(Boehler et al., 2015)
	4000 $\mu\text{m}^2$	25 mC/cm <sup>2</sup>	8 Kohm (1 Kz)	4 mC/cm <sup>2</sup>		(Weiland et al., 2002)
				2 mC/cm <sup>2</sup>		(Cogan et al., 2004; Wilks, 2009)
<b>CNT</b>	100 $\mu\text{m}$	CSCc 87,8 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$	286 Kohm 1khz	57,13 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$		(Park et al., 2018)
	50x50 $\mu\text{m}$		500 Kohm 1 khz		31 $\mu\text{V}$	(Kuzum et al., 2014)
	300 $\mu\text{m}$	50 mC/cm <sup>2</sup>	2-8 Kohm 1khz	3,1 mC/cm <sup>2</sup>		(Lu et al., 2016)
<b>PEDOT</b>		5-25 mC/cm <sup>2</sup>				(Jan et al., 2009)
	35 $\mu\text{m}$		30 kOhm (100 Hz)	1,2 mC/cm <sup>2</sup>		(Boehler et al., 2015)
		105,17 mC/cm <sup>2</sup>	2,03 Kohm/cm <sup>2</sup>	1,36 mC/cm <sup>2</sup>		(Baek et al., 2014; Green et al., 2012)
		243,48 (Pt nanostruc)		1,52 mC/cm <sup>2</sup>		(Baek et al., 2014; Green et al., 2012)
	100x100 $\mu\text{m}$	CTCtot 40,4 mC/cm <sup>2</sup>	2,1 kOhm 100 Hz			(Castagnola et al., 2015a)
<b>Diamant</b>	615 $\mu\text{m}^2$		12 kOhm 1khz	7,74 mC/cm <sup>2</sup>	20 $\mu\text{V}$	(Chen et al., 2013)
		75,6 mC/cm <sup>2</sup>		2,3 mC/cm <sup>2</sup>		(Cui and Zhou, 2007; Wilks, 2009)
<b>Diamant 3D</b>	20 $\mu\text{m}$	220 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$	1 Mohm at 1 Khz		10,7 $\mu\text{V}$	(Piret et al., 2015a)
	20 $\mu\text{m}$	10 mC/cm <sup>2</sup>	50 Kohm at 1 Khz		3,1 $\mu\text{V}$	(Piret et al., 2015a)

## 1.9 Caractérisation des matériaux utilisés pour l'électrode

Bien que l'isolant soit un élément important de l'implant, les matériaux utilisés pour réaliser l'électrode, qui est au contact du neurone, est tout aussi important. Le matériau utilisé va définir la nature de l'interface entre l'électrode et le neurone et donc par conséquent la qualité du signal. Lors de la stimulation, l'électrode doit pouvoir stimuler le tissu nerveux sans endommager ou créer de nouvelles espèces au sein du tissu. Il existe différentes méthodes afin de caractériser les performances électriques des électrodes. Certaines méthodes permettent de caractériser les électrodes aussi bien pour l'enregistrement que pour la stimulation (mesure de bruit et d'impédance) alors que d'autres méthodes ont plus vocation à caractériser les électrodes de stimulation (voltamétrie cyclique et potentiel transitoire).

Les matériaux utilisés lors de la fabrication des implants doivent être biocompatibles, avoir de bonnes caractéristiques électriques mais aussi ne pas se détériorer dans le temps. Le choix du matériau va donc se faire en fonction de ces critères ainsi que de son coût (en temps et en argent) de fabrication.

### 1.9.1 Transfert de charge

Les électrodes sont utilisées pour enregistrer les signaux neuronaux et/ou stimuler. Lorsqu'une électrode métallique est placée dans un milieu physiologique une interface se forme entre les deux phases. Dans l'électrode métallique et le circuit électrique associé, les charges sont transportées par les électrons. Dans le milieu physiologique appelé électrolyte, les charges sont transportées par les ions. Le processus intervenant à l'interface électrode/électrolyte est un changement de porteur de charges. Les électrons du métal prennent le relais des ions de l'électrolyte.

Les montages à deux électrodes, placées dans un électrolyte, sont utilisés pour enregistrer et stimuler les neurones. Un courant passe entre les électrodes via l'électrolyte. Une des électrodes est appelée électrode de travail, l'autre étant la contre électrode. L'électrode de travail est l'électrode étudiée. La contre électrode est seulement présente pour fermer le circuit et permettre une conduction des charges. Il est possible de rajouter une troisième électrode appelée électrode de référence qui définit une référence pour les mesures de potentiel électriques.

Le changement du potentiel électrique apparaît lors du transfert de charges entre l'électrode et l'électrolyte. Cela produit un champ électrique à l'interface. Des réactions électrochimiques peuvent se produire à l'interface si le potentiel électrique est éloigné des conditions d'équilibre. En l'absence de courant, le potentiel électrique est constant (pas de gradient) dans tout l'électrolyte au-delà de la région d'interphase étroite. Un gradient de potentiel existe dans l'électrolyte uniquement lorsque le courant circule, mais ce gradient est très négligeable par rapport au gradient à l'interface.

Il existe deux grands mécanismes de transfert de charge à l'interface électrode/électrolyte (figure 17). Le premier est une réaction non Faradique où il n'y a aucun transfert d'électron entre l'électrode et l'électrolyte. Le second mécanisme est une réaction faradique où un transfert d'électrons se réalise à l'interface entre les deux phases, ce qui conduit à la réduction ou l'oxydation d'espèces chimiques dans l'électrolyte.

Lorsque l'on a seulement une redistribution non faradique des charges, l'interface électrode/électrolyte peut être modélisée par un simple condensateur appelé condensateur double couche. Ce condensateur est formé grâce à plusieurs phénomènes physiques (Helmholtz, 1853; 1924). Lorsqu'une électrode métallique est placée dans un électrolyte, la redistribution des charges se produit lorsque les ions métalliques de l'électrolyte se combinent à l'électrode. Il s'agit d'un transfert transitoire d'électrons entre les deux phases. Il en résulte un plan de charge à la surface de l'électrode métallique, opposé à un plan de charge opposée, dans l'électrolyte. De plus, les molécules polaires telles que l'eau peuvent avoir une orientation préférentielle à l'interface et l'orientation nette des molécules polaires sépare les charges.

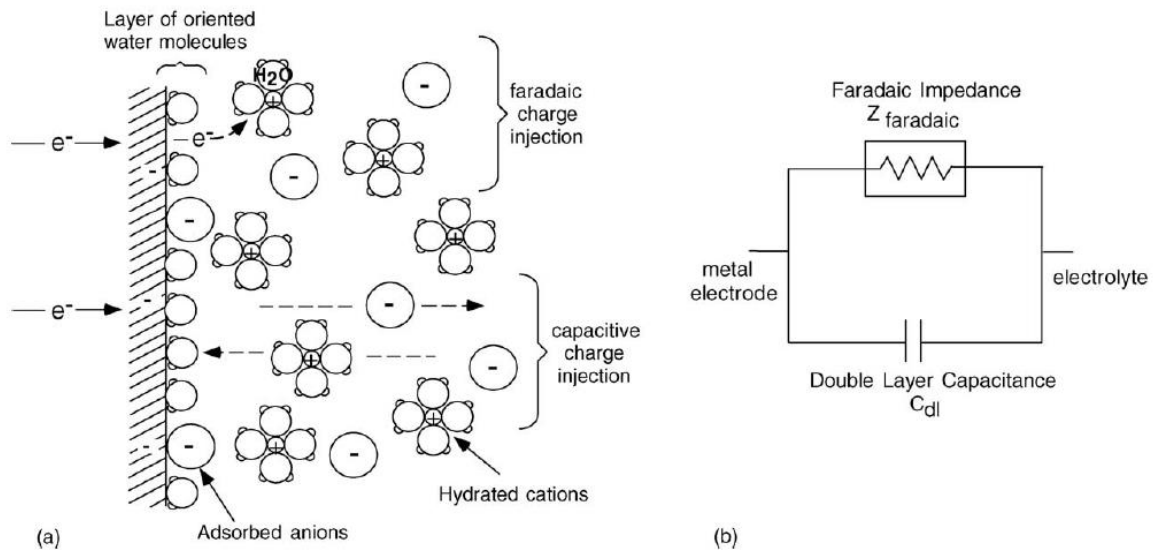


Figure 17 : Transfert de charge à l'interface électrode/électrolyte (Merrill et al., 2005)

Lors d'une stimulation, une redistribution des charges se produit dans la solution. Dans le cas d'un montage avec deux électrodes plongées dans l'eau salée, si une source de tension est appliquée à travers les deux électrodes, une électrode sera dirigée à un potentiel négatif tandis que l'autre sera dirigée à un potentiel positif. A l'interface négative, un excès de charges négatives sera présent. Cela aura pour conséquence d'attirer les charges positives en solution. On aura alors une électro neutralité dans la région inter faciale. Le phénomène inverse sera observé à l'interface de l'autre électrode. Si la quantité de charges délivrées est suffisamment faible, aucun transfert d'électrons n'a lieu à l'interface, d'où la modélisation par un simple condensateur.

Les charges peuvent aussi être injectées via un processus Faradique où un transfert d'électrons se produit entre les deux phases. La grande différence avec la réaction non Faradique réside dans le fait qu'une injection de charge Faradique peut créer des réactions irréversibles et l'apparition d'espèces non désirées et toxiques si les espèces créées s'éloignent de l'électrode. (Merrill et al., 2005)

Les paramètres étudiés afin de connaître les performances de l'électrode sont le bruit enregistré via l'électrode, l'impédance de l'électrode ainsi que la capacité à stocker les charges de l'électrode. Une faible impédance, un faible bruit et une importante capacité à stocker les charges caractérisent une électrode performante.

### 1.9.2 Spectroscopie d'impédance

La spectroscopie d'impédance consiste à mesurer l'impédance électrique et l'angle de phase obtenus en utilisant une excitation sinusoïdale de tension ou de courant de l'électrode à différentes fréquences. La mesure est réalisée sur une large gamme de fréquences (entre  $10^{-2}$  et  $10^6$  Hertz). L'impédance permet d'évaluer les capacités d'enregistrement des microélectrodes. C'est aussi une méthode utile et bénigne pour l'évaluation in vivo d'une électrode étant donné que les courants utilisés sont très faibles (nano ampère).

L'impédance d'une électrode peut être mesurée avec un système à deux électrodes (l'électrode de travail (l'électrode de l'étude) et la contre électrode qui est beaucoup plus grande)

plongées dans un même milieu. Ce montage permet de mesurer l'impédance de l'électrode étant donnée que, le milieu et l'interface entre la contre électrode et le milieu sont moins beaucoup moins impédants que l'interface entre l'électrode de travail et le milieu.

La spectroscopie d'impédance peut aussi bien être utilisée pour caractériser les électrodes (figure 18) que l'électrolyte. La contribution résistive de la conductivité tissulaire à l'impédance globale de l'électrode est estimée à partir de l'impédance mesurée à haute fréquence, où la contribution à l'impédance due au transfert de charge à l'interface électrode-tissu est négligeable.

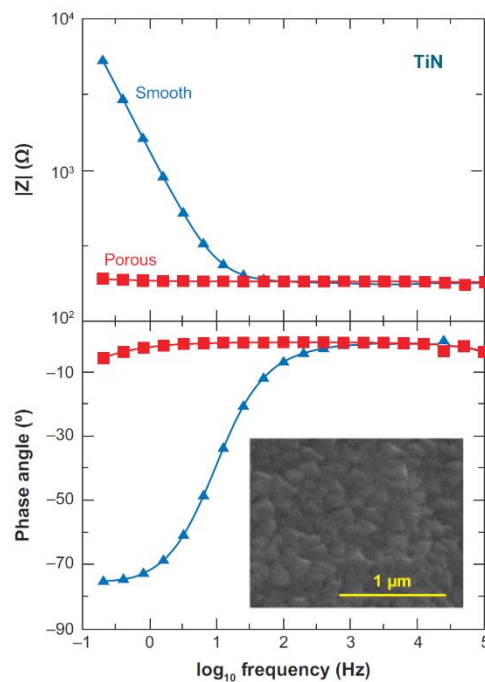


Figure 18 : Comparaison de l'impédance du TiN plat et du TiN poreux (Cogan, 2008)

### 1.9.3 Bruit

La tension extracellulaire est généralement comprise entre 10 μV et 1mV. Pour détecter ces faibles tensions, le bruit de fond doit être le plus faible possible. Le bruit de fond est engendré par les instruments environnant et par le bruit électrochimique de l'interface électrode/électrolyte. Pour les électrodes métalliques le bruit est directement proportionnel à la partie réelle de l'impédance de l'électrode (Rocha et al., 2016).

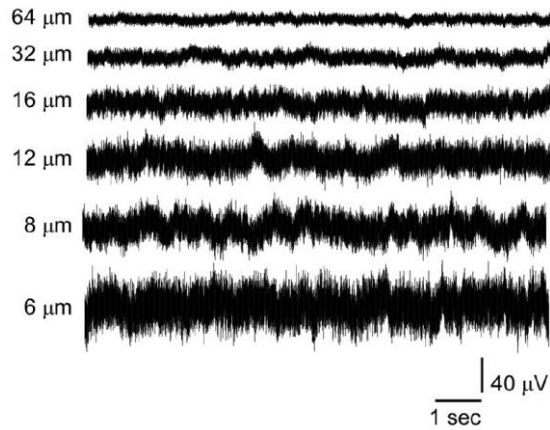


Figure 19 : Exemple d'enregistrements de bruit de fond avec des électrodes de différents diamètre (Heim et al., 2012)

Le bruit de l'électrode (figure 19) est pour la plus grosse partie un bruit thermique. Des fluctuations statistiques des charges électriques existent dans tous les conducteurs. Ces fluctuations produisent des variations de potentiel entre les extrémités du conducteur (Johnson, 1928).

En négligeant la partie capacitive de l'impédance de l'électrode, le bruit  $V_n$  de Johnson peut être estimé à (Prohaska et al., 1986) :

$$V_n = \sqrt{4kTR\Delta f}$$

Avec  $k$  la constante de Boltzmann

$T$  la température absolue

$R$  la résistance de l'électrode

$\Delta f$  la bande passante

Une autre partie du bruit provient des amplificateurs présents à la sortie des électrodes (figure 20) (Godin et al., 1991). Les sources de bruit de l'amplificateur peuvent être modélisées comme le montre la figure 19 (Netzer et al, 1981), où  $Z_e$  est l'amplitude de l'impédance effective de l'interface électrode / électrolyte,  $V_n$  est une source bruit blanc de tension de moyenne nulle associée à l'amplificateur et  $I_n$  est une source de bruit blanc de courant à moyenne nulle associée à l'amplificateur. Enfin, il y aura un bruit thermique blanc moyen nul  $V_{th}$  généré en conséquence de la composante résistive  $R_e$  de l'impédance d'électrode  $R_e$ .

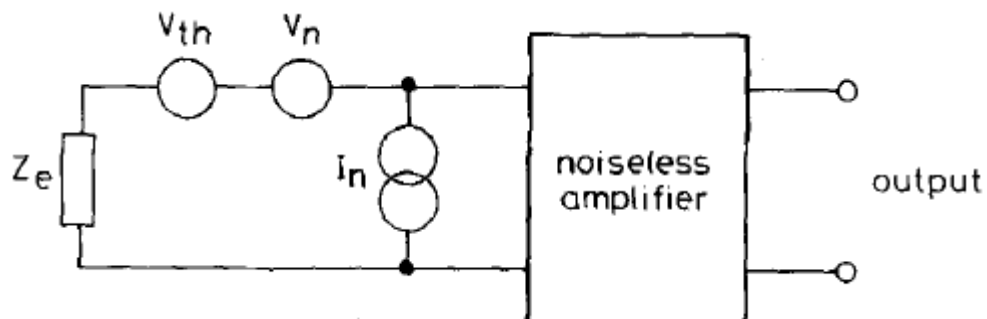
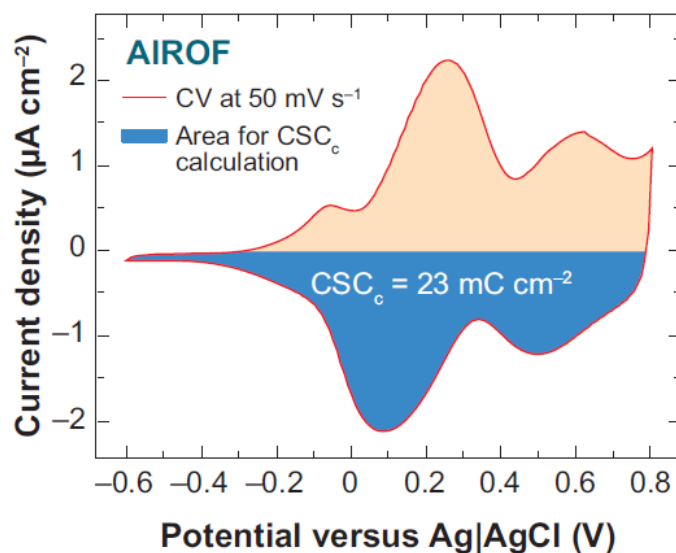


Figure 20: Modèle de la source des bruits liés aux amplificateurs (Godin et al., 1991)

### 1.9.4 Voltamétrie cyclique

La capacité à stocker les charges (CSC) d'une électrode aussi appelée la limite d'injection de charge réversible (Robblee and Rose et al. 1990) est la quantité totale de charges qui peut être stockée de façon réversible. Cela comprend les charges stockées dans le condensateur double couche et dans toutes les réactions faradiques réversibles. En pratique, il est très intéressant de pouvoir injecter un grand nombre de charges sans déclencher de réactions faradiques irréversibles qui pourraient endommager le tissu neuronale ou l'électrode. La capacité à stocker les charges réversiblement dépend du matériau, de la taille et de la forme de l'électrode ainsi que de l'électrolyte et des paramètres de stimulation. La voltamétrie cyclique permet de mesurer la CSC.

La voltamétrie cyclique (CV) est une méthode de mesure du courant par rapport à une référence (Ag/AgCl) traversant l'électrode en fonction du potentiel appliqué à l'électrode (figure 21). Le montage peut être composé de 3 électrodes plongées dans le même milieu (liquide physiologique par exemple) : l'électrode de travail (l'électrode d'étude), la contre électrode permettant de fermer le circuit ainsi que l'électrode de référence qui permet d'avoir un potentiel qui n'évoluera pas pendant la mesure. Le potentiel est imposé et évolue de façon cyclique. En général, le potentiel part de zéro puis augmente jusqu'à un maximum avant de descendre jusqu'à un minimum pour finir de nouveau à zéro. La fenêtre de l'eau est définie comme la plage entre l'hydrolyse de l'eau (l'oxydation de l'eau avec la formation d'ioxygène et de dihydrogène et la réduction de l'eau). Etant donné que l'eau est en surabondance dans une solution aqueuse et donc que l'eau sera toujours assez abondante autour de l'électrode, une fois que le potentiel de l'électrode atteint les limites de la fenêtre de l'eau, toutes les charges supplémentaires vont initier des réactions d'oxydation ou de réduction. Dans de nombreux cas, la capacité de stocker des charges réversiblement est définie comme le maximum de charges qui peuvent être injectées sans que le potentiel de l'électrode ne dépasse la fenêtre de l'eau.



La forme du CV peut changer en fonction de la vitesse du balayage, de la géométrie de l'électrode, de la rugosité de l'électrode bien que les réactions électrochimiques restent inchangées.



On caractérise les électrodes de stimulation grâce à leur capacité à stocker des charges en courant cathodique. Cette capacité est calculée à partir de l'air comprise entre la courbe inférieure et la courbe supérieure du CV. La fenêtre de potentiel est différente suivant le matériau. Pour le platine la fenêtre est -0,6 V ; 0,8 V lorsque que la contre électrode est Ag/AgCl.

### 1.9.5 Transitoire de tension

La capacité d'injection de charge  $Q_{inj}$  ou CIC est définie comme la charge maximale pouvant être injectée sans dépasser le potentiel de réduction d'eau. Contrairement au CSC qui est mesurée en balayant lentement (100 mV/s) une fenêtre de potentiel, pour évaluer  $Q_{inj}$  pour chaque électrode, une série d'impulsions rapide (0,3 ms (figure 22)) de courant d'amplitudes variables (1 à 500  $\mu$ A) est appliquée. Ainsi la CIC obtenue donne une estimation plus viable de la charge injectable maximale observable lors de la stimulation du tissu nerveux qui est réalisée avec de courtes impulsions de courant. Le transitoire de tension est une technique permettant de mesurer le CIC.

Les mesures de transitoire de tension sont fréquemment utilisées pour estimer la charge maximale pouvant être injectée dans une impulsion de stimulation contrôlée par le courant. Pour les mesures in vitro, le transitoire de tension est typiquement enregistré dans une configuration à trois électrodes en utilisant une électrode de retour à grande surface et une électrode de référence à courant non conducteur. Les transitoires de tension sont analysés pour déterminer la polarisation maximale, à la fois la plus négative ( $E_{mc}$ ) et la plus positive ( $E_{ma}$ ), à travers l'interface électrode-électrolyte. Ces potentiels extrêmes sont ensuite comparés aux potentiels maximaux établis au-delà desquels il est considéré comme dangereux de polariser l'électrode. Les limites de potentiel maximales pour des matériaux d'électrode de stimulation typiques sont généralement des potentiels d'oxydation et de réduction de l'eau.

Le potentiel effectif est calculé en soustrayant la partie résistive de la tension négative maximale. La tension ohmique est identifiée comme la chute rapide du potentiel au début de l'impulsion. Le courant auquel le potentiel maximal atteint le potentiel de réduction de l'eau de (-0,6 V pour le platine par exemple) est utilisé pour déterminer la capacité d'injection de charge (Koerbitzer et al., 2016).

Un exemple de transitoire de tension en réponse à une impulsion de courant symétrique biphasique est illustré à la figure 22. Plusieurs éléments contribuent au transitoire de tension, et ceux-ci doivent être pris en compte dans le calcul de  $E_{mc}$  et  $E_{ma}$ .

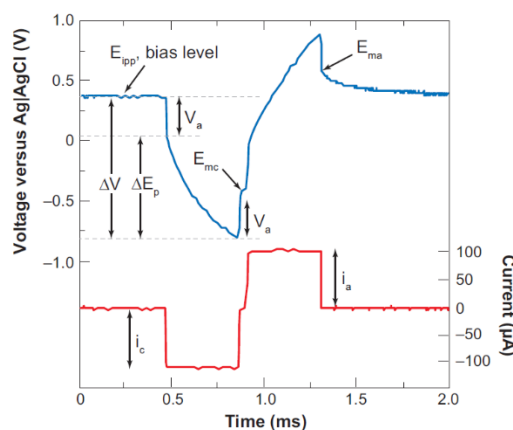


Figure 22: Un transitoire de tension d'AIROF en réponse à un créneau symétrique (Cogan, 2008)

## 1.10 Méthode de Fabrication

La méthode de fabrication utilisée pour réaliser les implants joue sur la taille des dispositifs ainsi que sur la rapidité et le coût de fabrication. Les processus de fabrication sont ainsi de plus en plus optimisés. Voici un panel des techniques utilisées pour réaliser des implants neuronaux.

### 1.10.1 Premiers Implants

Les premiers implants étaient réalisés avec de simple fil de cuivre ou de tungstène (Adrian and Bronk, 1929). Une des premières électrodes stable dans le temps est l'implant réalisé par Kennedy et al (Kennedy, 1989). L'électrode neurotrophique consiste en un fil d'or isolé au téflon fixé à l'intérieur d'un cône de verre implanté dans le cortex après l'insertion d'une longueur de nerf sciatique à l'intérieur. La longueur du cône est de 1,5 mm, le diamètre des pointes est inférieur à 200  $\mu\text{m}$  (extrémité profonde) et à 300  $\mu\text{m}$  (extrémité superficielle).

La forme de l'électrode a un grand impact sur les performances de l'implant (Palmer, 1978). Les outils utilisés pour couper et modeler les électrodes sont le laser, des lames aiguisées ou ciseaux chirurgicaux (Ge and Farina, 2013). La gravure électrochimique est utilisée pour créer des électrodes microscopiques (figure 23). Cette technique permet d'obtenir différentes formes, avec des électrodes plus ou moins aiguisées. (Grundfest et al., 1950). La gravure électrochimique peut être suivie d'un polissage électrochimique (Lalanne et al., 2011).

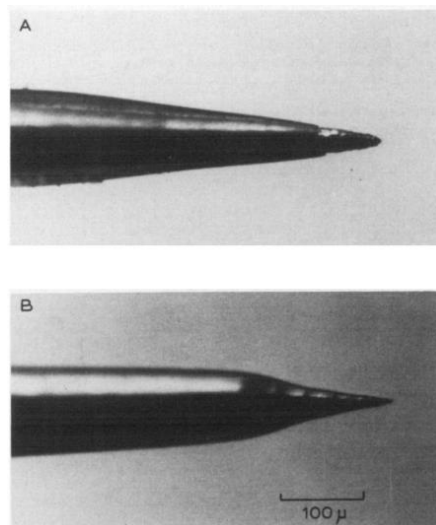


Figure 23: Différentes formes d'électrodes formées par gravure électrochimique (Wesson Ashford et al., 1985)

Les fils sont revêtus d'un isolant qui assure l'isolation électrique, la résistance mécanique et la biocompatibilité. Les matériaux diélectriques sont principalement appliqués en utilisant des méthodes électrochimiques ou par coulage. Les résines et polymères sont déposés grâce à augmentation de température, par électrodéposition, déposition en phase vapeur (PVD), trempage ou CVD (Cooley and Vanderwolf, 1978; Loeb et al., 1977; Perera and Mauretti, 2010). Le fil une fois recouvert d'isolant doit être ouvert afin que le fil conducteur soit en contact avec le neurone. Différentes techniques existent pour dénuder le fils : affuter, abraser, casser, couper (Cheung et al., 2000) et décaper (Jellema and Weijnen, 1991).

La fabrication manuelle des implants est appropriée pour réaliser des implants comportant un faible nombre de d'électrodes. Mais lorsque l'on souhaite fabriquer un implant haute densité d'autres techniques sont nécessaires.

### 1.10.2 Microfabrication d'Implants rigides

De plus en plus d'implants sont réalisés grâce à des procédés salle blanche. La photolithographie (annexe 2) ainsi que de nouvelles technologies permettent la création d'implant sur substrat silicium. Ces avancés permettent une meilleure précision, l'incorporation de circuit de traitement et des cadences de fabrication accélérées. Les implants Michigan (Kindlundh et al., 2004) et Utah array (figure 24) (Maynard et al., 1997) sont les deux implants intra corticaux en silicium les plus utilisés, fabriqués de cette manière, et permettent l'enregistrement d'un grand nombre de neurones simultanément.

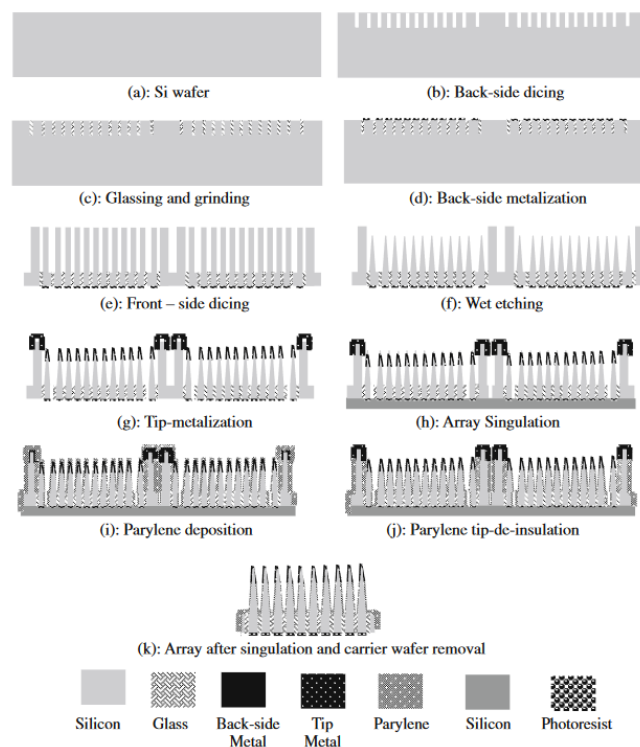


Figure 24: Etapes de fabrication de l'Utah Array (Bhandari et al., 2010)

Le transfert de formes géométrique très précises par des techniques lithographiques est essentiel pour concevoir des implants comportant des formes microscopiques et complexes. La lithographie à faisceau d'électrons permet d'obtenir des résolutions nanométriques et des espaces très fin (Scholvin et al., 2016). Une étape importante lors de la fabrication de l'Utah array est la découpe du silicium. Pour cela, des scies équipées de fines lames de diamant capables de réaliser des entailles de 50 µm sont utilisées. Les Utah array sont aussi polis afin de réduire le volume de l'implant et pour avoir un contact arrière (Bhandari et al., 2010). La gravure est une étape importante lors de la fabrication des implants. La gravure chimique ainsi que la gravure physique sont les deux plus utilisées. Leur combinaison est aussi parfois nécessaire pour obtenir certaines formes souhaitées. La gravure chimique du silicium est réalisée dans un bain d'acide. Cette technique est utilisée pour transformer les colonnes de silicium en aiguilles fines et pointues (Bhandari et al., 2010). La gravure sèche est de

plus en plus utilisée car elle est plus contrôlable. La gravure sèche permet de créer des structures en treillis (Wise et al., 2008) et de graver les deux côtés du substrat (Norlin et al., 2002).

Les couches conductrices (pour les électrodes ou les fils de connections) déposées sont de l'or, du platine ou de l'iridium (Merrill, 2014). Le dépôt de ces métaux est parfois précédé d'un dépôt d'une couche d'accroche telle que le titane ou le chrome. Les techniques de pulvérisation et d'évaporation sont les plus utilisées car elles permettent la formation d'une fine couche homogène. Le dépôt de métal est habituellement effectué par dépôt chimique en phase vapeur (CVD). Un laser évapore un lingot de métal dans le vide et le wafer est exposée à la matière volatile. Ensuite, le précurseur volatil se condense sur le wafer.

Les couches diélectriques ont pour rôle d'isoler électriquement et chimiquement l'implant. L'épaisseur du dépôt doit être contrôlée afin de ne pas avoir trop de matière isolante, ce qui augmenterait le volume de l'implant, ou trop peu de résine ce qui rendrait l'implant trop fragile. Il est relativement complexe de déposer une couche homogène d'isolant sur le Utah Array étant donné sa structure 3D complexe. Les revêtements déposés sur les électrodes comme les polymères conducteurs (PEDOT (Green et al., 2008)), les nanotubes de carbone ou des films bioactifs (Fattahi et al., 2014) sont en général déposés par électrochimie. Cette méthode est rapide et bonne marché. Certains matériaux comme le diamant sont plus complexes à développer sur l'implant. En effet, l'utilisation d'un réacteur MPCDV (Piret et al., 2015a) est nécessaire et les températures nécessaires au développement du diamant peuvent endommager les couches existantes.

### 1.10.3 Microfabrication d'implants souples

Avec la nécessité d'enregistrer des signaux stables sur le long terme, de nouveaux implants souples ont été créés. En effet, comme il l'est développé dans le paragraphe 2.6, les implants rigides déclenchent des réactions autour de l'implant (Marin, 2010).

Les implants souples sont souvent réalisés sur des wafers en silicium, ce qui est le plus adéquat pour utiliser les technologies de la salle blanche. Une des premières étapes de fabrication est le dépôt de polymère sur le wafer. Cette couche constituera la face arrière de l'implant (Castagnola et al., 2015b). Plusieurs polymères comme le polyimide (Rousche et al., 2001) et la SU-8 (Altuna et al., 2012) peuvent être spin-coatés et peuvent être d'une finesse de 1  $\mu\text{m}$ . Des films de seulement 500 nm d'épais peuvent être réalisés en SU-8 (Liu et al., 2015) ce qui confère une grande flexibilité à l'implant. Suite au dépôt de certains polymères comme la SU-8 et le polyimide, un recuit est nécessaire afin d'évaporer le solvant et de compléter la polymérisation de la résine. Le recuit est une étape importante et joue sur la qualité du film. Le parylène ne nécessite aucun recuit particulier et est déposé par CVD à température ambiante (Fortin and lu, 2004). Cela permet donc de déposer du parylène sur des structures fragiles thermiquement.

Les résines telles que la SU-8 et certains polyimides sont photosensibles. Dans le cas de résine non photosensibles comme le parylène C ou le polyimide non photosensible, une couche de résine photosensible (plus une couche de métal parfois) peut être ajoutée afin de permettre la gravure de la résine au plasma (Castagnola et al., 2015b). Des structures 3D peuvent être créées en utilisant le changement de viscosité de la SU-8 à différentes températures (Xiang et al., 2016).

Le parylène peut être thermoformé. Hara et al (figure 25) ont enroulé des films de parylène afin de réaliser des formes coniques ayant pour objectifs de promouvoir le développement des neurones. Des traitements thermiques du parylène C permettent d'augmenter sa rigidité, sa résistance à la traction ainsi que ses capacités diélectriques (Hara et al., 2015).

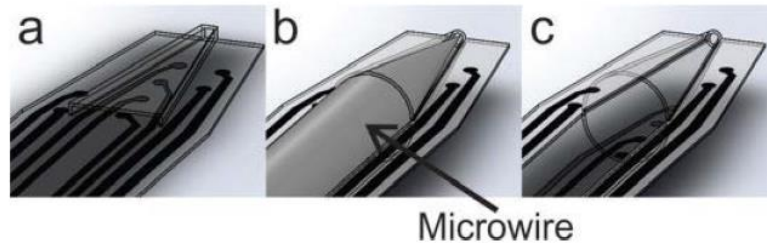


Figure 25: Illustration du processus de thermoformage du parylène (Hara et al., 2015)

La métallisation des polymères est réalisée par évaporation ou par chimie (Cheung et al., 2007). Une fois qu'une première couche de métal a été déposée, d'autres couches plus épaisses peuvent être ajoutées par électrodéposition. Pendant le dépôt, l'adhésion des métaux au polymère peut être mauvaise et créer des fragilités lorsque les implants sont soumis à certaines contraintes (McClain et al., 2011). Les solutions possibles sont d'utiliser des couches d'accroche ou de créer des microstructures sur la surface du polymère (Castagnola et al., 2015b; Mercanzini et al., 2008). Il est aussi possible de coincer une feuille de métal entre deux couches de polymères, ce qui est plus robuste mais moins flexible que la méthode par évaporation (Schuettler et al., 2005). Lorsque le conducteur utilisé est le graphène, il est possible de déposer une feuille de graphène et de lui donner la forme souhaitée (Koerbitzer et al., 2016).

La gravure humide des polymères n'est pas une méthode simple à réaliser (Ghosh, 1996; Kim and Meng, 2016). La meilleure manière de graver les polymères est l'utilisation de la gravure sèche avec un plasma d'oxygène ou de fluor (Castagnola et al., 2015b).

Le décollement de l'implant du wafer peut être réalisé grâce à une pince (Castagnola et al., 2015b). Ceci est possible avec un substrat comme le parylène. Lorsque la SU-8 est utilisée, une couche sacrificielle est nécessaire. Le nickel et l'aluminium sont utilisés comme couche sacrificielle. La couche sacrificielle doit être la première couche déposée sur la plaquette. Une fois l'implant terminé, la plaquette doit tremper environ 3 jours dans le Nickel Etchant (Liu et al., 2015). L'aluminium a l'avantage d'être éliminé avec une solution saline traversée par un courant ce qui permet de limiter le reste de résidus et donc le risque de toxicité par rapport à la méthode du Nickel Etchant (Metz et al., 2005).

L'impression directe sur le polymère est également possible (figure 26) (Kim et al., 2017). L'impression jet d'encre argent sur parylène a montré une bonne résolution (électrodes de 40  $\mu\text{m}$ ).

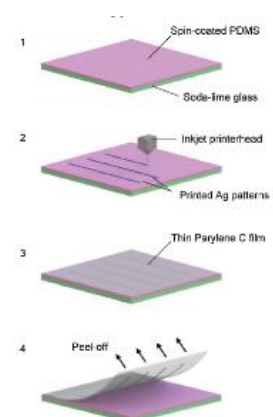


Figure 26: Impression sur substrat parylène (Kim et al. 2017)

### 1.10.4 Connectique

La connexion entre les implants et l'électronique d'acquisition est parfois assez complexe. En effet, l'objectif est de connecter les pistes provenant des électrodes, donc relativement fines, à un système capable de traiter les signaux sur une carte rigide de circuit imprimé (PCB). Il existe 4 façons de réaliser la connexion.

Le câblage par fils (wire bonding) est la méthode la plus répandue pour connecter des dispositifs en silicium. Des fils d'or peuvent être directement soudés sur les pads de contacts (McCarthy et al., 2011). Lorsque l'implant est réalisé sur substrat rigide, les pads de connexion peuvent directement être réalisés sur l'implant et ainsi permettre de souder un PCB relativement facilement sur l'implant (Jackson and Muthuswamy, 2009; Mora Lopez et al., 2017). Lorsque l'implant est souple, le risque d'endommager l'implant lors de la connexion est plus grand. La soudure de fil sur l'implant peut initier la délamination du pad en métal étant donné la mauvaise adhésion du métal sur le polymère souple (Ulrich et al., 1999). En général, le pas minimal de connexion est de 100-150  $\mu\text{m}$ . Le wire bonding (figure 27) est parfois utilisé avec d'autres techniques comme la connexion par ultrasons (Perlin and Wise, 2010).

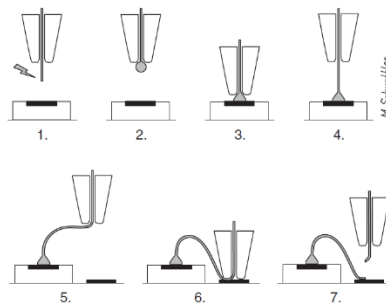


Figure 27: Wire Bonding (Schuettler and Stieglitz, 2013)

Le flip chip (figure 28) est une méthode semblable au câblage par fils mais est plus fiable, moins coûteuse et plus précise (Li et al., 2004). De plus, la température est moins importante lors du soudage ce qui entraînerait moins de détérioration du pad de contact. Il est possible de descendre à des pas de 10  $\mu\text{m}$  avec le flip chip (Ohara et al., 2009).

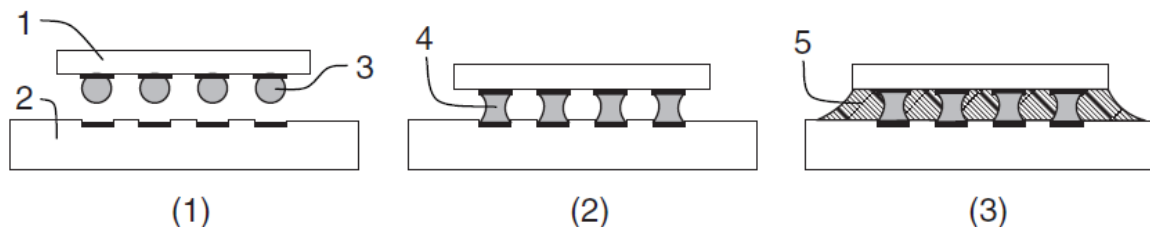


Figure 28: Flip chip Process (Schuettler et al. 2013)

Une autre méthode est l'utilisation de colle conductrice ou de film ACF qui permettent d'interconnecter des dispositifs souples (Johansson et al., 2006). Cette méthode sans soudure nécessite une bonne précision, une montée précise en température ainsi qu'une pression non négligeable. La qualité de la connectique va dépendre de la température appliquée lors de la connexion (Chang et al., 2001; Kim and Kim, 2013). Une température plus importante permettra d'obtenir une

meilleure résistance de contact et une meilleure adhésion mécanique (Uddin et al., 2004) mais peut endommager le dispositif. Cette méthode est utilisée pour connecter des dispositifs en SU-8 (Liu et al., 2015) et en Polyimide (Castagnola et al., 2015b). Le pas minimal de connexion peut descendre jusqu'à 50  $\mu\text{m}$ . Hong et al ont connecté un implant souple grâce à l'utilisation d'une impression (200  $\mu\text{m}$  de résolution) avec de l'encre conductrice (Hong et al., 2015).

Brancher directement l'implant souple dans un connecteur de type Zero Insertion Force (ZIF) est une méthode de plus en plus utilisée (Pothof et al., 2016). Il peut être nécessaire de rajouter une calle sous le pad de l'implant afin d'assurer un contact optimal entre l'implant et le ZIF (Xiang et al., 2014) (figure 30 a). Cette méthode permet de clipper et déclipper l'implant au câble de connexion. Grâce à cette solution il est possible de laisser l'implant sur l'animal et de ne connecter l'implant que lorsque des enregistrements sont réalisés (figure 29 b) (Schuhmann et al., 2017).

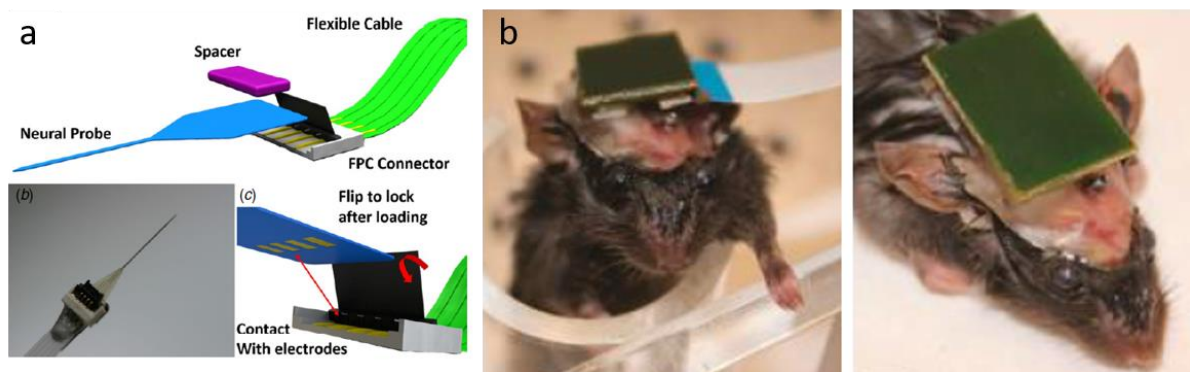


Figure 29: a : Connexion de l'implant avec un connecteur FPC (Xiang et al., 2014) b : Système ZIF permettant de brancher et débrancher l'implant (Schuhmann et al., 2017)

## 1.11 Méthode d'insertion de l'implant

Une fois l'implant réalisé, il doit être inséré dans la zone désirée afin de pouvoir réaliser les enregistrements. L'insertion de l'implant est un point majeur dans l'obtention de bons signaux lors de l'enregistrement. Une insertion trop dommageable ne permettrait pas la repousse des neurones autour de l'implant ce qui empêcherait tout enregistrement viable. De nombreux paramètres influencent la qualité de l'insertion : la vitesse d'insertion, le lieu d'insertion ainsi que les méthodes choisies et la taille de l'implant.

### 1.11.1 Insertion Manuelle/Motorisée/magnétique

Pour introduire un implant dans le tissu cérébral, de nombreux outils sont disponibles. Rennaker et al ont étudié l'effet d'une insertion manuelle ou mécanique d'un implant. Les implants ont des dizaines à des centaines d'aiguilles d'électrodes parallèles en acier inoxydable et en aluminium. Les aiguilles sont disposées sur quelques millimètres carrés et sont ensuite insérées dans le cortex cérébral de rat. Bien que l'insertion mécanique et manuelle aient montré des résultats similaires juste après l'implantation avec un signal d'enregistrement similaire, les électrodes insérées manuellement ne donnaient aucune réponse fonctionnelle 3 semaines post implantation alors que 60% des électrodes insérées mécaniquement étaient toujours fonctionnelles après 6 semaines (Rennaker et al., 2005).

L'électrode peut être implantée avec des dispositifs spéciaux conçus pour la chirurgie. Bredeson et al utilisent un dispositif où les électrodes sont disposées dans une bague de serrage qui est maintenue en place par des ressorts. La profondeur de l'implantation, la vitesse d'insertion ainsi que la force d'insertion sont contrôlées par un moteur électrique. Aucun contact entre le dispositif et le tissu n'a lieu durant l'insertion ce qui permet d'éviter d'éventuelles contaminations ou d'éventuels dommages (Bredeson and Troyk, 2014).

L'implant Utah Array qui comporte 100 électrodes est inséré grâce à un piston pneumatique. Ce dernier permet d'insérer l'implant de à 8,3 m/s ce qui assure une bonne implantation. Une vitesse moindre ne garanti pas une bonne insertion. Grâce à ce système, l'implant est implanté à 1,5 mm de profond (Rousche and Normann, 1992).

Aussi les électrodes neurales insérées magnétiquement sont une alternative. Une électrode ferromagnétique a été chargée dans un tube capillaire en verre placé dans une bobine d'insertion (figure 30). L'électrode a été éjectée à 3,7 mm dans le tissu cérébral. Cette étude in vivo a démontré une implantation sans flambement (l'implant ne se plie pas) à 27,8 m/s et des résultats prometteurs avec une bonne stabilité de l'impédance (pendant 31 jours) pour l'insertion d'une électrode platine-fer de 25 micromètres de diamètre dans le cerveau de rat (Dryg et al., 2015; Jaroch et al., 2009).

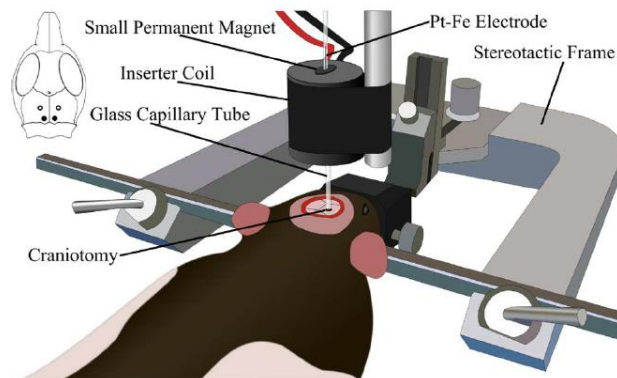


Figure 30: Insertion magnétique d'électrodes corticales (Dryg et al., 2015)

Outre l'utilisation de champs magnétiques, il est possible d'utiliser un fluide afin d'insérer un implant dans le cortex. Vital et al ont conçu des microcanaux permettant à des électrodes souples de 12  $\mu\text{m}$  de diamètre de pénétrer dans le cerveau de rat (figure 31). L'électrode est disposée dans un canal. Un fluide va ensuite propulser l'électrode dans le cerveau. Le système micro fluidique propulseur ne pénètre pas dans le cerveau (Vitale et al., 2018).



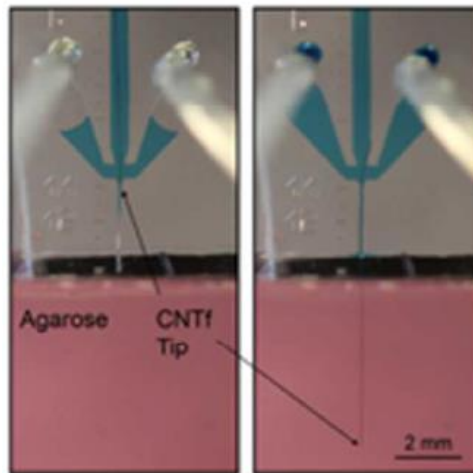


Figure 31: Implantation d'une électrode de CNT grâce à un système microfluidique (Vitale et al., 2018)

Une méthode similaire est l'utilisation d'une seringue pour propulser les électrodes (figure 32). Contrairement à la solution précédente, l'ensemble aiguille-seringue va pénétrer dans le tissu cérébral pour délivrer l'implant. Un filet souple 3D a été injecté dans le ventricule latéral et l'hippocampe à travers une seringue reliée à une aiguille de plusieurs centaines de micromètres de diamètre. Une fois dans le cerveau, le filet se détend et prend place dans la région du ventricule latéral. Le volume d'occupation du filet est un cylindre de 1,3 mm de diamètre. Le filet, ayant des dimensions 30 fois plus grandes que le diamètre intérieur de l'aiguille, peut être injecté via l'aiguille sans perdre ses performances électriques. Le réseau injecté dans le cerveau des souris a montré une faible réactivité immunitaire 5 semaines après la chirurgie, des interactions avec les neurones et permet d'obtenir de bon signaux de spike stables (même forme de spike sur une électrode) pendant 8 mois chez la souris (Liu et al., 2015).

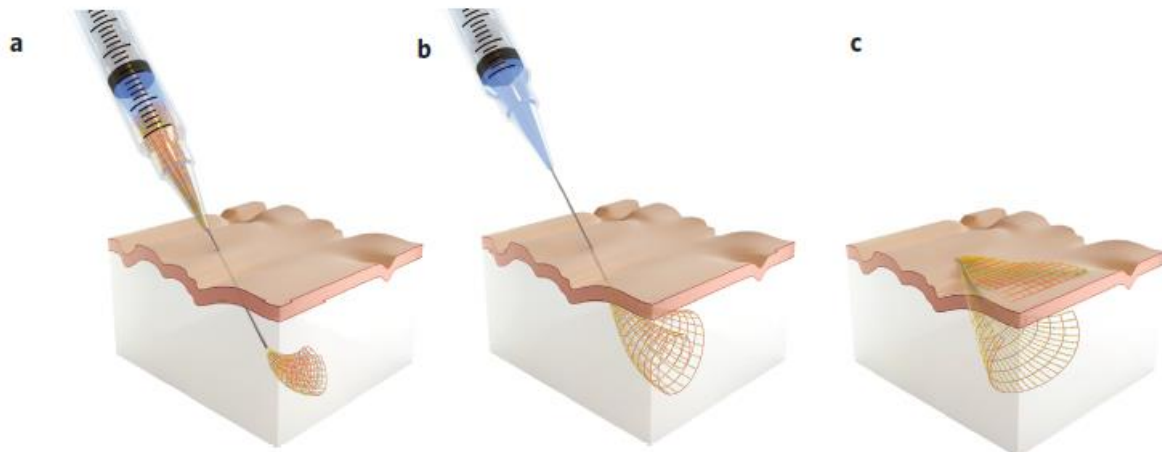


Figure 32: Injection d'un filet d'électrode dans le cerveau grâce à un ensemble seringue aiguille (Liu et al., 2015)

### 1.11.2 Support d'implantation

Différentes méthodes existent pour aider les électrodes flexibles à pénétrer le tissu cérébral : l'utilisation d'un support véhicule est une technique répandue (Hara et al., 2013). Les supports peuvent avoir différentes formes et être fabriqués avec différents matériaux. Par exemple, le support peut être en silicium avec un canal de drainage. Le polyéthylène glycol bio-soluble (PEG) permet de solidariser

temporairement l'implant pendant l'insertion. La dissolution du PEG est observable en quelques secondes. De légers mouvements de la sonde lors du retrait de la navette sont observables (Felix et al., 2013). Le PEG qui est utilisé pour injecter des médicaments et des cellules initie des réponses immunitaires très variables suivant la vitesse de dégradation mais montre de bons résultats sur le long terme (Bjugstad et al., 2010).

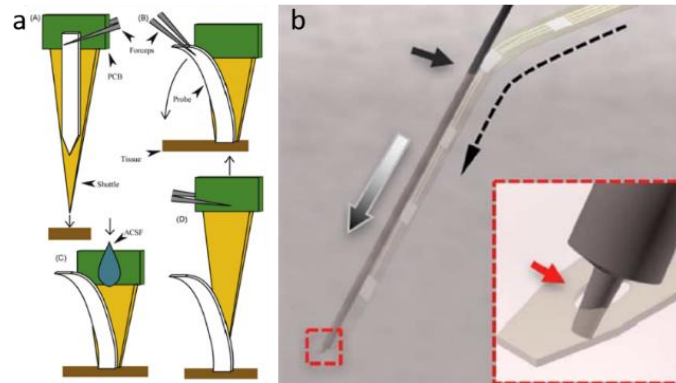


Figure 33 : a : Illustration de l'insertion d'un implant avec un véhicule (Kozai and Kipke, 2009) b : Insertion grâce à une fibre de carbone de 7 µm (Luan et al. 2017)

Un point important avec le système de véhicule est le lien entre la navette et la sonde (figure 33 a). Un revêtement monocouche auto-assemblé (SAM) hautement hydrophile, électronégatif peut être déposé sur la navette. Lorsque l'assemblage est dans le cerveau, la navette à revêtement hydrophile attire les molécules d'eau à l'interface sonde-navette, provoquant la dissociation de la sonde polymère et de la navette. La monocouche électronégative auto-assemblée (SAM) a joué un rôle de colle soluble lorsque la navette a été insérée et retirée. Le déplacement relatif de l'électrode de polyimide introduite avec les navettes revêtues de SAM était de 1% de la profondeur totale d'insertion comparativement à 26,5% pour les navettes de silicium non revêtues (Kozai and Kipke, 2009).

L'étude de 70 rats implantés au niveau du noyau sous thalamique avec des électrodes flexibles en polyimide (~ 20µm d'épaisseur, 350µm de largeur et 1,5cm de longueur) avec une méthode d'implantation simple par une insertion stéréotaxique soutenue par une tige de tungstène (140-175 micromètres de diamètre) favorisée par un coussin d'hydrogel (2% agarose dans PBS) déposé sur le crâne exposé a montré de bons résultats après 4 semaines et plus (6 mois). (Richter et al., 2013).

De plus, un véhicule de délivrance soluble non cytotoxique à base de carboxyméthylcellulose (CMC) a été conçu pour transporter une électrode souple à 80 mm/s et 1 mm de profondeur. Avec cette navette (100 x 125 micromètres), aucune microglie activée à 12 semaines a été observée (Kozai et al., 2014a).

Une navette en fibre de carbone peut mesurer jusqu'à 7 µm de diamètre ce qui limite les dommages lors de l'insertion de l'implant (figure 33 b) (Luan et al., 2017).

La recherche de nouveaux matériaux mécaniquement dynamiques est un moyen d'assurer une bonne biocompatibilité et une insertion en douceur. Contrairement au polymère pur, le polymère nanocomposite (poly (acétate de vinyle) et les nanocristaux de celluloses dérivées des tuniciers) peuvent être suffisamment rigides pour pénétrer le tissu cérébral et correspondre à la rigidité du tissu cérébral (Harris et al., 2011). En effet, le module d'Young de cette matière sèche est rapidement divisé par plus de 100 (3420 MPa à 20 MPa) dans un environnement humide (Hess et al., 2011). Une électrode neurale de silicium-parylène hybride avec une partie flexible locale offre une autre option pour éviter

le flambage (repliement de l'implant) pendant l'insertion et pour s'adapter à un tissu cérébral mou (Kim et al., 2014).

### 1.11.3 Encapsulation d'implant

L'encapsulation de l'implant avec un matériau polymère biodégradable est une technique utilisée. Elle est similaire à l'utilisation de navette car l'ajout d'un matériau rigide permet l'implantation. Cependant cette technique a l'avantage de créer une blessure pas plus grande que la taille de l'implant seul. En effet, la navette est en général plus volumineuse que l'implant lui-même ce qui engendre des dommages plus importants au niveau de la zone d'insertion. D'un autre côté, l'encapsulation est souvent réalisée en ajoutant une fine couche de polymère sur l'implant ce qui n'augmente que très légèrement la taille de la blessure occasionnée lors de l'insertion.

En revanche, l'encapsulation puis l'insertion de l'implant sont souvent suivies de la dégradation du polymère. Cette étape peut entraîner un relargage de produits de dégradation qui peuvent être toxiques pour le milieu environnant.

Cette technique est utilisée pour différents types d'implants. Les électrodes cochléaires flexibles peuvent ainsi pénétrer dans le tissu cérébral grâce à l'ajout d'un revêtement rigide en silicone coulé autour de l'électrode. De plus, une petite bille de silicone à l'extrémité de l'électrode peut aider à réduire les dommages lors de l'insertion (figure 34 a) (Bhatti et al., 2015).

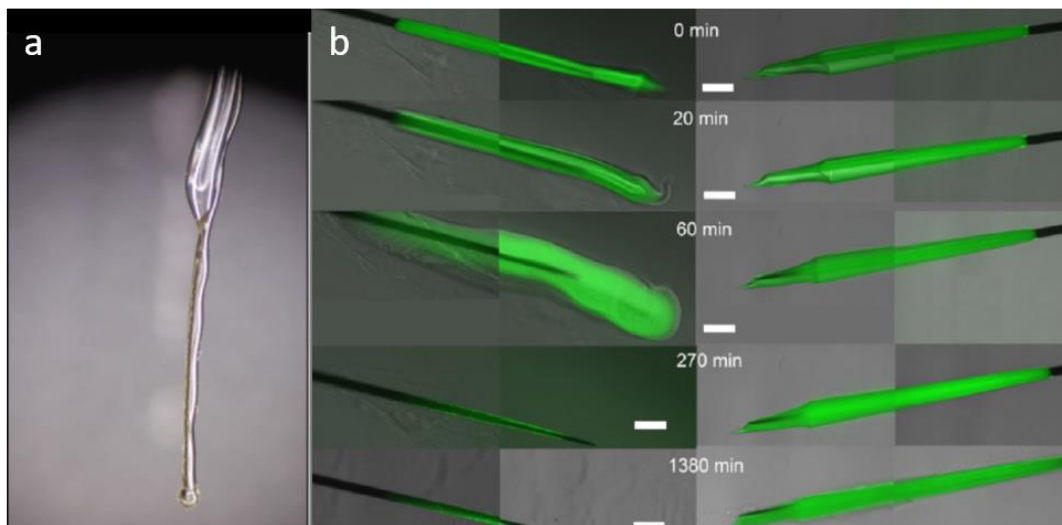


Figure 34 : a : Revêtement en silicone sur un implant (Bhatti et al., 2015) b : Erosion du polymère rigide autour de l'implant (Lewitus et al., 2011)

Les implants neuronaux peuvent être revêtus d'un terpolymère rigide dérivé de tyrosine. Ce polymère a été testé sur des implants de platine-iridium (4 mm de longueur et 70 micromètres de diamètre) ainsi que sur des bandes de polyimide non fonctionnelle. Le polymère qui améliore la rigidité des implants devient mou (après 30 minutes) et disparaît (après 240 minutes) après l'insertion. In vitro, les électrodes revêtues ont retrouvé leurs valeurs d'impédance initiale de 0,5 kOhm dans les 20 minutes suivant le mouillage (figure 34 b) (Lewitus et al., 2011; Lo et al., 2015).

La soie est une autre option pour intégrer et raidir les électrodes souples. La soie, qui est biocompatible et biodégradable, s'assouplit au contact de l'eau. Des fils d'acier inoxydables recouverts de soie ou non

ont été insérés dans une culture cellulaire in vitro. Les résultats ont démontré que la soie atténuait l'activité de la microglie. Les électrodes en polyimide (longueur de 4 mm, largeur de 300 micromètres) revêtues de soie ont ainsi pu être insérées dans un gel d'agarose mimant le comportement mécanique du cerveau contrairement aux implants non couverts (Tien et al., 2013). Selon le processus utilisé pour fabriquer la soie (Jin et al., 2005), la dégradation de la soie pourrait durer de 30 minutes à 25 heures (Wu et al., 2011). Une couche de 65  $\mu\text{m}$  de soie permet l'insertion à travers la pie mère d'implant de parylène entre 50 et 100  $\mu\text{m}$  de large. (Wu et al., 2013). Pour le dépôt de la soie sur les implants, il est possible d'utiliser un moule. Des implants de 24  $\mu\text{m}$  d'épais recouverts de soie d'une épaisseur de 110  $\mu\text{m}$  et d'une largeur de 350  $\mu\text{m}$  ont été implantés dans le cerveau de rat (Lecomte et al., 2015).

Il est aussi possible d'incorporer des facteurs de croissance au sein des polymères encapsulant les implants neuronaux. Kato et al ont utilisé un polymère hybride biodégradable (polyéthylène glycol et microsphères polymériques biodégradables contenant des facteurs de croissance nerveuse) qui donne une rigidité suffisante à l'implant pour pénétrer le tissu et libérer ces facteurs de croissance pendant la dégradation du polymère (Kato et al., 2006). Les facteurs de croissance permettent une bonne reconstruction tissulaire autour de l'implant.

Lorsque qu'un revêtement biodégradable est utilisé pour faciliter l'insertion d'une sonde, le mouvement du fluide généré par la dissolution du revêtement peut déplacer la sonde de son emplacement d'origine. Des revêtements en carboxyméthyl cellulose sodique (Na-CMC), qui montrent une grande biocompatibilité après 12 semaines, se dégradent rapidement (80 secondes pour une aiguille de 100 micromètres de large) après insertion dans un gel d'agar à 0,6% mais n'induisent pas de vitesse axiale de la sonde (Rakuman et al., 2013).

Une autre approche est l'encapsulation avec des polymères non dégradables. Des aiguilles de gélatine ainsi que des aiguilles métalliques de même taille ont été insérées dans le cortex de rat à 2 mm de profondeur. Après analyse de la réponse immunitaire sur 6 semaines, l'inflammation est moindre avec les aiguilles en gélatine. Des électrodes flexibles ont été incorporées dans de la gélatine. Les électrodes enveloppées avec un plus grand volume de gélatine provoquent moins d'inflammation après une semaine. (Lind et al., 2010).

#### 1.11.4 Choix du lieu d'implantation

Kozai et al ont analysé par microscopie bi-photons les dommages sur les vaisseaux sanguins pendant l'insertion d'électrodes. Ils ont démontré que le choix de la zone d'introduction de l'implant est un paramètre très important. En effet, le choix de zones dépourvues de vaisseaux majeurs ( $> 5 \mu\text{m}$ ) en profondeur permettra de réduire de plus de 80% les dommages neurovasculaires. Pour ce faire, ils montrent que l'introduction d'une sonde à plus de 50  $\mu\text{m}$  d'un vaisseau de surface majeur visible permettra d'éviter de couper 68% des neurovasculatures sous-jacentes majeures (Kozai et al., 2010).

Aussi, Casanova et al. ont montré que le stress de friction le long d'aiguilles en aciers inoxydables (diamètre extérieur de 0,235 mm) lors de l'insertion changeait en fonction de la zone d'implantation (du moins important au plus important : le cortex, la capsule externe et le CPU) (Casanova et al., 2014).

### 1.11.5 Effet de la vitesse

Un axe de recherche consiste à développer des outils pour évaluer la qualité d'insertion des électrodes. Johnson et al ont conçu un réseau de substrat de silicium avec des microélectrodes d'oxyde d'iridium (une pointe de 1 cm de long et 200  $\mu\text{m}$  de large) a été conçu pour enregistrer le pH extracellulaire et en conséquence donner un indicateur de qualité d'implantation (Johnson et al., 2006). Ils ont montré qu'une insertion lente (50  $\mu\text{m}/\text{s}$ ) dans le cortex (avec dura) induit plus de dommages en suivant l'homéostasie cérébrale avec un enregistrement cérébral extracellulaire.

L'imagerie en temps réel de la déformation des tissus, qui permet de voir les déchirures causées par l'insertion des électrodes, a été utilisée dans une étude avec des rats. Les résultats ont démontré que les dommages vasculaires survenaient à plusieurs micromètres du site (tranche de cerveau de rat de 500  $\mu\text{m}$ ) de pénétration et dépendaient de nombreux facteurs. Une insertion plus rapide (2000  $\mu\text{m}/\text{s}$ ) montre moins de dommages (Bjornsson et al., 2006). La contrainte de frottement dans le putamen pendant l'insertion de l'aiguille (avec incision de la dura) en acier inoxydable diminue avec la vitesse de l'insertion (Casanova et al., 2014). Une sonde fictive revêtue de silicone et de parylène (longueur de 10 mm, largeur de 200  $\mu\text{m}$  et épaisseur de 100  $\mu\text{m}$ ) a été implantée dans le cerveau du rat (après avoir incisé la dura) à 10  $\mu\text{m}/\text{sec}$  (n = 6) ou 100  $\mu\text{m}/\text{sec}$  (n = 6) jusqu'à une profondeur de 9 mm. Les résultats ont montré que la vitesse d'insertion de l'électrode n'a pas d'influence sur la réponse tissulaire pour ces deux valeurs de vitesse, même à long terme (6 semaines) (Welkenhuysen et al., 2011).

La collagénase agit pour décomposer les fibrilles en déroulant la triple hélice de collagène et en hydrolysant les liaisons peptidiques. Cette action permet de diminuer la rigidité de la matrice extracellulaire de la pia. À faible vitesse (10 $\mu\text{m}$  / sec), l'insertion de collagénase au niveau du cortex des rats diminue la force d'insertion maximale d'environ 30%. De plus, la qualité du signal enregistré après traitement à la collagénase ou sans était similaire lors des enregistrements neuronaux chroniques (1 mois) (Paralikal et al., 2006).

La littérature permet donc de conclure qu'une insertion rapide génère moins de contraintes sur le tissu nerveux bien que la force d'insertion soit plus importante. Il est aussi préférable d'utiliser des implants fins et pointus. Bjornsson et al émettent l'idée qu'une insertion très lente permettrait au tissu de se relaxer mais ne permettrait que difficilement le passage de la pie mère (Bjornsson et al., 2006). Il est donc possible d'enregistrer lors de l'insertion à vitesse lente ce qui permet de pouvoir arrêter les électrodes lorsque l'on observe des signaux neuronaux stables.

## 1.12 Biocompatibilité

La biocompatibilité est un point important pour évaluer la performance d'un implant intra-cortical. En effet, les mécanismes cellulaires après l'insertion d'un implant déterminent la qualité de l'enregistrement. Premièrement, les électrodes doivent être proches des neurones, c'est pourquoi il est important de vérifier la croissance des neurones autour de l'implant. D'autres part, les astrocytes et les macrophages entraînent une réaction inflammatoire. Ils peuvent encapsuler ou endommager l'implant. Différentes méthodes sont étudiées pour éviter les réactions inflammatoires comme l'utilisation de certains revêtements spéciaux ou l'injection de doses anti-inflammatoires. L'utilisation

de matériaux biocompatibles ainsi que la géométrie à l'échelle micro et nano de l'implant sont des paramètres importants pour une implantation long terme.

### 1.12.1 Cellules gliales

Les cellules gliales, constituées de la microglie, des astrocytes et de cellules de la lignée des oligodendrocytes sont avec les neurones les principaux composants du cerveau (figure 35). Dans le cerveau, les cellules jouant un rôle primordial lors de l'implantation d'implants corticaux sont les neurones, les astrocytes ainsi que la microglie. L'intégration de l'implant dans le tissu est un facteur de succès important. La visualisation de cicatrice astrocytaire autour de l'implant est donc très importante. Les astrocytes ne doivent pas former une barrière entre les neurones et les électrodes. Lors de l'implantation, l'inflammation et donc la présence de macrophages activés autour des électrodes peut notablement influencer la stabilité de l'implant dans le long terme.

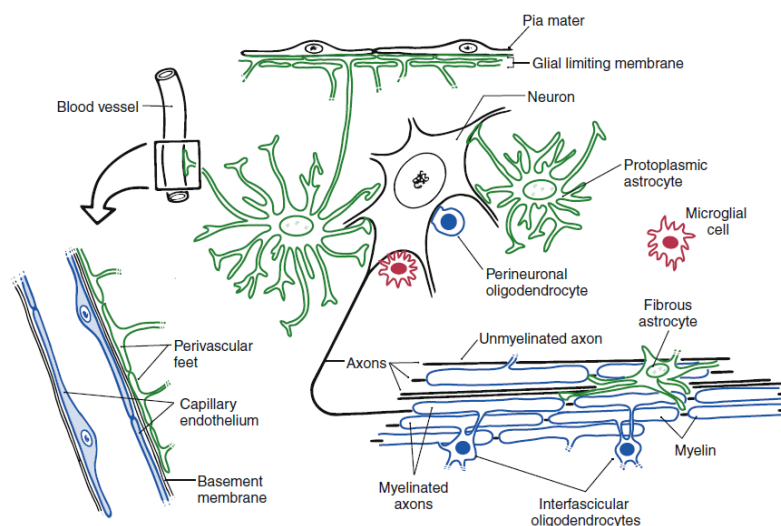


Figure 35: Relation entre les différentes cellules du système nerveux central (Mihailoff and Haines, 2018)

- Oligodendrocytes

Les Oligodendrocytes sont présentes aussi bien dans la matière grise que la matière blanche. La fonction première de ces cellules est la myélinisation. Cela consiste en la formation d'une gaine de myéline autour des fibres nerveuses pendant le développement du système nerveux. La gaine de myéline est une membrane autour de l'axone qui isole électriquement et qui permet d'accélérer la vitesse de conduction des actions potentielles.

- Astrocytes

Les astrocytes sont présents dans tout le système nerveux central (SNC). Ce sont des cellules très ramifiées et sont en contact avec la surface les différentes parties du neurone, les dendrites, le corps cellulaire, les axones ainsi que les synapses. Les astrocytes ont pour fonctions en autres d'apporter de l'énergie ainsi que de soutenir les neurones. Les astrocytes modulent aussi son environnement. Ils régulent la composition ionique ainsi que le pH du fluide extracellulaire. Les astrocytes jouent aussi un rôle au niveau des synapses et des neurotransmetteurs.

Les astrocytes peuvent être distingués immuno-histochimiquement grâce à un marqueur la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP). Le contenu GFAP des astrocytes augmente dans les conditions pathologiques. Lorsque des cellules sont détruites suite à une lésion du système nerveux central, l'espace créé par la décomposition des débris est rempli par la prolifération ou l'hypertrophie (ou les deux) d'astrocytes, entraînant la formation d'une cicatrice astrocytaire.

Des études actuelles suspectent que les astrocytes sécrètent des facteurs de croissance vitaux pour certains neurones. Dans certaines maladies, ils peuvent sécréter des cytokines ainsi que de médiateurs du système immunitaire. Ces astrocytes ainsi que les macrophages contribuent à la régulation d'éventuelles inflammations. Les astrocytes initient la formation des synapses.

Dans de nombreux tissus, le sang et les solutés peuvent facilement passer dans les ouvertures situées entre les cellules endothéliales. Dans le SNC, les vaisseaux sont enveloppés par les astrocytes ce qui constitue une barrière sans espace. De ce fait, le sang ainsi que les solutés ne peuvent passer qu'à travers les cellules endothéliales. Cette frontière d'échanges est la barrière hémato-encéphalique. Les petites molécules peuvent diffuser à travers les cellules endothéliales contrairement à certaines substances qui ont un accès plus sélectif.

- Microglie

Les cellules microgliales sont les effecteurs du système immunitaire (chargées de nettoyer les sites infectés) dans le SNC et sont donc aussi les cellules les plus impliquées lors d'une inflammation. Les cellules microgliales représentent environ 1 % des cellules du SNC. Lorsque qu'aucune agression n'est à déplorer, les cellules restent inactives.

Comme les astrocytes, les cellules microgliales s'étendent sans chevaucher d'autres cellules de la microglie. Bien que la microglie reste en place dans un SNC en bonne santé, ses extensions se déplacent pour surveiller le tissu environnant. Lors d'un traumatisme ou d'une lésion sévère du tissu nerveux, les cellules microgliales deviennent mobiles. Elles sont capables de migrer jusqu'au site endommagé et de proliférer. Une fois sur le site de la blessure elles phagocytent les débris cellulaires.

L'activation métabolique de la microglie est aussi importante car la forme de la microglie change en fonction de la pathologie. La microglie peut être activée par les cytokines et d'autres médiateurs. Les cellules microgliales peuvent sécréter de nombreux produits comme des médiateurs neurotoxiques et neuroprotecteurs pour l'inflammation et la réparation tissulaire.

### 1.12.2 Immuno-marquage

Visualiser les neurones ainsi que la microglie est primordiale pour comprendre les comportements cellulaires dans certaines maladies neuronales ou dans certaines lésions du tissu nerveux. Pour cela, l'immunomarquage est un des outils les plus utilisés en biologie (Lyck et al., 2008). Le principe de l'immunomarquage est l'utilisation d'anticorps pour identifier la position d'antigènes dans les cellules et les tissus (figure 36).

Lors de l'immunomarquage, deux anticorps sont souvent choisis. Le premier appelé anticorps primaire se fixe à l'antigène ciblé. Après une période d'incubation, un second anticorps marqué avec une molécule fluorescente est alors utilisé. Celui-ci va se fixer à l'anticorps primaire. Des enzymes sont fixées sur l'anticorps secondaire. Ces enzymes sont capables de catalyser des réactions qui donnent un produit coloré facilement détectable par microscopie optique. Il est aussi possible de marquer directement le premier anticorps avec un révélateur optique (la fluorescéine le plus souvent) (Genton, 2006).

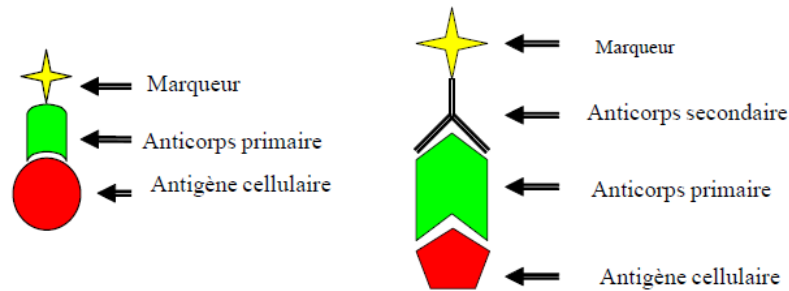


Figure 36: Principe de l'immunomarquage à un anticorps ou deux anticorps (Genton, 2006)

Pour la visualisation de ces 3 types de cellules, différents marquages sont utilisés. La protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) est la protéine la plus importante des filaments intermédiaires (Eng, 1985) dans certaines cellules gliales comme les astrocytes. Iba 1 est une protéine spécifiquement exprimée chez les macrophages. Elle est régulée à la hausse lors de l'activation de la microglie. (Sasaki et al., 2001). Pour visualiser les neurones, deux grands types de protéines sont ciblés. Les NeuN ainsi que les neurofilaments (Lind et al., 2005; Luider et al., 1992).

### 1.12.3 Inflammation court et long terme

La réponse neuronale peut être divisée en deux phases. La réponse court terme implique des contraintes mécaniques sur le tissu menant à la mécanotransduction (Harrison et al. 2016, Lund et al. 2010, Moshayedi et al., 2014 ; Walter, 2004) et à la rupture de la barrière hémato-encéphalique menant à la libération de protéines étrangères dans le SNC comme l'albumine, la fibrine et la globuline. Cela déclenche une cascade de signaux biochimiques qui active différents types de cellules comme les monocytes, les neutrophiles ainsi que les macrophages résidents.

La réponse sur le long terme comprend la formation de cicatrice gliale, la gliose, l'occlusion vasculaire, la nécrose cellulaire, la mort cellulaire retardée, la reconstruction tissulaire complète ou non et tout phénomène conduisant au dysfonctionnement et la neuro-dégénération (Kozai et al., 2015). Cette réponse long terme va grandement dépendre de la réponse court terme et va aussi dépendre de l'implant lui-même. Bien que la cicatrice gliale contribue à la réparation du SNC (Anderson et al., 2016; Rolls et al., 2009), il est préférable de la limiter afin d'améliorer l'efficacité d'enregistrement et de stimulation de l'implant.

### 1.12.4 Méthode d'amélioration de la biocompatibilité

Bien que les implants deviennent de plus en plus petits, le problème de biocompatibilité se pose toujours. Il existe des dispositifs de toutes tailles. Les macro-électrodes pour la stimulation profonde



sont largement utilisées pour traiter des maladies comme Parkinson (Lozano et al., 2002). Bien que ces macro-électrodes soient sujettes à certaines réactions du tissu nerveux, leurs stabilités long terme restent satisfaisantes pour leurs tailles et pour des stimulations répétées (Butson et al., 2006; Henderson et al., 2002; Moss, 2004).

En revanche, les microélectrodes utilisées pour enregistrer le cortex font face à des dysfonctionnements sur le long terme. Le rapport signal sur bruit diminue, l'impédance des électrodes augmente et le nombre de neurones enregistrés diminue (figure 37) (Barrese et al., 2013).

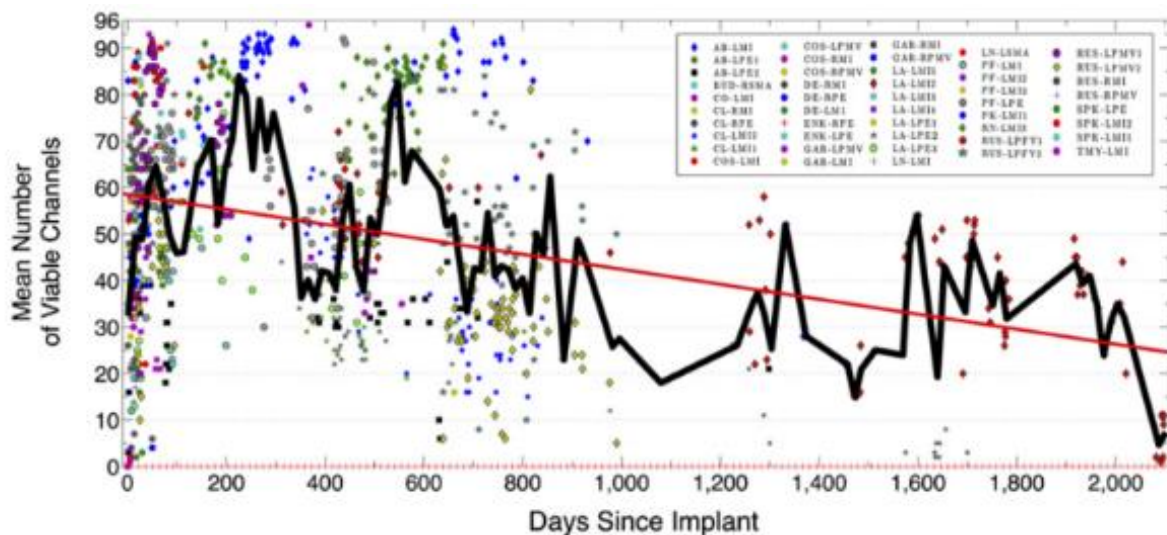


Figure 37: Nombre d'électrode enregistré après implantation d'une Utah Array en fonction du temps (Barrese et al., 2013)

Les implants utilisés pour réaliser des études BMI sont principalement fabriqués dans des matériaux rigides (Collinger et al., 2013; Hochberg et al., 2006). Or le principal défaut de ces implants est leur mauvaise stabilité d'enregistrement à long terme. La rigidité (autour de 200 GPa) de ces implants contraste avec la souplesse du tissu cérébral (autour de 1-10 KPa). Ce décalage entraîne des contraintes mécaniques à l'interface tissu/implant (Prodanov and Delbeke, 2016; Sridharan et al., 2013) et entretient l'inflammation chronique par mécano-transduction (Moshayedi et al., 2014). De plus, le cerveau bouge et bat au rythme du cœur. Chez le rat, le cerveau peut bouger de 10 à 30  $\mu\text{m}$  pendant chaque respiration et entre 10 à 60  $\mu\text{m}$  à chaque mouvement de tête (Gilletti and Muthuswamy, 2006). Ces mouvements répétés qui empêchent le tissu de s'attacher durablement sur une électrode donnée ne permettent pas des enregistrements stables et précis nécessaires pour des applications BMI (Cham et al., 2005).

En effet, le tissu autour l'électrode influence de façon significatif l'impédance électrochimique de l'électrode (Hébert et al., 2016; Palanker et al., 2004; Shah et al., 2007). Une cicatrice gliale peut constituer une barrière ionique entre l'électrode et les neurones (Frampton et al., 2007, 2010; Williams, 2008). La distance entre l'électrode et les neurones cibles établie par la cicatrice gliale impose l'augmentation du courant ou de la tension de stimulation pour initier un potentiel d'action. (Grill, 2008; Palanker et al., 2004; Shah et al., 2007). Lors de l'enregistrement d'un neurone, une fois une barrière établie entre le neurone et l'électrode, les chances d'obtenir un enregistrement fiable reste assez faible.

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, cette dégradation des performances est le fruit d'une réponse immunitaire du tissu nerveux. Deux grands facteurs ont un impact important sur la

réponse immunitaire du tissu nerveux : les aspects mécaniques et la taille de l'implant d'une part et le comportement de l'environnement biochimique autour de l'implant d'autre part.

Pour essayer de répondre à ces problèmes de stabilité en limitant la réponse immunitaire, des architectures ouvertes peuvent être utilisées (figure 38 a) (Seymour et al., 2011). Avec une structure ouverte de 25  $\mu\text{m}$  de large, l'encapsulation et la perte neuronale sont réduites d'un tiers (Seymour and Kipke, 2007). Une corrélation existe entre l'espace entre chaque électrode et la gliose générée (McConnell et al., 2007). Contrairement à une structure pleine, l'insertion d'une architecture en treillis dans le tissu cérébrale est accompagnée par moins d'activation des macrophages, moins de fuite dans la barrière hémato-encéphalique et moins de perte de cellules neuronales (Skousen et al., 2011). Des implants perforés en parylène C ont démontré une diminution de l'inhibition des signaux chimiques entre cellules (Hara et al., 2013). De plus, les implants intra-corticaux rigides provoquent une réponse inflammatoire moindre lorsqu'ils sont petits, cylindriques, pointus et étroit (Bjornsson et al., 2006; Hara et al., 2013; Karumbaiah et al., 2013; Thelin et al., 2011).

Outre ces solutions sur l'aspect géométrique apportées aux implants rigides, des matériaux flexibles sont utilisés afin de diminuer l'inflammation.

Les implants flexibles dont les propriétés mécaniques sont proches des propriétés mécaniques du tissu nerveux se font de plus en plus nombreux (Lacour et al., 2010). En effet, la flexibilité diminue les risques de rejet et d'encapsulation de l'implant (Winslow et al., 2010). Les matériaux flexibles utilisés sont le parylène C (Castagnola et al., 2015b), le polyimide (Rousche et al., 2001), la SU-8 (Altuna et al., 2012) ou un combiné (Márton et al., 2014a).

La forme des implants souples a aussi un rôle important dans la stabilité au long terme. Des implants de formes sinusoïdales (figure 38 b) ont démontré des enregistrements stables (678 jours en in Vivo) chez le rat (Sohal et al., 2014). La forme sinusoïdale joue le rôle de ressort ce qui permet à l'implant d'absorber le mouvement et afin que les électrodes restent en places. D'autres implants en forme de filet ont aussi démontré une certaine longévité (8 mois) et surtout la même forme de spike sur les mêmes électrodes, ce qui signifie une grande stabilité de l'attachement des neurones aux mêmes électrodes. La structure en filet permet aux neurones de se développer au sein même de l'implant et ainsi assurer de bon enregistrement sur le long terme.

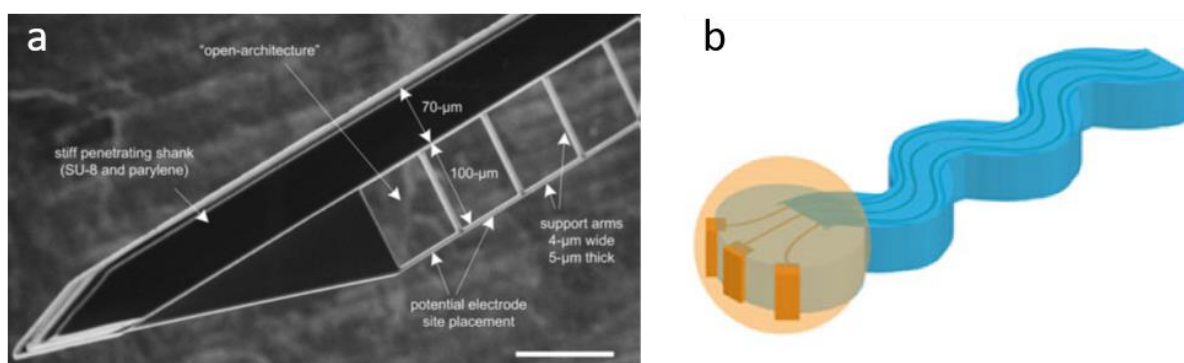


Figure 38 : a : Implant à l'architecture ouverte afin de favoriser la repousse neuronale (Seymour and Kipke, 2007) b : Implant de forme sinusoïdale (Sohal et al., 2014)

La géométrie à l'échelle micrométrique a un effet important sur le développement des axones. (Fozdar et al., 2010). Mais les axones se développent mieux sur des structures sub-micrométriques que micrométriques et de préférences sur des motifs en forme de trous. Une stratégie afin d'améliorer la biocompatibilité est donc de nano-structurer aussi bien l'électrode métallique que l'isolant qui est en contact direct avec le tissu afin d'assurer sa bonne intégration dans le tissu et une bonne biocompatibilité (Fabbro et al., 2012; Kozai et al., 2014b; Moxon et al., 2004; Piret and Prinz, 2016).

L'adhésion biomoléculaire peut grandement être modifiée sur une surface avec une grande courbure comparée à une surface lisse (Bhushan and Jung, 2011; Cedervall et al., 2007; Hammarin et al., 2014; Roach et al., 2006). Un grand nombre de biomolécules neurotrophiques pourrait assurer une bonne adhésion des cellules sur des structures microscopiques et nanoscopiques (Piret et al., 2013). Ces topographies de surface pourraient aussi initier une diminution de la réaction des astrocytes (Ereifej et al., 2013a, 2013b; Gottipati et al., 2012; Piret et al., 2015b). Une membrane cellulaire est composée de lipides et de protéines qui définissent sa courbure qui peuvent changer suivant la fonction de la cellule à un instant donné (Domart et al., 2012; Parthasarathy et al., 2006). La fonction de la cellule peut dépendre de son environnement proche qui peut être détecté via l'interaction cellule-cellule (Burdick et al., 2001). Une cellule proche de l'implant pourrait interpréter très spécifiquement une certaine courbure de ce dernier. Le comportement cellulaire des cellules gliales diffèrent en fonction de la topographie. D'autres études suggèrent que les nanotubes de carbone ou des mousses de graphène pourraient aussi modifier la réponse cellulaire (Bussy et al., 2015; Song et al., 2014). Les dispositifs recouverts avec des nanostructures comme les nanotubes de carbone (Gabriel et al., 2009; Lovat et al., 2005; Pancrazio, 2008; Vitale et al., 2015) ont montré de bonnes performances d'enregistrement.

D'autres méthodes ont été utilisées afin d'améliorer la biocompatibilité des implants. Un nombre important de revêtements ont été étudiés afin de limiter la réponse immunitaire (Grill et al., 2009; Leung et al., 2008) comme des protéines et peptides d'adhésion, des facteurs de croissance (Azemi et al., 2011; He et al., 2007; Jain et al., 2006), des matrices extracellulaires (Shen et al., 2015), du sucre, des produits anti-inflammatoire (He et al., 2007), des molécules, des polymères ou des bio-gels bioactifs (Asplund et al., 2009; Richardson et al., 2009) et hydrogels (Crompton et al., 2007; Frampton et al., 2007; Kim et al., 2010).

## Chapitre 2 :

# Conception, fabrication et caractérisation d'un implant haute densité

Dans cette partie, le design, la fabrication de l'implant ainsi que les outils de caractérisation sont présentés. Ce travail a été principalement encadré par Gaëlle Ofranc-Piret dans le cadre du projet ERC Brain MicroSnooper. Dans cette thèse, il est question de concevoir un implant constitué de fils très fins et de haute densité en électrodes. Ces deux contraintes vont jouer un grand rôle dans le design de l'implant. L'implant doit aussi être flexible et biocompatible ce qui va influencer les choix faits lors de la fabrication de l'implant. Des microscopes classiques ou à faisceau d'électron permettent l'observation des implants. Afin de pouvoir caractériser les implants, des systèmes commerciaux MCS sont utilisés afin de mesurer le bruit ainsi que les signaux enregistrés par les électrodes. Les impédances des électrodes sont mesurées via deux systèmes de mesures. Les voltamétries cycliques sont réalisées sous pointe et permettent d'analyser le comportement des électrodes lorsqu'elles sont balayées par un potentiel.

## 2 Conception, fabrication et caractérisation d'un implant haute densité

### 2.1 Géométrie des implants

Comme il a été décrit dans la partie précédente, la géométrie de l'implant joue un rôle très important. En effet, la géométrie va influencer la résistance mécanique de l'implant, la zone ou les zones cérébrales pouvant être implantées, le nombre de neurones enregistrés simultanément, le nombre de neurones enregistrés par une électrode, le type de connectique utilisé, le mouvement des électrodes, la méthode d'insertion, la chirurgie, la cicatrice gliale et la repopulation des neurones autour de l'implant et donc la qualité d'enregistrement et la biocompatibilité de l'implant.

La géométrie doit donc être pensée avec minutie.

Deux familles d'implants ont été réalisées. Une première famille composée d'implant comportant 256 électrodes a été réalisée. La deuxième famille d'implant est composée d'implant avec 71 électrodes. Dans la première famille un implant rat et un implant mini porc ont été réalisés. La famille à 71 électrodes comprend 2 implants rats avec des géométries différentes.

#### 2.1.1 Implant 256

La première version de l'implant qui comprend 256 électrodes a été réalisée en deux tailles. Un implant pour les rats et un implant pour les miniporcs. Les deux grandes différences entre les deux types d'implants sont la présence de volet de blindage sur l'implant mini-porc ainsi que la longueur des tentacules. Les volets de blindage doivent être repliés afin d'assurer le blindage d'une partie des pistes entre les électrodes et le pad de connexion. Le blindage doit permettre de diminuer l'influence des bruits environnants sur les signaux.

La forme globale de l'implant comprend un connecteur, deux électrodes de masses et de références de 1,5 mm de diamètre, ainsi que 16 tentacules où l'on trouve les électrodes aux extrémités. La géométrie tentaculaire de l'implant permet ainsi l'enregistrement simultané de plusieurs régions du cerveau car il sera possible de choisir la distance entre le connecteur et le lieu d'implantation de chaque tentacule qui sera dans la marge de la longueur de ces tentacules (2,2 et 3,4 cm pour l'implant mini-porc ; 1,2 cm pour l'implant rat). Chaque tentacule compte 16 électrodes. Il est ainsi possible d'enregistrer sur 16 sites différents.

Au sein même des tentacules, des subdivisions apparaissent avec une séparation en 3 parties puis une séparation en 16 parties pour les 16 électrodes (figure 42). Il y a donc au bout de chaque tentacule, 16 fils très fins (de 11 à 50  $\mu\text{m}$ ) sur une longueur de 2 mm et comportant chacun à leur extrémité une électrode. Chaque fil d'électrode est donc libre de ses mouvements sans influencer le mouvement des électrodes voisines. De plus, la finesse des tentacules assure une plus grande flexibilité qui devrait permettre à l'électrode attachée à un neurone donné de rester en place. De plus, le choix d'avoir des fils d'électrodes libres vient du fait qu'une fois implanté, l'implant ne représente pas un gros volume mais un ensemble de petit fils ce qui est préférable pour ne pas être détecté par le système immunitaire. En effet, Seymour et al ont démontré que la diminution de l'implant améliore la

biocompatibilité de l'implant (Seymour and Kipke, 2007). La taille des fils et des électrodes est du même ordre de grandeur que les corps cellulaires.

Afin d'analyser l'influence de la géométrie des tentacules sur la qualité des enregistrements, chaque tentacule a été conçu différemment. Deux principaux facteurs ont été modifiés d'un tentacule à l'autre : la largeur des fils et la forme qui peut être droite ou ondulée. L'ondulation en « zigzag » devrait permettre au fil de jouer le rôle de ressort et d'absorber et de mieux suivre les mouvements du cerveau et donc d'éviter le déplacement de l'électrode par rapport aux tissus et neurones à proximité une fois implantée. Les fils les plus larges, de 50  $\mu\text{m}$  et les formes droites constitueront les contrôles sur lesquels on attend plus de frottement ou de réaction sur le tissu autour. Les fils ont une largeur de 11  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$  ou 50  $\mu\text{m}$  avec des pistes conductrices larges de respectivement 5, 10 et 10 ou 20  $\mu\text{m}$ .

Le connecteur est un carré de 1,2 cm de côté de 16 pads par 16 pads. Les plots de contact mesurent 250  $\mu\text{m}$  de diamètre et la distance entre chaque plot de contact est de 600  $\mu\text{m}$  centre à centre. Chaque plot de contact est relié à une électrode de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. L'implant est constitué de 4 couches superposées (figure 39).

De la couche supérieure à la couche inférieure :

- Couche 1 : La couche supérieure correspond aux plots de contact (figure 44).
- Couche 2 : La couche sous les plots est une couche de SU-8 contenant les ouvertures au niveau des électrodes ainsi que les ouvertures sous les plots de contact. Cette couche sert aussi d'isolant électrique pour les pistes.
- Couche 3 : La couche sous les ouvertures est composée de toutes les pistes faisant la liaison entre les électrodes et les plots de contact. La liaison entre les plots de contact et les pistes se fait via les ouvertures de la couche 2. Les ouvertures sont en forme oblong afin d'éviter l'interconnexion des plots de contact avec les pistes sous-jacentes (figure 41 b). Les pistes de 17  $\mu\text{m}$  de large et de 1,7 cm de long en moyenne se répartissent ensuite sur les différents tentacules. Une fois arrivée dans le tentacule, la largeur de la piste dépend du tentacule.
- Couche 4 : La couche inférieure qui a la forme globale de l'implant sert uniquement pour isoler électriquement l'arrière de l'implant

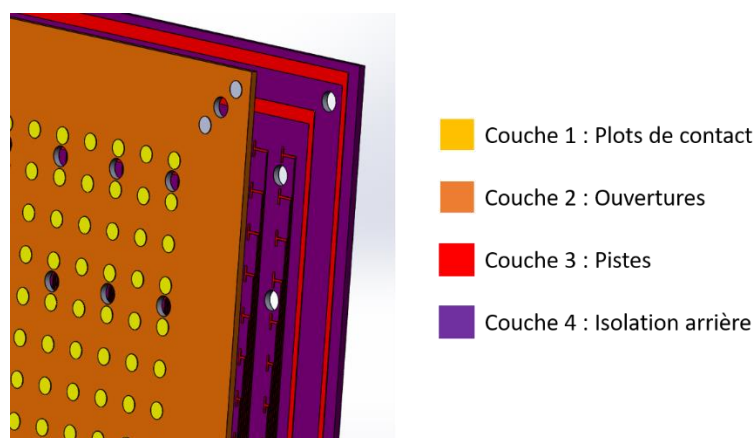


Figure 39 : Couches de l'implant 256

### 2.1.1.1 Implant mini porc 256

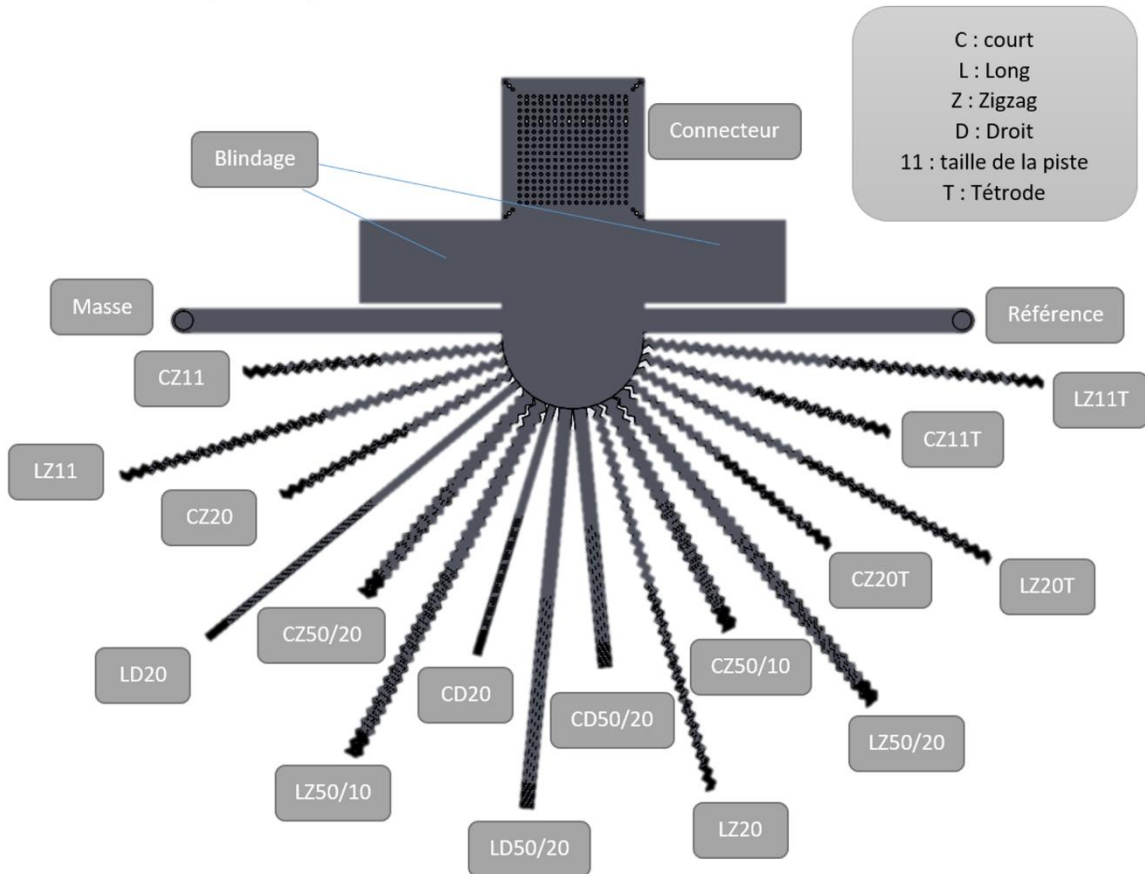


Figure 40: Forme globale de l'implant 256 pour mini porc

Cet implant possède 16 tentacules différents. 8 petits tentacules mesurent 2,2 cm et 8 grands tentacules mesurent 3,4 cm. Tous les tentacules sont différents (voir figure 40). La longueur des différents fils a été calculée en fonction des dimensions du cerveau du mini porc.

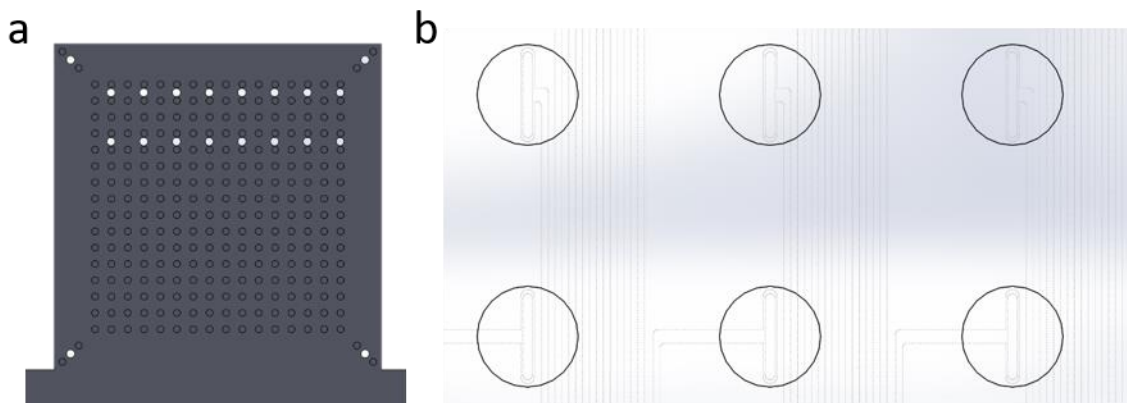


Figure 41 : a : Pad de connexion b : Pad de connexion (zoom)

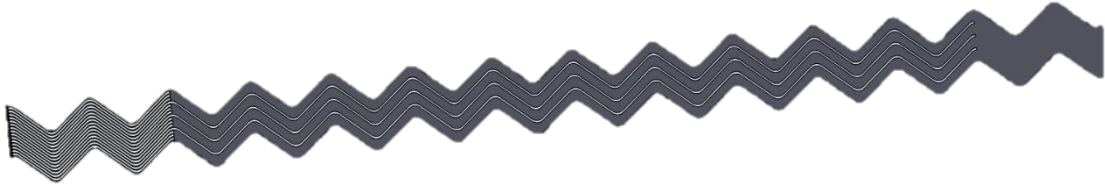


Figure 42: Division du tentacule en 4 puis 16 parties

Sur la figure 41a on peut voir 20 orifices autour et dans le connecteur (ronds blancs). Ils servent lors de la connexion avec le câble qui est relié à la station d'enregistrement. La connexion se fait grâce à une pièce de serrage comportant des plots d'alignements. Ces plots permettent le centrage de l'implant avec le câble de connexion.

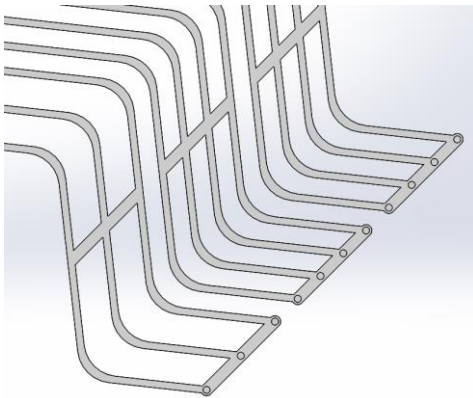


Figure 43 : Zoom sur le tentacule comportant les tétrodes

La figure 43 montre un tentacule dans lequel les fils sont reliés entre eux par paquet de 3 ou 4. L'objectif est de créer des polytrodes. Les polytrodes sont un ensemble d'électrodes suffisamment proches entre elles afin que plusieurs puissent enregistrer le même neurone. Suivant la distribution spatiale des électrodes, l'amplitude du signal, du potentiel d'action enregistré sera différente pour chacune des 4 électrodes. Cela permet ainsi d'aider à identifier quel neurone est enregistré. L'identification des neurones enregistrés est importante pour améliorer les performances des BCI.



### 2.1.1.2 Implant rat 256

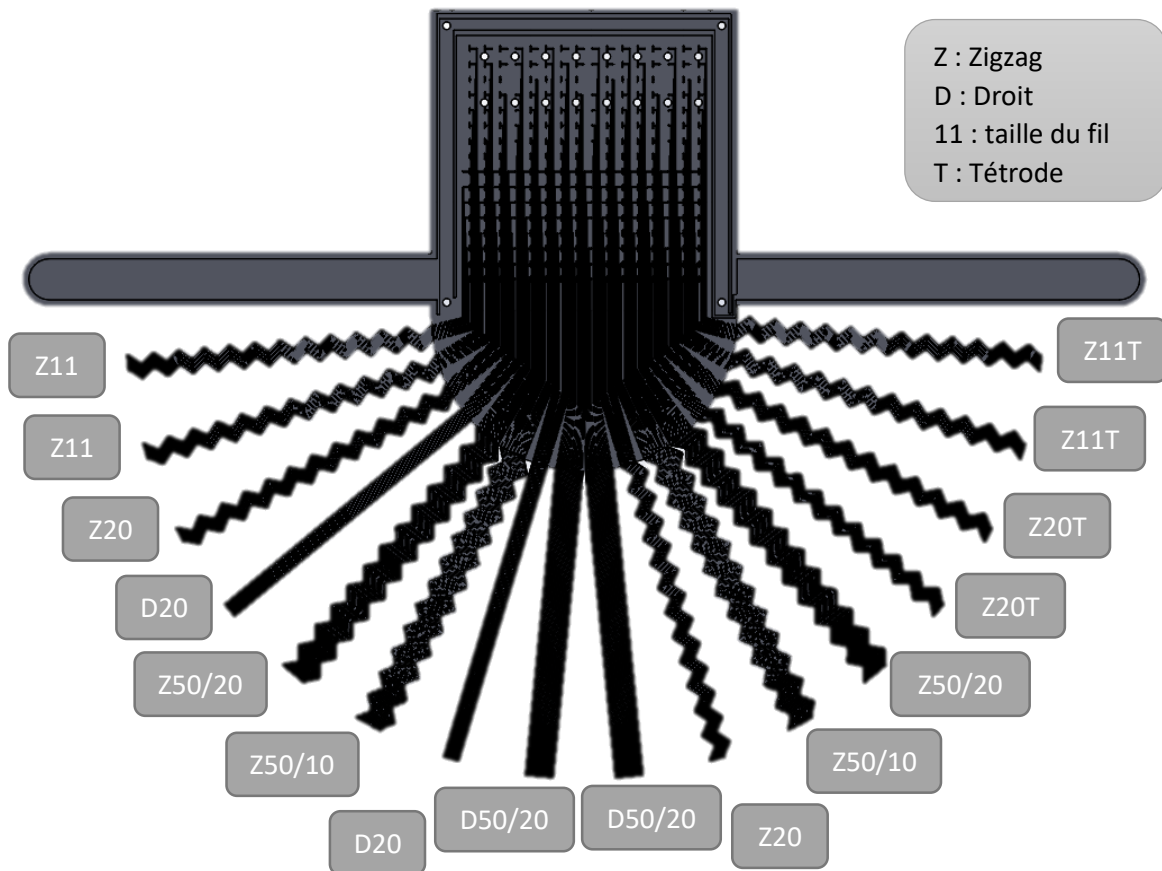


Figure 44 : Implant rat vue de la couche avec les pistes

L'implant rat avec 256 électrodes (figure 44) est très semblable à l'implant mini-porc. Tous les tentacules mesurent 1,2 cm. Etant donné les dimensions du cerveau de rat, de longs tentacules ne sont pas nécessaires. Afin de réduire la taille, les caches permettant de blinder les fils ont été retirés.

### 2.1.1.3 Limitation de la connectique 256

Le câble utilisé pour connecter l'implant à la station d'enregistrement est appelé un flex. Un flex est un câble plat avec à une extrémité un pad de connexion compatible avec le connecteur de l'implant et à l'autre extrémité des pads de contact pouvant être insérés dans des connecteurs commerciaux (connecteur ZIF). Le Flex a été dessiné au sein de notre laboratoire dans le cadre de la thèse de Jean-Marie Mayaudon, réalisé au sein du laboratoire de l'ESIEE et il comporte 256 pistes correspondant aux 256 électrodes. La partie du flex qui doit être en contact avec le pad de connexion de l'implant 256. De plus, afin d'assurer un bon contact, les deux parties doivent être pressées l'une contre l'autre. Une pièce réalisée en impression 3D est en développement afin de répondre à ces exigences.

### 2.1.2 Connecteur 71 première génération

La connexion de l'implant 256 avec un flex permettant de relier l'implant à la station d'enregistrement étant en cours de développement, le choix de concevoir un nouvel implant avec une connectique plus standard a été fait. Cette version est réalisée pour le modèle rat. Il ne contient plus que 71 contacts et

64 électrodes d'enregistrement. Le nombre de contacts est donné par le type de connectique utilisé. En effet, un ZIF commercial de 71 voies (FH43B Annexe 1) a été choisi pour réaliser la connexion. Le nouveau design comprend le connecteur, un « cou » reliant le connecteur aux tentacules, 4 électrodes de références, 2 électrodes de masses ainsi que 6 tentacules (figure 45). Le « cou » permet de donner de la flexibilité lorsque l'on va insérer le connecteur de l'implant dans le ZIF, le ZIF étant lui-même sur une carte électronique où un ensemble wifi est branché. Deux formes carrées positionnées au niveau du « cou » permettent la manipulation de l'implant afin d'éviter d'endommager les parties de l'implant avec les pistes métalliques. L'implant est donc saisi par l'intermédiaire de pinces au niveau de ces formes carrées. Quatre trous circulaires situés sous les carrés, à la base des tentacules, permettent de visser l'implant sur le crâne du rat afin d'éviter de bouger les électrodes lors de l'insertion du connecteur de l'implant dans le ZIF.

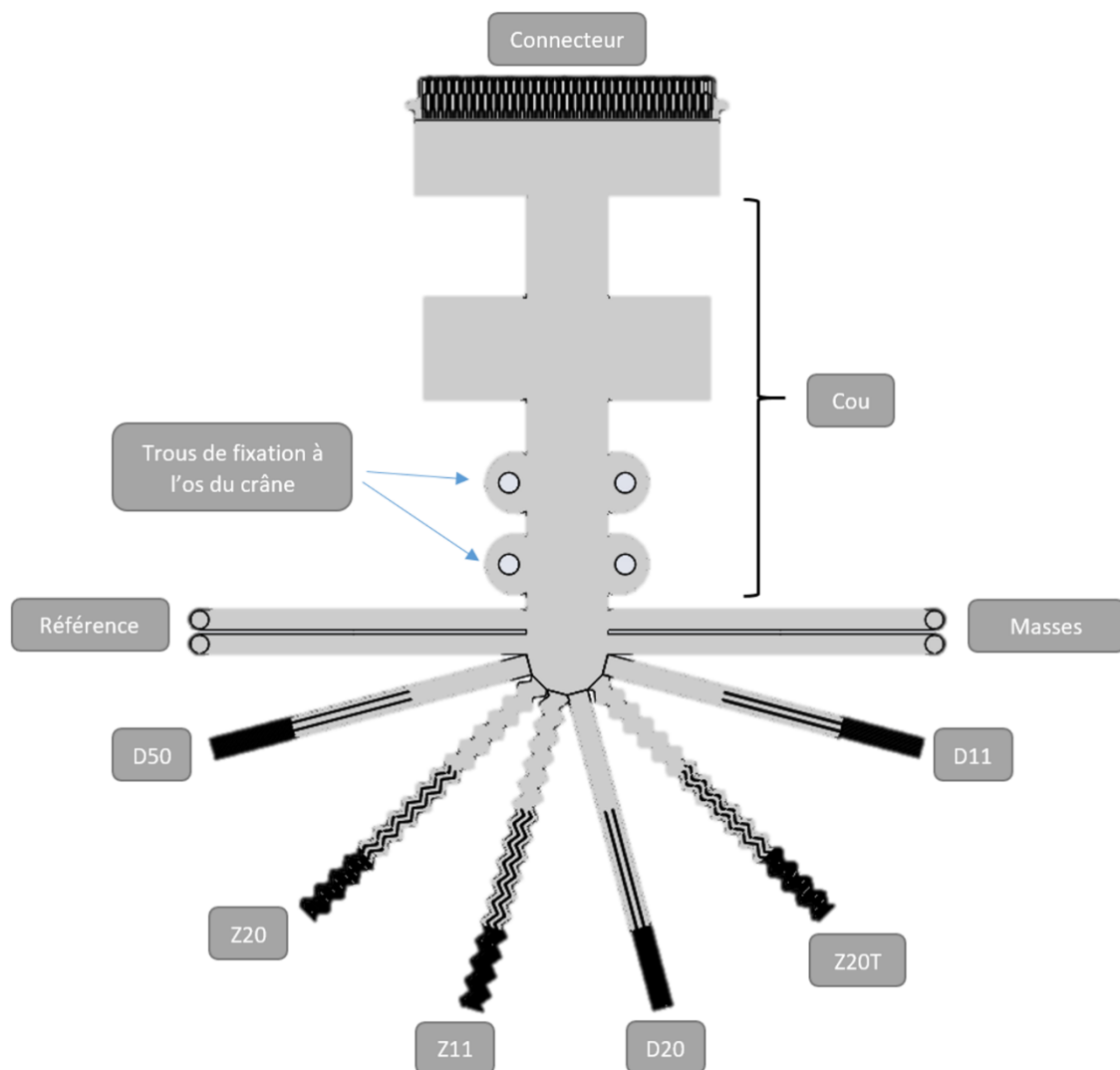


Figure 45 : Implant ZIF 71 voies première version

### 2.1.3 Connecteur 71 deuxième génération

Suite à la fabrication de la première génération de l'implant 71 contacts, des faiblesses ont été mises en lumière. Le long « cou » réalisé en SU-8 est d'une fragilité importante ce qui est très problématique

pour la manipulation de l'implant. De plus, sa faible résistance au déchirement pourrait engendrer la casse de l'implant lors de mouvements brusques du rat. Une nouvelle stratégie a donc été mise en place pour la version numéro 2, le « cou » a été enlevé afin de minimiser la distance entre les tentacules et le connecteur (figure 46). Nous verrons au paragraphe 2.3.5 qu'on utilise alors une rallonge en polyimide appelée « cicor » qui sera insérée dans le ZIF au lieu du connecteur de l'implant. Nous avons réalisé différentes tailles de rallonges « cicor » ce qui nous permet d'ajuster au mieux la longueur entre les tentacules et le ZIF. De plus, le cicor est beaucoup plus résistant que l'implant lui-même.

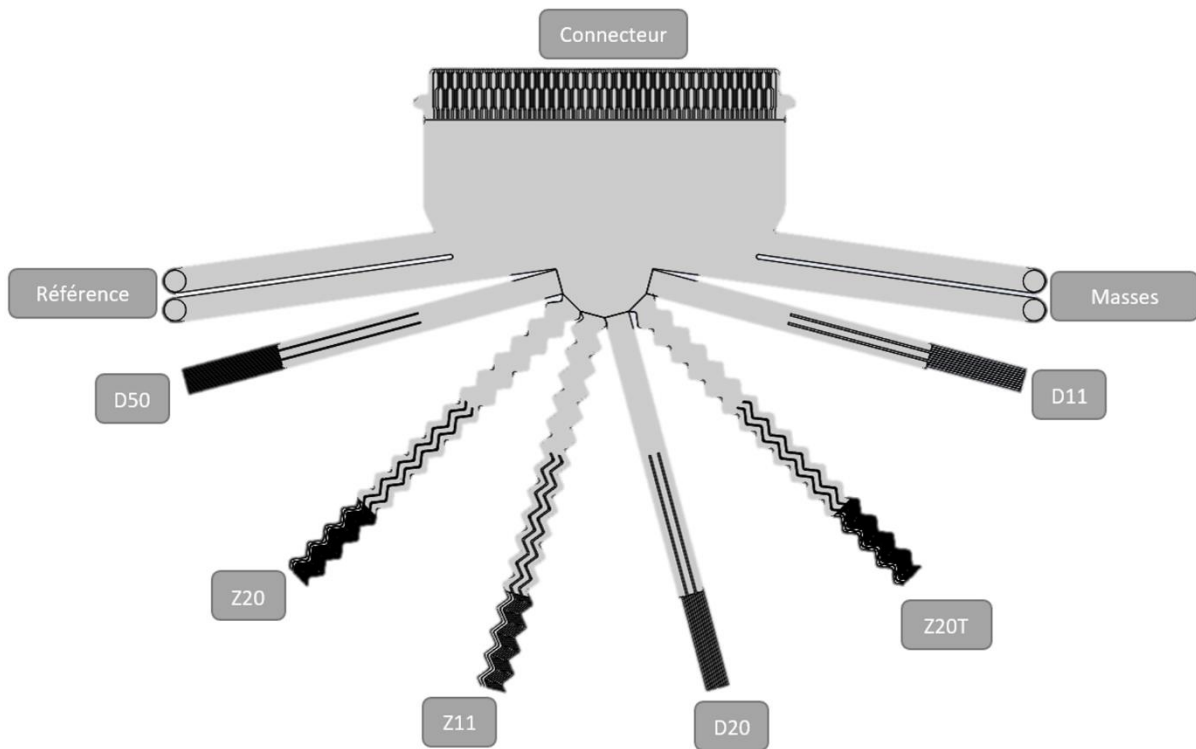


Figure 46 : implant ZIF 71 voies version 2

Afin de pouvoir faire la correspondance entre l'enregistrement de chaque électrode et le positionnement de chaque électrode dans le cortex des motifs permettant d'identifier chaque fil ont été ajoutés à l'extrémité des fils au dessus des électrodes (voir figure 47). Après avoir réalisé des enregistrements in vivo, le rat est euthanasié, son cerveau est extrait (voir annexe 8) et un protocole d'immunomarquage est utilisé afin d'analyser la réponse immunitaire autour de l'implant. Les formes au bout de chaque tentacule permettent ainsi de reconnaître lors de l'immunomarquage chaque électrode et ainsi de faire le lien avec les enregistrements corticaux.

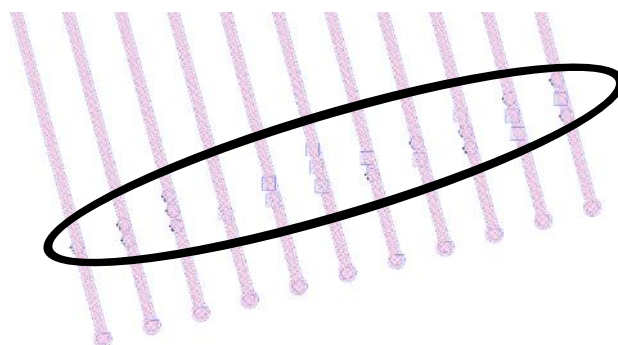


Figure 47 : Formes (zone entourée) permettant de reconnaître chaque électrode lors de l'immunomarquage

La géométrie de l'implant répond aujourd'hui à nos attentes car elle permet un enregistrement multi sites. La géométrie pourra être amenée à évoluer suivant les résultats obtenus lors des enregistrements.

## 2.2 Matériaux utilisés

Les matériaux utilisés pour réaliser l'implant peuvent avoir une grande influence sur les performances de l'implant. Le polymère utilisé est directement au contact du tissu biologique. L'utilisation d'un polymère biocompatible est donc nécessaire. De plus, comme décrits au chapitre 1, les nanostructures peuvent améliorer la biocompatibilité de l'implant. Utiliser un matériau nanostructurable est donc important. L'épaisseur du polymère modifie ses propriétés mécaniques. Une épaisseur trop importante de polymère augmenterait la rigidité de l'implant, ce qu'il faut éviter. Une épaisseur trop fine fragiliserait l'implant et augmenterait les risques de rupture. La résistance du matériau est aussi un point important pour sa stabilité long terme. La facilité d'utilisation du polymère est un autre facteur important dans le choix de l'isolant.

Le métal, polymère conducteur ou autres matériaux conducteurs utilisés pour réaliser les pistes et les électrodes influencent les performances électriques et de biocompatibilité de l'implant. Certains matériaux comme l'argent sont de très bons conducteurs mais toxiques pour l'organisme. Comme pour le polymère, la méthode de dépôt du conducteur est un facteur à prendre en compte. Certaines méthodes nécessitent de hautes températures ou de gros équipements comme pour le dépôt du diamant.

La combinaison isolant/conducteur ne doit pas non plus être choisie au hasard. Certains métaux ont une meilleure adhésion sur certains polymères. Une faible adhésion peut initier une délamination de l'implant et une perte de sa capacité à enregistrer les signaux neuronaux.

### 2.2.1 Electrodes

Les matériaux utilisés pour réaliser les pistes et les électrodes ont évolué au cours de la thèse. Les pistes et les électrodes des premiers implants sont constituées d'une superposition de titane et d'or. Sur les implants suivants un empilement Titane/Or/Titane/Platine est utilisé. La couche de titane de départ permet une bonne adhésion de l'or au polymère. L'or est utilisé pour ses bonnes caractéristiques électriques et sa bonne biocompatibilité.

L'or et le titane peuvent simplement être déposés par CVD (Annexe 2). L'or peut être gravé par une gravure humide en utilisant une solution d'iodure de potassium iodée (IKI). L'ion beam etching (IBE) (annexe 2) permet de réaliser une gravure sèche de l'or. Le titane peut lui aussi être gravé par voie humide avec une solution d'acide fluorhydrique et d'acide nitrique ou par voie sèche par IBE. Afin de graver les deux couches en une fois la gravure sèche a été choisie.

Le platine ajouté sur les derniers implants permet d'améliorer la résistance à la corrosion et la biocompatibilité de l'électrode (Polikov et al., 2005). Le platine est aussi déposé par CVD (Annexe 2). Une gravure humide peut être utilisée pour le graver mais les produits utilisés qui sont de l'acide chlorhydrique et de l'acide nitrique sont relativement dangereux (Köllensperger et al., 2012). Une gravure par l'IBE est donc préférable.

## 2.2.2 Isolant

L'isolant utilisé pour l'implant est la SU-8 (figure 48). Ce polymère a été préféré au parylène C car il ne nécessite pas de bâti spécifique pour être déposé. De plus, l'adhésion entre les métaux et la SU-8 semble être meilleure.

La SU-8 regroupe ainsi les avantages suivant : facile à utiliser, une bonne adhésion sur le métal, une bonne biocompatibilité (pour certains types de SU-8 et qui sera vérifiée pour celle que nous avons choisie par culture de cellules corticales de rats dans le cadre de la thèse de Jean Marie Mayaudon) et une grande plage d'épaisseur réalisable.

Il est possible d'obtenir différentes épaisseurs de SU-8 allant de 0,5  $\mu\text{m}$  à 20  $\mu\text{m}$ . Bien que l'épaisseur souhaitée de chacune des couches de SU-8 au départ ait été 0,5  $\mu\text{m}$ , la fragilité de la SU-8 nous a conduit à choisir de développer dans un premier temps un implant avec des couches de SU-8 de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. La SU-8 est une résine négative qui se polymérise lorsqu'elle est insolée aux ultraviolets. Elle est sensible à la lumière et il faut donc conserver les implants dans le noir après fabrication.

## 2.3 Etapes de fabrication

Les méthodes de fabrication étant relativement diverses et variées, le choix de la méthode a été pris en fonction des caractéristiques de l'implant. En effet, l'implant doit être en polymère flexible. Les dimensions de l'implant nécessitent des outils de précisions que sont la photolithographie et les gravures plasma. La haute densité demande aussi une certaine fiabilité afin que toutes les électrodes soient similaires. Les outils de la salle blanche ont été choisis afin de répondre à toutes ces problématiques.

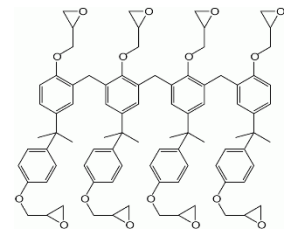


Figure 48: Formule chimique de la SU-8 ([https://en.wikipedia.org/wiki/SU8\\_photoresist#/media/File:SU-8\\_photoresist.png](https://en.wikipedia.org/wiki/SU8_photoresist#/media/File:SU-8_photoresist.png))

### 2.3.1 Fabrication de l'implant 256

Voici les principales étapes de fabrication de l'implant 256 (figure 49) :

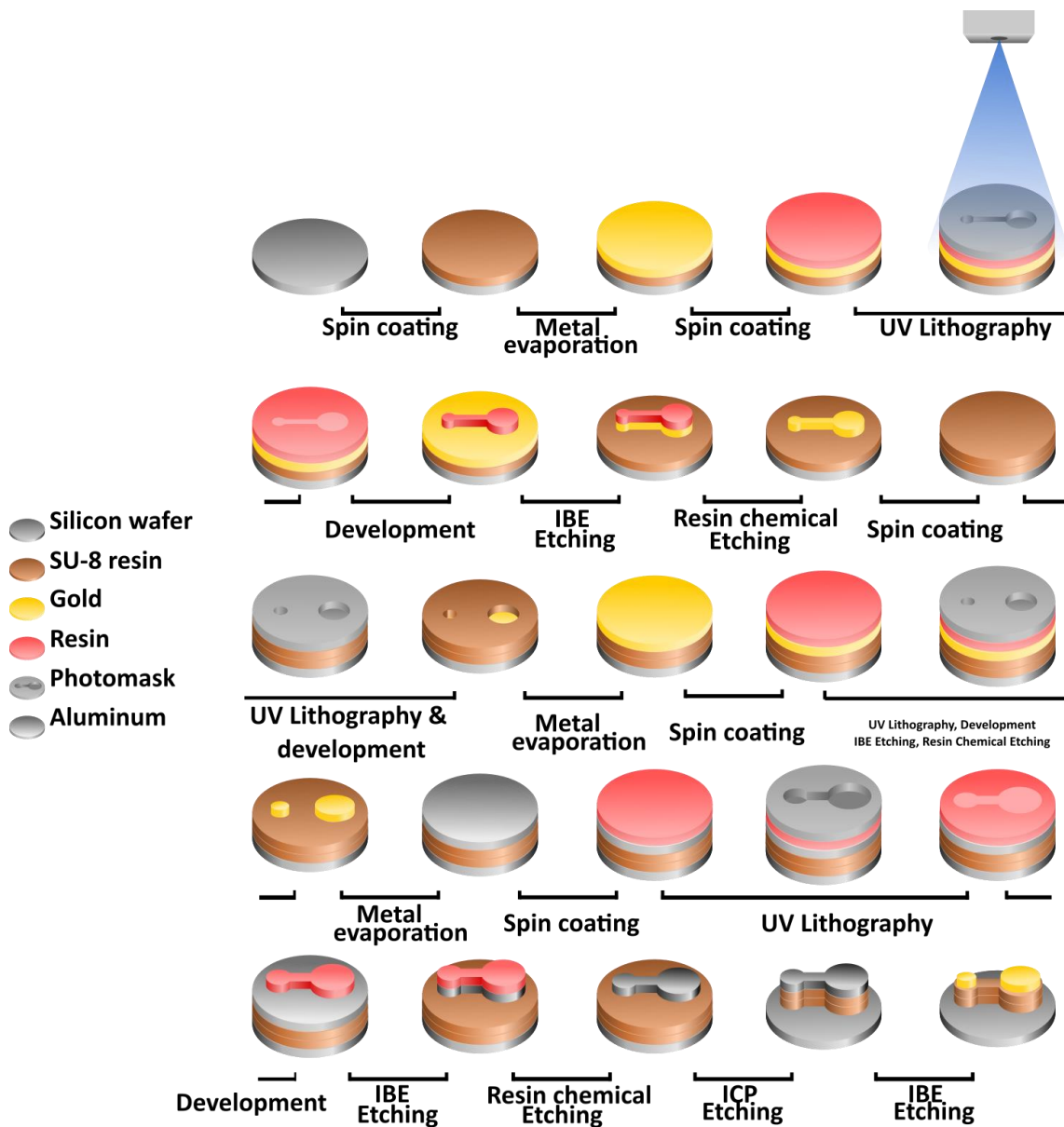


Figure 49 : Processus de fabrication de l'implant 256

#### 2.3.1.1 Couche sacrificielle

- Dépôt de la couche de Nickel

Dépôt de 200 nm de Nickel sur le wafer de silicium 100 à une vitesse de 1 nm/minute par évaporation sous vide (MEB 550 de chez Plassys). Cette couche de Nickel va servir de couche Sacrificielle.

#### 2.3.1.2 Couche inférieure

- Dépôt de la SU-8 2005

Afin de faciliter la dépose de la SU-8, le wafer est chauffé à 95°C pendant 30 secondes. Les résines n'aiment pas l'humidité. Ensuite une pipette d'HMDS, un facilitateur d'accroche, est déposée sur le wafer et la tournette est lancée à 4000 tr/min pendant 50 secondes avec une accélération de 2000 tr/min<sup>2</sup>. Ensuite deux pipettes de SU-8 sont déposées sur le wafer et la tournette est lancée à 4000 tr/min pendant 50 secondes avec une accélération de 2000 tr/min<sup>2</sup>. Le dépôt est homogène et mesure 4 µm d'épais.

- Recuit et insolation de la SU-8

Un premier recuit est nécessaire afin que le solvant présent dans la résine s'évapore. Cette première couche de SU-8 n'est gravée qu'une fois les pistes et les ouvertures créées. Cette couche doit donc polymériser et être suffisamment résistante afin de supporter les traitements endurés par le wafer.

Il existe deux possibilités pour polymériser suffisamment la SU-8 :

- Une fois la résine déposée, elle est recuite 1 minute à 65°C puis 2 minutes à 95°C. On insole tout le wafer (résine négative) afin que tout polymérise. Le wafer est alors recuit 1 minute à 65°C puis 2 minutes à 95°C puis 20 minutes à 180 °C
- Une fois la résine déposée, elle est recuit 2 minutes à 65°C puis 4 minutes à 95°C et 20 minutes à 180 °C

Pour cette thèse j'ai utilisé la première méthode. Sans le recuit à 180 °C la SU-8 n'adhère pas suffisamment et se décolle pendant les autres étapes de fabrication.

### 2.3.1.3 *Création des pistes et des électrodes*

- Dépôt du Titane et de l'or

Une première couche de titane (servant de couche d'accroche pour l'or) de 50 nm est déposée sur le wafer à une vitesse de 0,5 nm/seconde. Une couche d'or de 200 nm est ensuite déposée à une vitesse de 0,5 nm/seconde.

- Dépôt de l'AZnLof 2070

Un dépôt de résine est nécessaire afin de dessiner les pistes et les électrodes. La résine AZnLof 20 70 est relativement épaisse ce qui permet de graver longtemps les pistes métalliques sans problème. Afin de faciliter la dépose de la résine, le wafer est chauffé à 100°C pendant 30 secondes. Ensuite deux pipettes d'AZnLof 2070 sont déposées sur le wafer et la tournette est lancée à 3500 tr/min pendant 50 secondes avec une accélération de 2000 tr/min<sup>2</sup>. La couche déposée mesure 5 µm d'épais.

- Recuit, insolation et développement de l'AZnLof 2070

Une fois la résine déposée, elle est recuit 6 minutes à 100°C afin d'évaporer le solvant. Le wafer est insolé en utilisant un masque chrome (Masque réalisé par la société Toppan, comportant les motifs des pistes métalliques) pendant 35 secondes à 400 W. Le wafer est ensuite recuit 1 minute à 110°C afin de renforcer la polymérisation. Le wafer est ensuite placé 1 minute dans le MF 26 puis rincé 2 minutes à l'eau DI.

- Gravure du Titane et de l'or

Les premiers implants ont été gravés par voie chimique. Les résultats peu satisfaisants ainsi que les produits utilisés nous ont conduit à opter pour une gravure plasma.

Gravure chimique : le wafer est placé 30 secondes dans le IKI puis rincé deux minutes à l'eau déionisée. Il est ensuite plongé dans une solution Ti etchant (Ammoniac 30% : peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% : eau, 1 :1 :1) pendant 1 minute et ensuite rincé deux minutes à l'eau DI.

Gravure physique : Gravure plasma : L'or et le titane sont gravé par IBE SCIA 600 V avec un angle d'incidence de 90° pendant 8 minutes puis 1 minute à 10° d'incidence.

#### 2.3.1.4 Ouverture des électrodes

- Dépôt de SU-8 2005

Une fois la gravure effectuée, la résine servant de masque doit être retirée. Le wafer est placé 2 minutes dans un bécher d'acétone installé dans un bac à ultrasons. Afin de faciliter la dépose de la SU-8, le wafer est chauffé à 95°C pendant 30 secondes. Ensuite deux pipettes de SU-8 sont déposées sur le wafer et la tournette est lancée à 4000 tr/min pendant 50 secondes avec une accélération de 2000 tr/min<sup>2</sup>. L'accroche de la SU-8 sur la SU-8 est suffisante pour assurer un dépôt homogène. Cette couche de SU-8 est la couche sur laquelle les ouvertures sur les électrodes ainsi que sur les pads de contact vont être créés.

- Recuit, insolation et développement SU-8

Une fois la résine déposée, elle est recuite 1 minute à 65°C puis 2 minutes à 95°C. Le wafer est insolé en utilisant le masque des ouvertures afin de polymériser la résine. Le wafer est alors recuit 1 minute à 65°C puis 2 minutes à 95°C afin de bien terminer la polymérisation.

Le wafer est ensuite placé 60 secondes dans le SU-8 développeur (MRdev-600) puis 15 seconde dans l'IPA puis il est rincé 2 minutes à l'eau DI.

#### 2.3.1.5 Création des pads de contact

- Dépôt de titane et d'or

Une fois les ouvertures créées, les pads de contact doivent être réalisés. Ils sont réalisés avec les mêmes matériaux que les matériaux utilisés pour les pistes. Une première couche de titane (servant de couche d'accroche pour l'or) de 50 nm est déposée sur le wafer à une vitesse de 0,5 nm/seconde. Une couche d'or de 200 nm est ensuite déposée à une vitesse de 0,5 nm/seconde.

- Dépôt de AZnLof 2070

Comme pour la réalisation des pistes, un dépôt de résine est nécessaire afin de dessiner les pads de contact et les électrodes. Afin de faciliter la dépose de la résine, le wafer est chauffé à 100°C pendant 30 secondes. Ensuite deux poires d'AZnLof 2070 sont déposées sur le wafer et la tournette est lancée à 3500 tr/min pendant 50 secondes avec une accélération de 2000 tr/min<sup>2</sup>.

- Recuit et Insolation et développement de l'AZnLof 20 70



Une fois la résine déposée, elle est recuit 6 minutes à 100°C. On insole le wafer en utilisant le masque pour les pads. Le wafer est ensuite recuit 1 minute à 110°C. Le wafer est ensuite placé 1 minute dans le MF 26 puis rincé 2 minutes à l'eau DI.

- Gravure du Titane et de l'or

Les premiers implants ont été gravés par gravure chimique. Les résultats peu satisfaisants ainsi que les produits utilisés ont conduit à opter pour une gravure plasma.

Gravure chimique : Le wafer est placé 30 secondes dans le IKI puis rincé deux minutes. Il est ensuite placé dans une solution Ti etchant (Ammoniac 30% : peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% : eau, 1 :1 :1) pendant 1 minute et ensuite rincé deux minutes à l'eau DI.

Gravure plasma : L'or et le titane sont gravé par IBE SCIA 600 V avec un angle d'incidence de 90° pendant 8 minutes puis 1 minute à 10° d'incidence.

#### 2.3.1.6 Création de la forme de l'implant

- Dépôt de l'aluminium

La dernière étape consiste à graver l'implant afin qu'il ait la forme géométrique voulue. Pour cela un masque aluminium va être réalisé. 200 nm de d'aluminium sont déposés sur le wafer à une vitesse de 1 nm/minute.

- Dépôt de l'AZnLof 20 70

L'aluminium qui vient d'être déposé doit être gravé avec la forme de l'implant. Pour cela, une couche de résine va être utilisée. La résine utilisée est de nouveau l'AZ nLof 2070. Afin de faciliter la dépose de la résine, le wafer est chauffé à 100°C pendant 30 secondes. Ensuite deux pipettes d'AZnLof 2070 sont déposées sur le wafer et la tournette est lancée à 3500 tr/min pendant 50 secondes avec une accélération de 2000 tr/min<sup>2</sup>.

- Recuit et Insolation et développement de l'AZnLof 20 70

Une fois la résine déposée, elle est recuit 6 minutes à 100°C. On insole le wafer en utilisant le masque pour la forme de l'implant. Le wafer est ensuite recuit 1 minute à 110°C. Le wafer est ensuite placé 40 secondes dans le MF 26 puis rincé 2 minutes à l'eau DI. La résine a donc la forme de l'implant.

- Gravure de l'aluminium

Pour graver l'aluminium il existe la méthode humide et la méthode par plasma. Ici, la méthode humide est utilisée mais va ensuite laisser place à la gravure par plasma.

Gravure humide : le wafer est placé 6 minutes dans l'aluminium etchant puis rincé 2 minutes à l'eau DI.

Gravure plasma : l'aluminium est gravé par l'IBE SCIA 600 V avec un angle d'incidence de 90° pendant 8 minutes puis 1 minute à 10° d'incidence.

- Gravure de la résine

Une fois le masque aluminium réalisé, la gravure de la double couche de SU-8 est gravée grâce à l'ICP Oxford.

Les paramètres utilisés sont les suivants : O<sub>2</sub> : 10 ; Ar : 30 ; Puissance ICP : 100 W ; Puissance Bias : 500W.

20 minutes de gravure sont nécessaires afin de graver les 8 micromètres de résine. Un voile de poussière blanc est présent sur le wafer à la fin du processus.

#### 2.3.1.7 *Suppression de l'aluminium*

Suite à la gravure de la SU-8, le masque aluminium doit être enlevé.

Pour graver l'aluminium il existe la méthode humide et la méthode par plasma. Ici, la méthode humide est utilisée mais va ensuite laisser place à la gravure par plasma.

Gravure humide : le wafer est placé 6 minutes dans l'aluminium etchant puis rincé 2 minutes à l'eau DI.

Gravure plasma : l'aluminium est gravé par l'IBE SCIA 600 V avec un angle d'incidence de 90° pendant 8 minutes puis 1 minute à 10° d'incidence. Il faut faire attention de ne pas détériorer les électrodes lors de cette opération.

#### 2.3.1.8 *Décollement de l'implant*

Le décollement de l'implant est réalisé par dissolution de la couche sacrificielle de nickel. Le wafer est trempé 5 jours dans le nickel etchant puis rincé dans l'eau DI.

#### 2.3.1.9 *Motif test*

Sur chaque wafer des motifs de tests permettent de tester le bon déroulement de la fabrication. Ces motifs de test ont la même structure que les implants. Ils ont un seul pad de connexion et une seule électrode, les deux avec un diamètre de 1 millimètre de diamètre relié par un fil en zigzag de 11 ou 50  $\mu\text{m}$  de large et de 1,4 ou 2 cm de long (figure 50). Le diamètre de 1 millimètre permet d'utiliser les sondes de mesures classiques d'un ohmmètre.

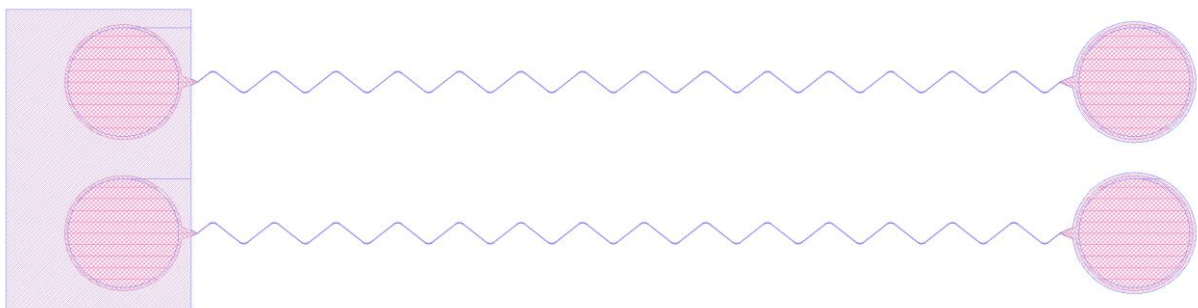


Figure 50 : Motif de test. Fil de 11  $\mu\text{m}$  de large et 1,4 cm de long

Un simple ohmmètre permet ainsi de valider le bon déroulement de certaines étapes de fabrication. Par exemple, il est possible de s'assurer que l'étape de l'ouverture des électrodes et des pads de connexion s'est bien déroulée en mesurant la résistance entre l'électrode et le pad des motifs tests. Si

un résidu de polymère est présent sur les ouvertures alors la résistance sera élevée. Cela permet aussi de vérifier que les fils résistent tout au long de la fabrication.

### 2.3.2 Fabrication de l'implant 71 version 1

Des changements ont été apporté à la méthode de fabrication pour les implants 71 contacts. Le nouveau procédé est plus court comme le montre la figure 51.

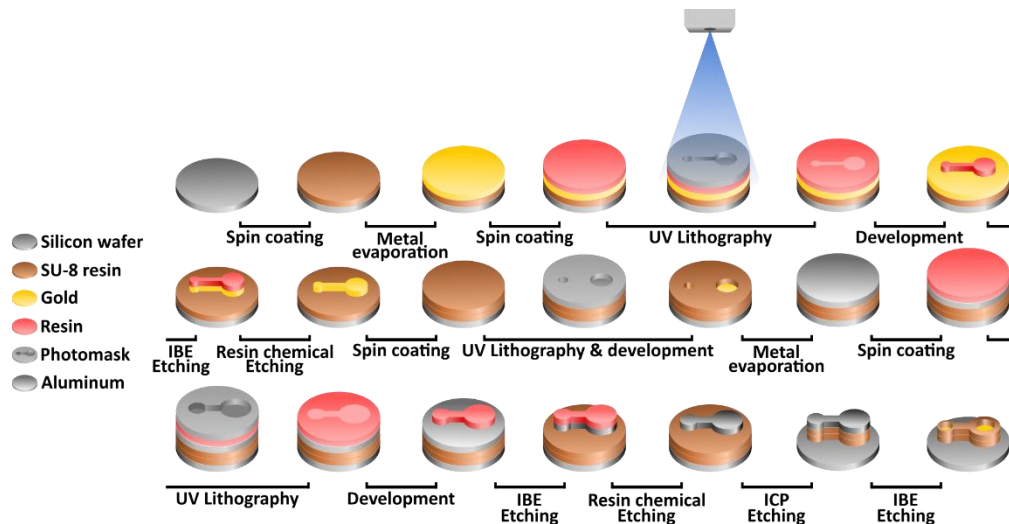


Figure 51 : Processus de fabrication de l'implant

Les grands changements sont l'utilisation d'aluminium comme couche sacrificielle, l'utilisation de la gravure IBE pour graver toutes les couches métalliques, l'ajout de couche de titane et de platine lors de la création des pistes et des électrodes et les étapes nécessaires à la création de pads de connexion.

Les étapes de fabrication sont :

- Dépôt de de 200 nm d'aluminium
- Dépôt de SU-8 2005
- Dépôt d'une couche Titane/Or/Titane/Platine
- Dépôt d'une résine photosensible, lithographie des pistes et développement
- Gravure IBE de la couche métallique
- Gravure chimique de la résine photosensible
- Dépôt de SU-8 2005
- Lithographie des ouvertures des électrodes et pads puis développement
- Dépôt de 200 nm d'aluminium
- Dépôt d'une résine photosensible, lithographie de la forme de l'implant et développement
- Gravure de l'aluminium par IBE
- Gravure de la SU-8 par ICP
- Gravure de l'aluminium par IBE
- Dissolution de l'aluminium par dissolution anodique du métal (Metz et al. 2005)

Le montage utilisé pour la dissolution de l'aluminium, la dernière étape du processus, comprend un récipient rempli d'eau salée (40 grammes de sel dans un litre d'eau distillée) dans lequel sont placés une grille en platine faisant office de contre électrode et le wafer avec les implants. La grille de platine est connectée à la borne moins du générateur. Le wafer est connecté à la borne plus de l'électrode.

Un fil d'acier de 1 mm de diamètre (trombone déformé) est utilisé pour faire la connexion entre le wafer et le fil de la borne plus du générateur. La partie immergée du fil d'acier est recouverte de pâte à fixe évitant la corrosion du fil d'acier pouvant créer des résidus toxiques. Une fois tout le système installé, une tension de 0,8 V est appliquée au borne du wafer. Après 3 à 5 heures (suivant le contact plus ou moins important entre le fil d'acier et le wafer), l'ensemble de l'aluminium a été dissous et l'implant est décollé du wafer.

L'utilisation d'une dissolution anodique de l'aluminium dans l'eau salée a de nombreux atouts par rapport à l'utilisation du Nickel Etchant. La gravure de la couche sacrificielle par dissolution anodique est beaucoup plus rapide (3-5 heures) que la gravure chimique grâce au Nickel Etchant (5 jours). De plus, le Nickel Etchant (solution à base de nitrate) est un produit beaucoup plus toxique que l'eau salée utilisée pour la dissolution anodique.

### 2.3.3 Evolution de la méthode de fabrication de l'implant 71 version 2

Une méthode de fabrication plus rapide a été testée (figure 52) pour réaliser la version 2 des implants 71 voies. Cette méthode consiste à supprimer l'étape de gravure finale de la forme de l'implant. La forme de l'implant est réalisée par photolithographie sur la première couche de SU-8. La photolithographie de la seconde couche de SU-8 consiste à réaliser les ouvertures ainsi que la forme de l'implant. Cette méthode supprime un grand nombre d'étapes par rapport à la méthode précédente mais nous verrons qu'elle n'aboutira pas à la fabrication d'implants de bonne qualité dans le cas particulier du design d'implant que nous avons choisi.

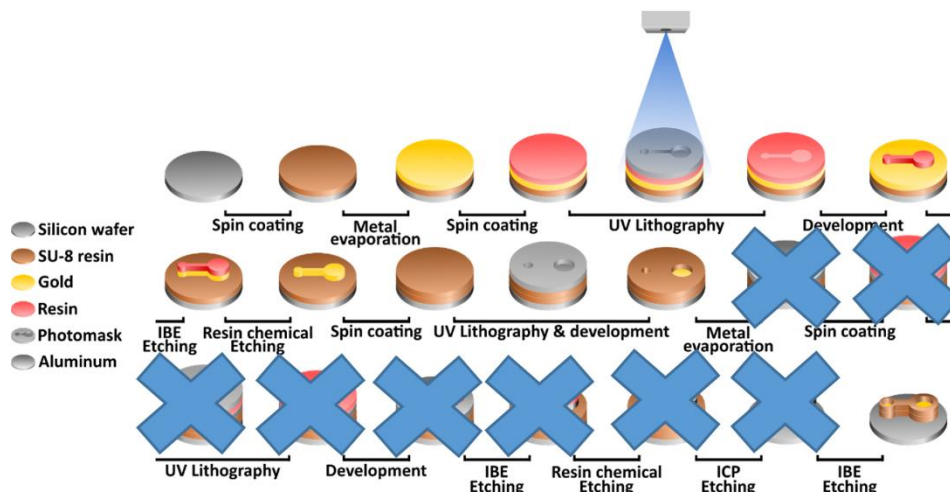


Figure 52 : Nouveau processus de fabrication de l'implant

64 wafers ont été utilisés afin de concevoir les différents implants. Les 21 premiers wafers ont été utilisés pour la mise au point du protocole et pour réaliser les premiers implants 256 électrodes. Les 24 suivants ont été utilisés pour la mise au point du processus de fabrication du premier implant ZIF et pour la réalisation de cette implant. Enfin les 19 derniers wafers ont été utilisés pour la mise au point du processus de fabrication plus rapide et pour la réalisation des implants ZIF seconde génération.

### 2.3.4 Implants en fin de fabrication

Voici les implants obtenus avec les différents procédés de fabrication.

### 2.3.4.1 Processus de fabrication numéro 1

Les figures suivantes montrent des images prises au microscope des implants 256 (voir figure 53) une fois finis.

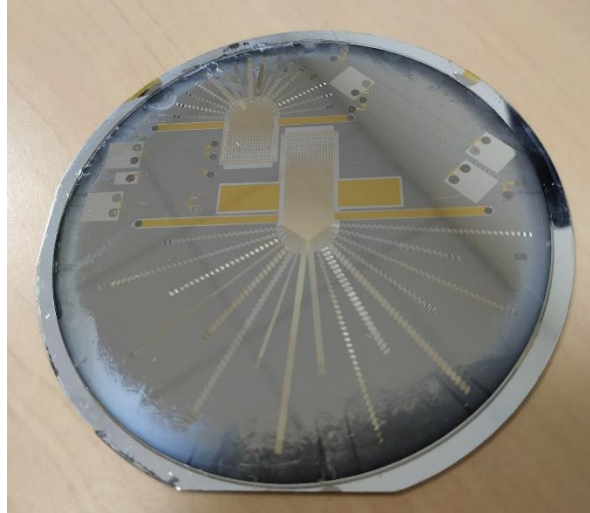


Figure 53 : Implant rat et miniporc 256 sur wafer

On peut observer que les électrodes sont légèrement plus foncées que les pistes en or sur la figure 54. Cela est dû à la dernière étape d'IBE qui nanostructure les électrodes. Sur la figure 55 et, on peut voir les implants 71 voies en platine.

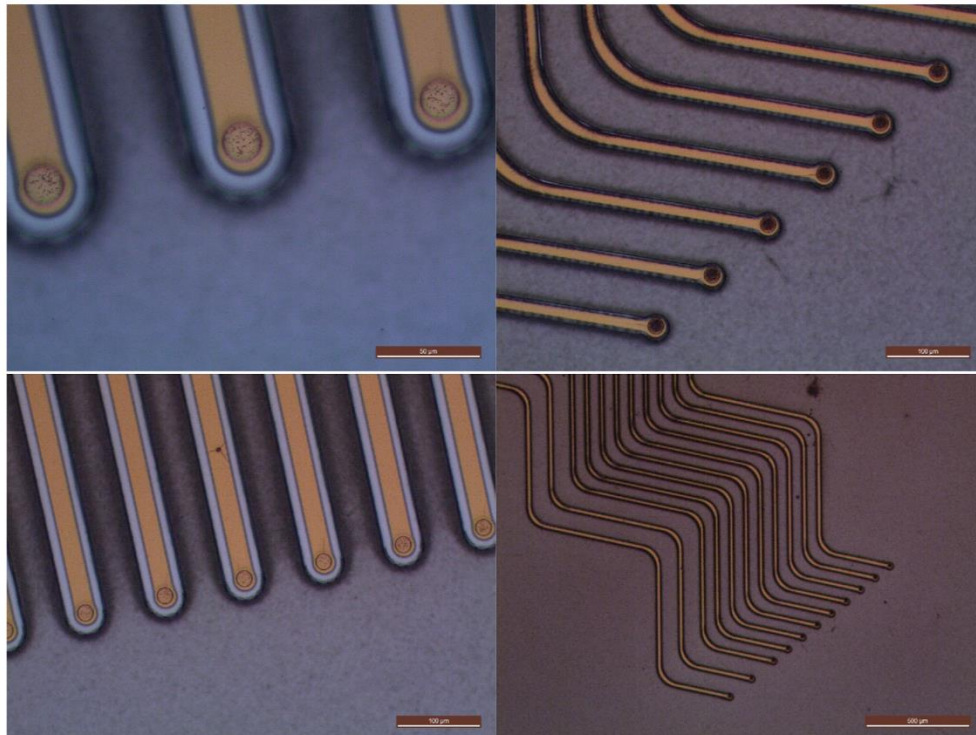


Figure 54 : Image au microscope optique des fils des implants avec des électrodes en or sur wafer. Colonne de gauche : fils droits de 50 µm de large. Colonne de droite : fils de 20 µm de large ondulés

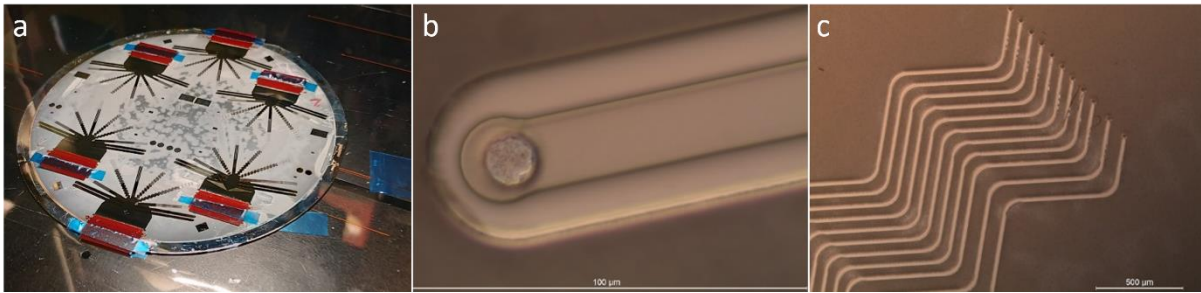


Figure 55 : a : wafer d'implant 71 en platine connecté au cicor (voir 2.3.5). b et c : Image au microscope optique des fils de 50 µm de large avec des électrodes en platine d'implant 71 version 2

La couleur des pistes est différente étant donné l'utilisation de platine. On observe toujours des aspérités au niveau de l'électrode.

Des mesures au profilomètre (figure 56) confirme bien les 8 µm d'épaisseur de l'implant.

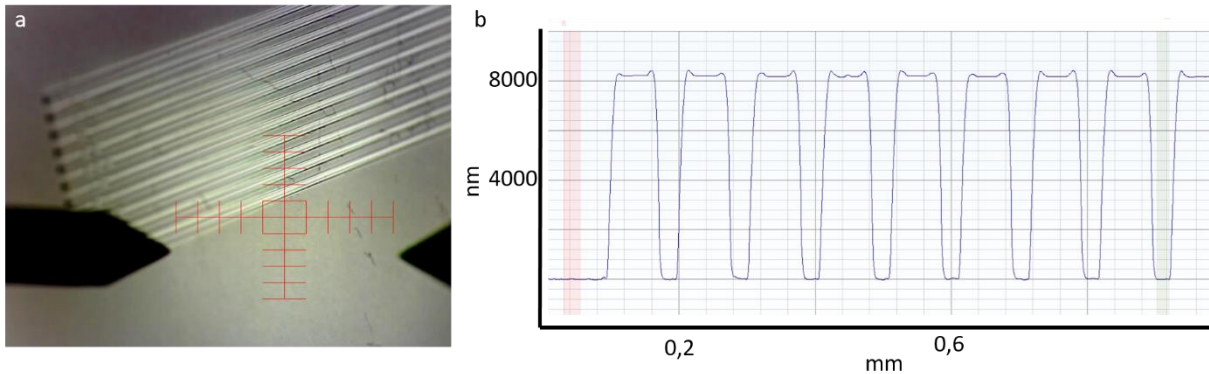


Figure 56 : a : image de la pointe du profilomètre ainsi que des fils du tentacule étudié. b : diagramme du profilomètre montrant que les fils d'un tentacule sont d'une épaisseur de 8 µm.

Une image MEB des ouvertures (figure 57) montre que le diamètre des électrodes est inférieur au diamètre voulu (20 µm). En effet, les électrodes ont un diamètre de 15 µm de diamètre comme le montre la figure. Le désavantage est que l'impédance des électrodes sera plus grande que pour des électrodes de 20 µm de diamètre prévu initialement. L'avantage est qu'on augmente la chance d'enregistrer des activités unitaires.

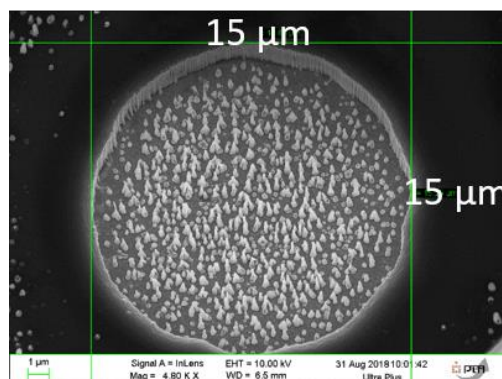


Figure 57 : Image MEB d'une électrode de 15 µm de diamètre en platine

Lors de la dernière étape de fabrication du processus 1 qui consiste à graver le masque en aluminium grâce à l'IBE, les électrodes sont nanostructurées. En effet, des nanostructures de différentes formes sont créées par les ions argon qui percutent les électrodes. Ces nanostructures peuvent être de longs piliers (figure 58) ou de petits plots. Il est possible que le masque en aluminium fasse office de micro-masquage et permette ainsi la création des nanostructures. En effet, aucune nanostructure n'apparaît après passage à l'IBE dans le processus 2 dans lequel il n'y a pas de masque en aluminium.

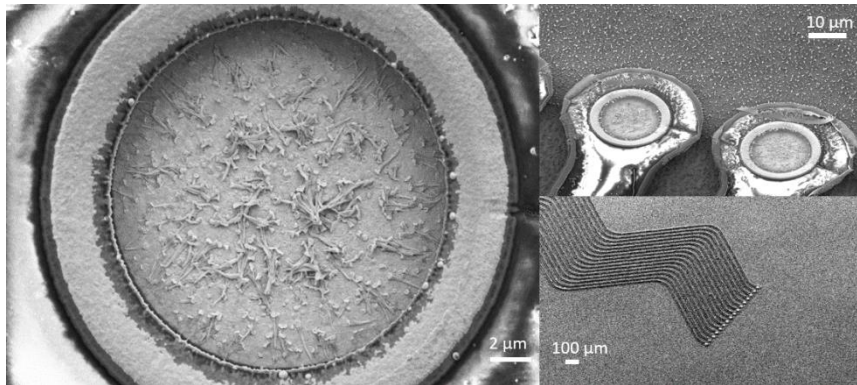


Figure 58 : A gauche : Electrode nanostructuré en Or. A droite : fil d'électrode nanostructuré.

Les nanostructures ont été caractérisées grâce à un l'analyse dispersive en énergie (EDX). Lorsque les électrodes sont en or (figure 59), les nanostructures sont en or et il y a un résidu très faible du masque d'aluminium.

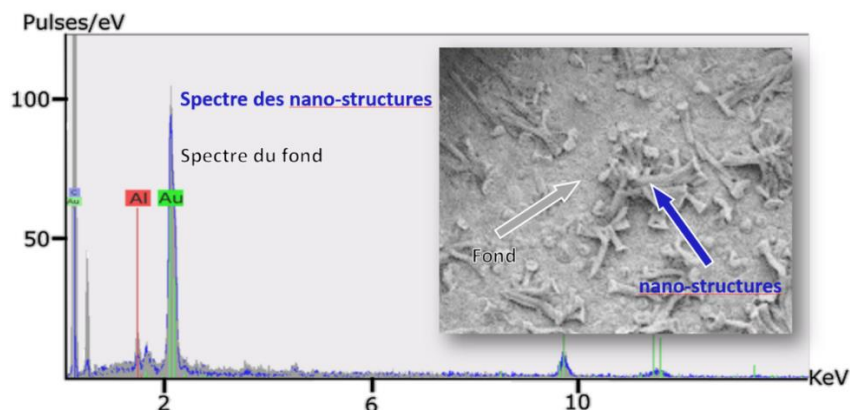


Figure 59 : Spectre résultant de l'EDX sur une électrode nanostructuré en or montrant la présence d'or et d'un peu d'aluminium

En revanche, lorsque les électrodes sont en platine, des résidus d'aluminium sont nettement présents dans les électrodes. Cela peut être dû au fait que le platine et l'aluminium interagissent rapidement entre eux créant des couches intermétalliques (Murarka et al., 1976). Pour essayer de remédier à cela, le wafer a été placé dans une solution de gravure de l'aluminium (80% d'acide phosphorique, 5% d'acide nitrique, 5% d'acide acétique et 10 % d'eau distillée) pendant 2 minutes (ce qui correspond à une gravure de 80 nm d'aluminium) afin de retirer les résidus d'aluminium. Suite à cette gravure, les nanostructures étaient toujours présentes comme le montre la figures 60 ci-dessous.

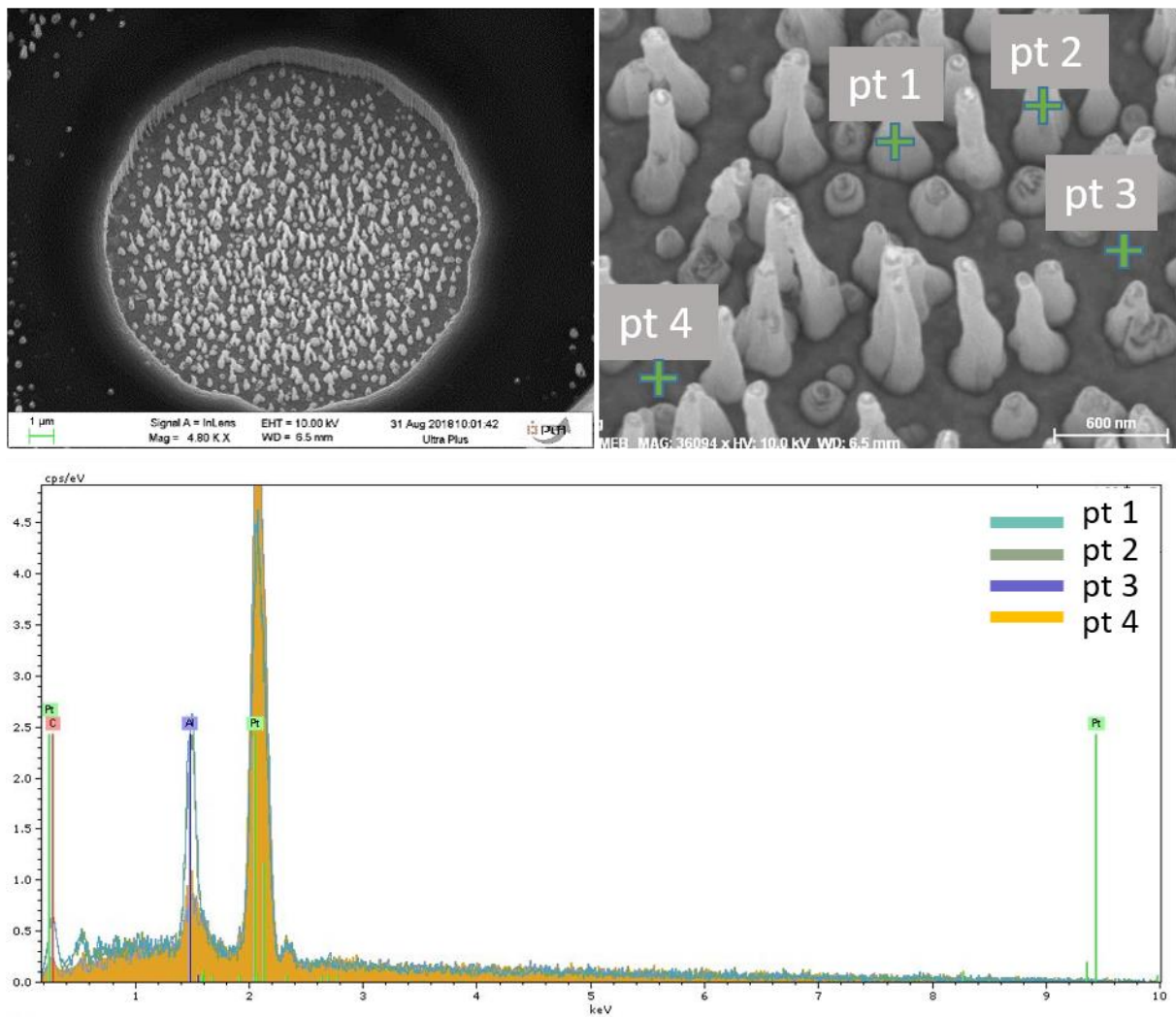


Figure 60 : En haut : Electrode de platine nanostructurée à gauche, zoom sur les nanostructures à droite. En bas : spectre EDX au niveau des nanostructures (présence de platine et d'aluminium) et du fond de l'électrode (présence de platine et d'un faible résidu d'aluminium). En vert, on observe le spectre d'un point situé sur une nanostructure. En orange plein, on observe le spectre d'un point en dehors des nanostructures.

L'EDX montre que l'aluminium est toujours présent au niveau des nanostructures comme le montre le spectre ci-dessus même après la gravure humide de l'aluminium. La gravure humide n'a donc pas permis d'enlever l'aluminium. Or on remarque que les nanostructures peuvent mesurer autour de 600 nm de hauteur alors que la couche d'aluminium déposée est inférieure à 200 nm. On peut donc penser que les nanostructures sont un alliage de platine et d'aluminium.



### 2.3.4.2 Processus de fabrication numéro 2

La figure 61 montre les parties d'un implant obtenu avec le processus numéro 2

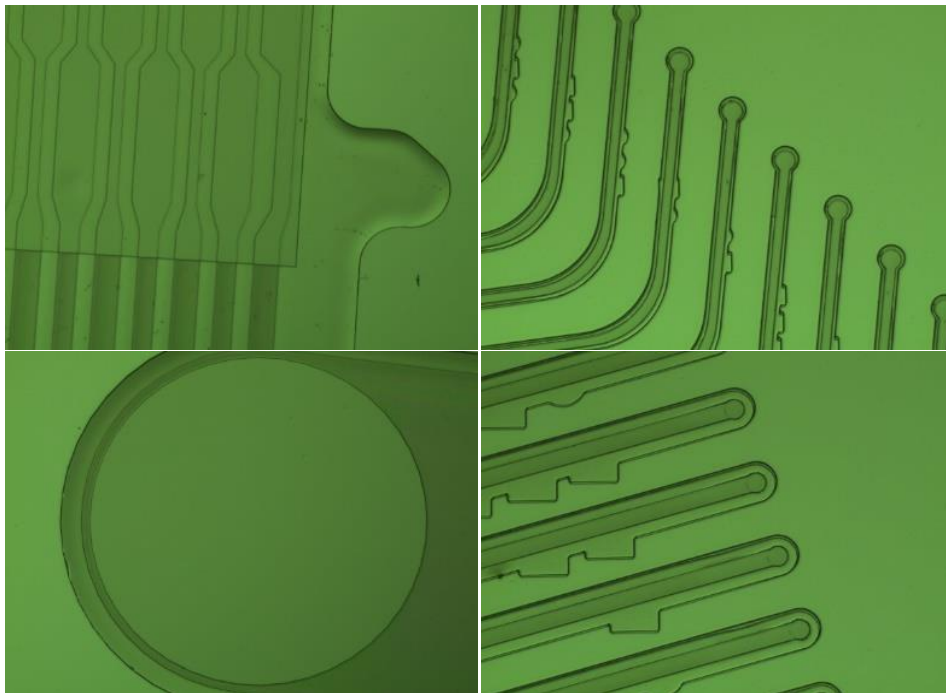


Figure 61 : Image de microscope optique d'implants réalisés grâce au second procédé de fabrication. Colonne de gauche : le connecteur ainsi que la grande référence sont très bien réalisés. Colonne de droite : On remarque qu'au bout des tentacules de 20 (en haut) et 50 (en bas)  $\mu\text{m}$  aucune ouverture n'est visible, la couche supérieure de SU-8 ne tient pas sur les petites structures.

On observe que la couche supérieure de SU-8 n'a pas adhéré sur les tentacules les plus fins (50  $\mu\text{m}$  et moins) car on observe aucune ouverture et les pistes ne sont pas protégées. Ce processus de fabrication n'est réalisable qu'avec des formes de tailles importantes. L'électrode de référence (en bas à gauche) est très bien réalisée. Ceci est dû à sa taille importante (1 mm de diamètre).

Le choix de ne plus utiliser cette technique a donc été fait. De plus, il était plus difficile d'obtenir des nanostructures au niveau de l'électrode en utilisant l'IBE en fin de processus. Bien que les nanostructures contiennent de l'aluminium, elles permettent d'améliorer les performances de l'implant (paragraphe 2.4).

### 2.3.5 Connexion de l'implant

L'implant avec sa connexion ZIF peut être directement introduit dans un ZIF. Des tests ont été réalisés afin d'effectuer le branchement Implant/ZIF en utilisant des calles. Afin de se connecter au ZIF, le connecteur de l'implant doit être d'une épaisseur de 200  $\mu\text{m}$ . Or le connecteur est épais de 8 micromètres. Il faut donc utiliser une calle sous le connecteur de 192 micromètres d'épais. Cette étape est relativement délicate car l'implant est fragile et s'enroule sur lui-même après le décollement. De plus, le platine des contacts de l'implant n'a pas une grande résistance. Or lors de l'enregistrement de signaux corticaux sur le rat, l'implant est connecté et déconnecté à la carte d'acquisition PCB. Après seulement quelques enregistrements, la connexion risque d'être endommagée et ne plus permettre d'enregistrer.

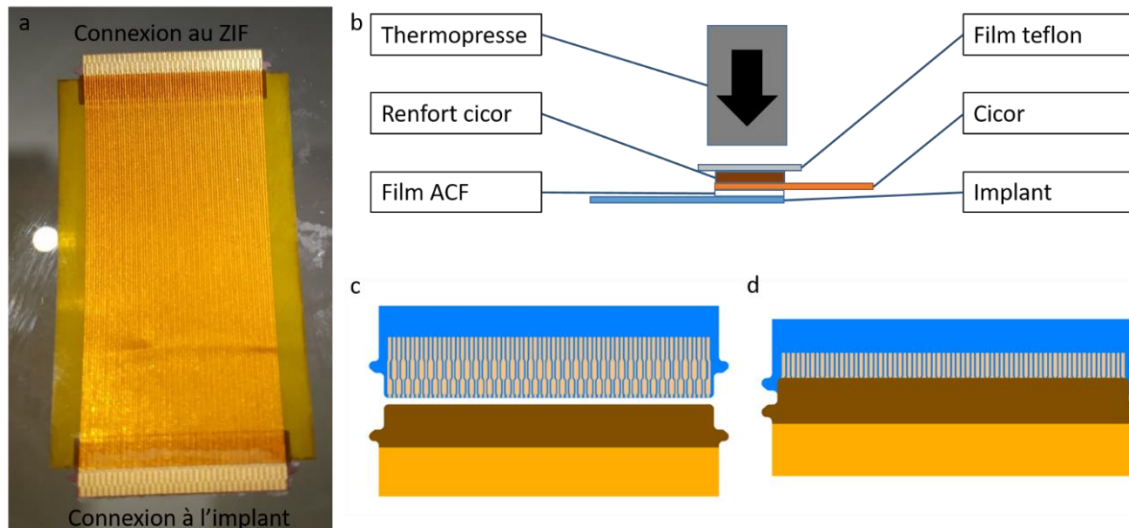


Figure 62 : a : CICOR. b : Vue de côté du montage lors du soudage de l'ensemble implant/cicor c et d : Vue de dessus de la connexion implant/cicor c. pad de l'implant en bleu et pad du cicor (les contacts sont sur la face opposée) en jaune et marron. Les deux éléments ne sont pas alignés. d. Alignement parfait de l'ensemble implant/cicor réalisé grâce aux « oreilles » servant de points de repère situés sur les bords.

Pour résoudre ce problème, une pièce intermédiaire est créée afin de faire la liaison entre l'implant et le ZIF de la carte PCB. Cette pièce est un circuit imprimé souple que nous avons conçu et que l'entreprise Cicor a fabriqué (figure 62a). Cette pièce qui doit être connectée à l'implant de façon permanente est laissée sur l'animal entre les enregistrements. Cette pièce réalisée en polyimide avec des contacts en cuivre est assez résistante pour être branchée et débranchée plusieurs fois à la carte PCB sans être détériorée.

La connexion entre le Cicor et l'implant est réalisée grâce à un film ACF (annexe 3) qui est un film conducteur anisotropique et une thermo presse (figures 62b, 62c, 63a, 63b). Un film ACF est une matrice adhésive thermoplastique chargée aléatoirement de particules conductrices. Sous l'effet de la chaleur le film se ramollit et soude les deux parties. La pression permet aux particules d'être pleinement en contact de l'implant et du cicor. La connexion peut s'opérer avant ou après décollément de l'implant. Lors de la connexion l'implant doit être sur un plan bien plat. Pour cela le wafer silicium est utilisé comme support. L'ACF est précollé sur le Cicor qui est ensuite collé sur l'implant. L'alignement entre le Cicor et l'implant est réalisé au microscope. La thermopresse exerce une pression et chauffe autour de 150 °C le film ACF afin qu'une connexion électrique s'établisse entre l'implant et le Cicor.

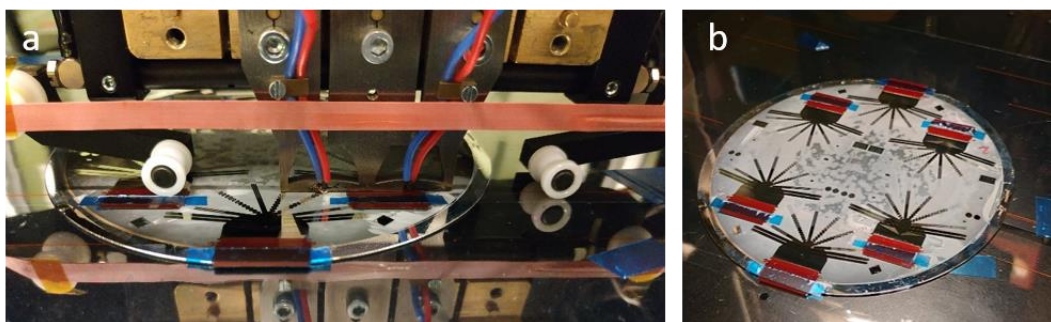
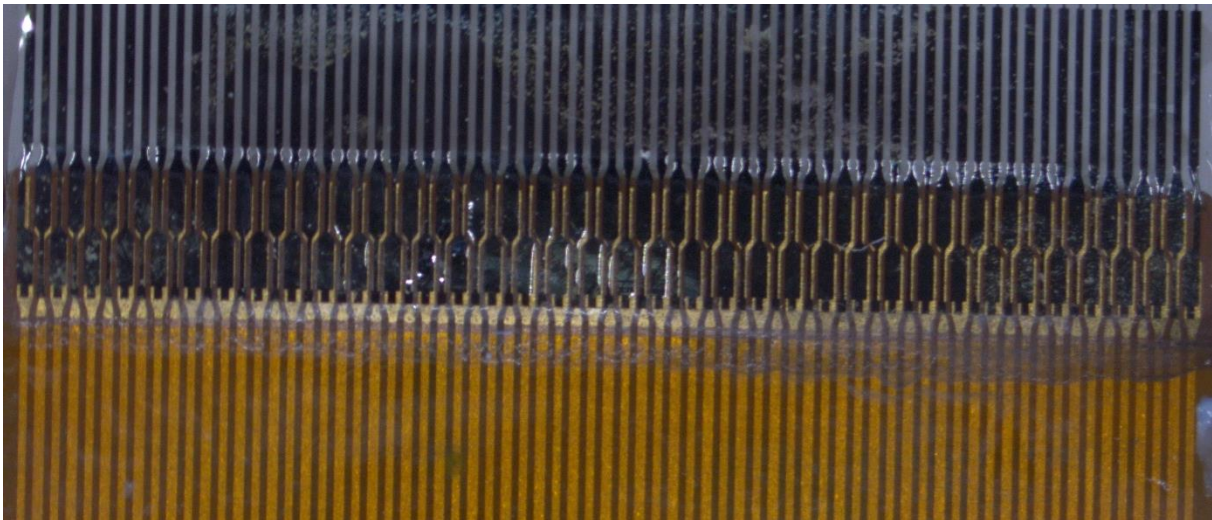


Figure 63 : a : thermopresse b : Wafer de 6 implants avec Cicor

Cette connexion doit être robuste et résister à l'autoclave (annexe 4) et au temps. La dernière étape avant l'implantation des électrodes est la stérilisation de l'implant afin d'éliminer toutes les sources possible d'infection bactérienne. L'implant est donc autoclavé à 121 °C pendant 1 heure. L'implant ainsi que la connectique doivent résister pour ensuite être implantés. Pour observer cela le bruit blanc des électrodes avant et après autoclave devra être comparé.

Lors du décollement de l'implant par dissolution de l'aluminium, l'implant reste collé au wafer au niveau de la connexion entre le cicor et l'implant. La colle présente dans l'ACF s'étale sous la pression de la thermopresse et déborde de la zone de connexion, ce qui a pour conséquence de coller l'implant au wafer. Or la couche sacrificielle d'aluminium qui devrait permettre un décollement complet de l'implant n'est pas présente sous la colle qui déborde. En effet, la dernière étape de fabrication consiste à graver les 200 nm du masque d'aluminium. Or durant cette gravure, la couche sacrificielle de 200 nm (non protégé par l'implant) a aussi été gravée complètement. Nous avons donc choisi de réduire l'épaisseur du masque en aluminium à 120 nm. Après la gravure de ce masque de 120 nm, il reste 80 nm de la couche sacrificielle en aluminium. La présence de cette couche sacrificielle permet un décollement complet de l'implant et ainsi de conserver une connexion implant/cicor en bon état (figure 64).



*Figure 64 : Exemple de connexion implant/cicor après décollement du wafer silicium*

Suite au décollement de l'implant du wafer (après avoir connecté l'implant et le cicor), il arrive parfois que l'implant se décolle partiellement du cicor. De plus, la manipulation de l'ensemble cicor/implant est toujours très délicate dû à la grande fragilité de l'implant en SU-8 même après avoir modifier le design de l'implant afin de limiter les zones fragiles.

Pour résoudre ces deux problèmes majeurs, deux solutions ont été mises en place. Juste avant le décollement des implants une fine couche de PLGA (paragraphe 3.1.2) est déposée au niveau de la connexion entre le cicor et l'implant ainsi que sur l'ensemble de l'implant excepté les tentacules. Cette couche de polymère biocompatible permet de solidifier considérablement l'implant ainsi que la connexion implant/cicor. Le PLGA est coulé sur l'implant collé au wafer situé sur une plaque chauffante à 65 °C. Après 20 minutes à 65°C le wafer peut être retiré de la plaque chauffante et revenir à température ambiante.

En plus de cette couche de PLGA déposée sur l'implant, un morceau de Kapton (ruban adhésif en polyimide, voir annexe 5) est déposé après décollage de l'implant du wafer au niveau de la jonction implant/cicor afin de renforcer de nouveau la connexion (voir figure 65).

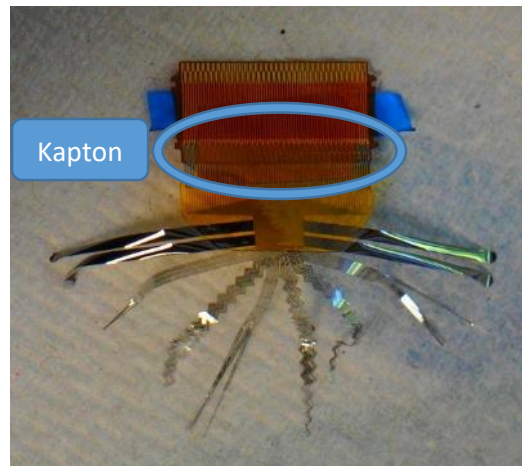


Figure 65 : Jonction implant/cicor renforcé avec du kapton

L'ajout du PLGA n'est pas sans conséquence pour les étapes de stérilisation. En effet, la température au sein de l'autoclave atteint 121 °C ce qui est suffisant pour faire fondre le PLGA. Lors de la stérilisation, l'implant est enfermé dans une boîte de pétri en verre qui est ensuite mise en sachet puis déposée dans l'autoclave. Lors des premiers essais, nous avons pu observer que l'implant restait collé au verre de la boîte de pétri car le PLGA avait fondu puis durci de nouveau une fois à température ambiante. Une fois collé sur le verre, l'implant était donc inutilisable. Pour résoudre ce problème un montage réalisé en pipette en verre permet d'éviter que la partie couverte de PLGA ne soit en contact avec le verre (voir figure 66).

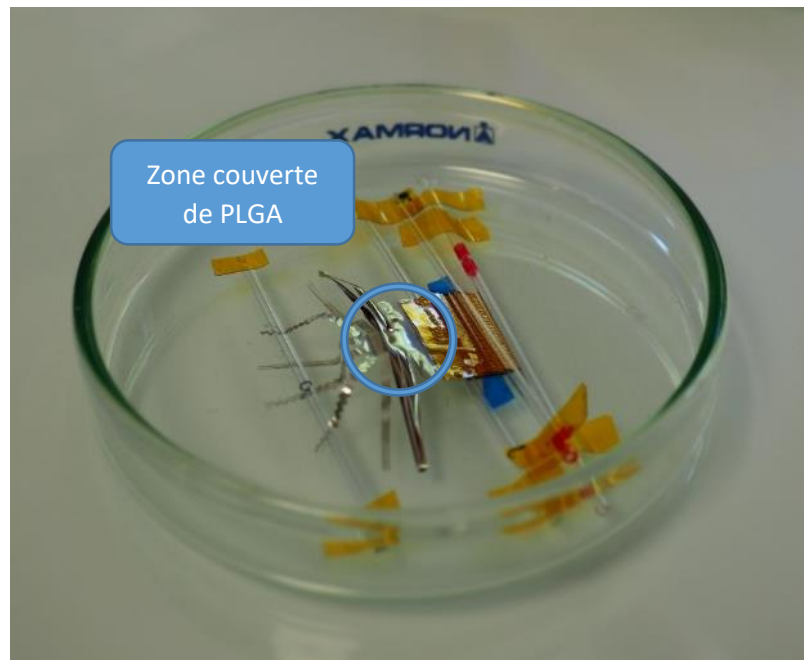


Figure 66 : Montage pour autoclaver l'implant recouvert de PLGA

## 2.4 Caractérisation des implants

Une fois les implants réalisés, leurs performances doivent être testées. Les principaux critères caractérisant les implants sont l'impédance des électrodes, le bruit des électrodes, la voltétrie cyclique ainsi que l'isolation des pistes métalliques.

### 2.4.1 Test de la passivation

Suite à une vérification visuelle de l'implant il semble qu'aucune piste ne soit interconnectée. Pour observer une éventuelle délamination de la SU-8, un montage a été réalisé. Les électrodes de l'implant ont été placées dans du PBS. Une contre électrode en Ag/AgCl est également placée dans la solution afin de fermer le circuit et est connectée à la borne négative du stimulateur MCS (STG4008). Une fiche banane est placée sur le pad de l'implant (comme la fiche banane est plus large qu'un contact de l'implant, plusieurs contacts sont touchés simultanément) et est connectée à la borne positive stimulateur MCS (STG4008).

Des impulsions de 2 volts de 100 millisecondes ont été envoyées sur les différentes électrodes. Ces impulsions conduisent à l'hydrolyse de l'eau et la formation de bulles sur les surfaces métalliques en contact avec l'eau. Ainsi si les bulles ne se forment qu'au niveau des électrodes alors on pourra estimer que l'isolant est en bon état. En revanche toutes les bulles se formant le long des fils prouveront la présence d'ouvertures dans l'isolant.

La manipulation a été réalisée sur les fils de différentes largeurs. On observe des bulles uniquement sur les électrodes pour les fils de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre comme on peut le voir sur la figure 67.

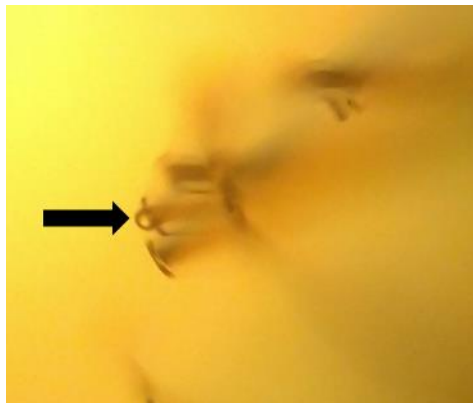


Figure 67 : Formation d'une bulle (flèche noire) suite à l'hydrolyse de l'eau au niveau de l'électrode d'un fil de 50  $\mu\text{m}$  de largeur

En revanche des bulles sont observables le long des fils de 20 et 11  $\mu\text{m}$  de large. La formation des bulles se fait en deux temps. Dans un premier temps, lors des premières impulsions, elles sont très localisées à 2-3 endroits le long des fils. Après 5-6 impulsions, les bulles sont moins localisées et se forment tout le long du fil (voir figure 68).

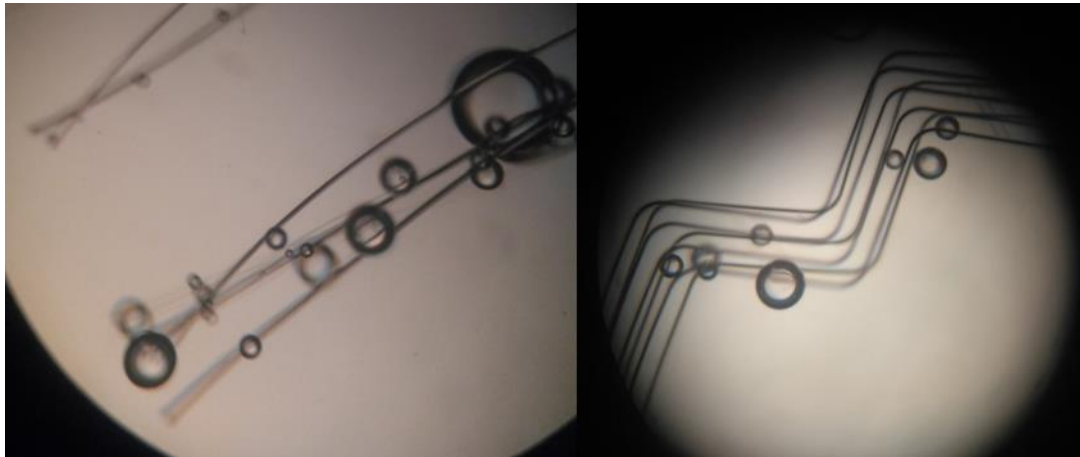


Figure 68 : Formation de bulles le long des fils de 11  $\mu\text{m}$  de large de l'implant suite à la stimulation. A gauche : résultats après 5-6 impulsions. A droite : résultats après 2-3 impulsions

Les bulles montrent donc des ouvertures au niveau de l'isolant sur les fils de faibles largeurs (20 et 11  $\mu\text{m}$ ). Ces ouvertures peuvent être dues à la dégradation des fils lors de manipulations. Les impulsions de 2 volts ont été précédées d'impulsions de 1 volt et moins pour lesquelles aucune bulle n'a pu être observée.

## 2.4.2 Impédance

### 2.4.2.1 Mesure avec SP-200

L'impédance des implants est testée avec un SP-200. Il utilise des courants de test extrêmement faibles pour réaliser une spectroscopie d'impédance des électrodes. Le montage est composé du SP-200, de pointes de mesures (200  $\mu\text{m}$ ), d'une cuve remplie de PBS et de l'implant (figure 69a).

Les impédances ont été mesurées sur deux configurations : l'implant seul avec la pointe directement sur le pad de contact (figure 69b) ou via le cicor une fois celui-ci connecté à l'implant.

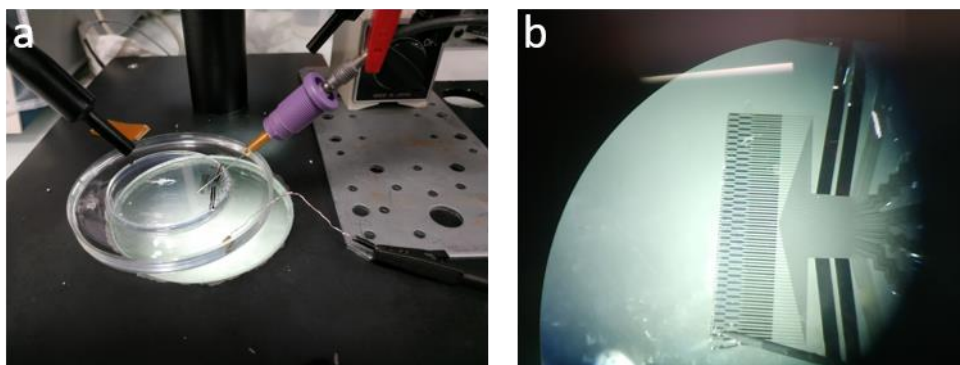


Figure 69 : a) Montage pour mesure d'impédance, pointe de mesure sur le pad de l'implant. b) Détérioration de l'implant suite au contact avec la pointe

Nous avons réalisé les mesures sur 5 implants distincts. Le système nous donne des résultats très variables d'un implant à l'autre. Quatre implants étaient connectés à un cicor. Lors des mesures sur l'implant seul (non connecté au cicor), la pointe détériore le pad de connexion de l'implant (figure 69b). Suite au résultats du paragraphe 2.4.1, les impédances mesurées sur l'implant non connecté ont

été mesurées seulement sur les fils de 50  $\mu\text{m}$  de large afin de s'assurer de la bonne passivation des pistes.

Cependant les résultats préliminaires obtenus sur cet implant ont donné des impédances de l'ordre de 710 kOhm pour les électrodes de 15  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les impédances obtenues pour nos électrodes de 15  $\mu\text{m}$  de diamètre sur les implants avec cicor sont comprises entre 464 et 3900 kOhm et sont en moyenne de 1823 kOhm (sur 39 électrodes). Les 10 meilleures électrodes ont une moyenne de 810 kOhm.

#### 2.4.2.2 Mesure avec système Intan

Les impédances ont également été mesurées sur 8 implants connectés au cicor grâce au système Intan et la carte PCB utilisée pour les bruits (voir 2.4.3 et figure 70).



Figure 70 : Carte PCB avec module de l'Intan

Les résultats obtenus sur chaque implant sont très variables (voir tableau 3). En effet, 3 implants (60-6, 60-4, 60-3) ont des impédances relativement basses en comparaison avec la littérature. Leurs impédances sont autour de 1,5 MOhm alors que le platine plat de 16  $\mu\text{m}$  de diamètre devrait être autour de 1,8 MOhm (Heim et al. 2012). Aussi, 5 autres implants ont des impédances assez loin des valeurs attendues (supérieures à 3-4 MOhm).

	Implants							
Impédance (kOhm)	60-6	60-5	60-4	60-3	60-2	60-1	59-4	59-1
Moyenne	1472	3506	1538	1531	4582	5019	8450	6212
Mediane	931	3305	983	964	4125	5335	8555	7185
ecartype	1828	1098	1443	1344	1832	1854	1765	3273

Tableau 3 : Impédances des différents implants

### 2.4.3 Bruit

Le bruit ainsi que les signaux corticaux enregistrés par chaque électrode sont recueillis grâce à un système sans fil Multi Channel System (MCS). L'implant est connecté via le cicor à une carte PCB. Sur cette carte le ZIF est connecté à deux connecteurs Omnetics permettant aux têtes MCS sans fil de venir se brancher.

#### 2.4.3.1 Carte PCB

La carte PCB (dont le routage a été réalisé par Jean Marie Mayaudon) a une taille optimisée de 18 x 28 millimètres étant donné que celle-ci sera aussi utilisée pour l'enregistrement in vivo chez les rats (figure 71).

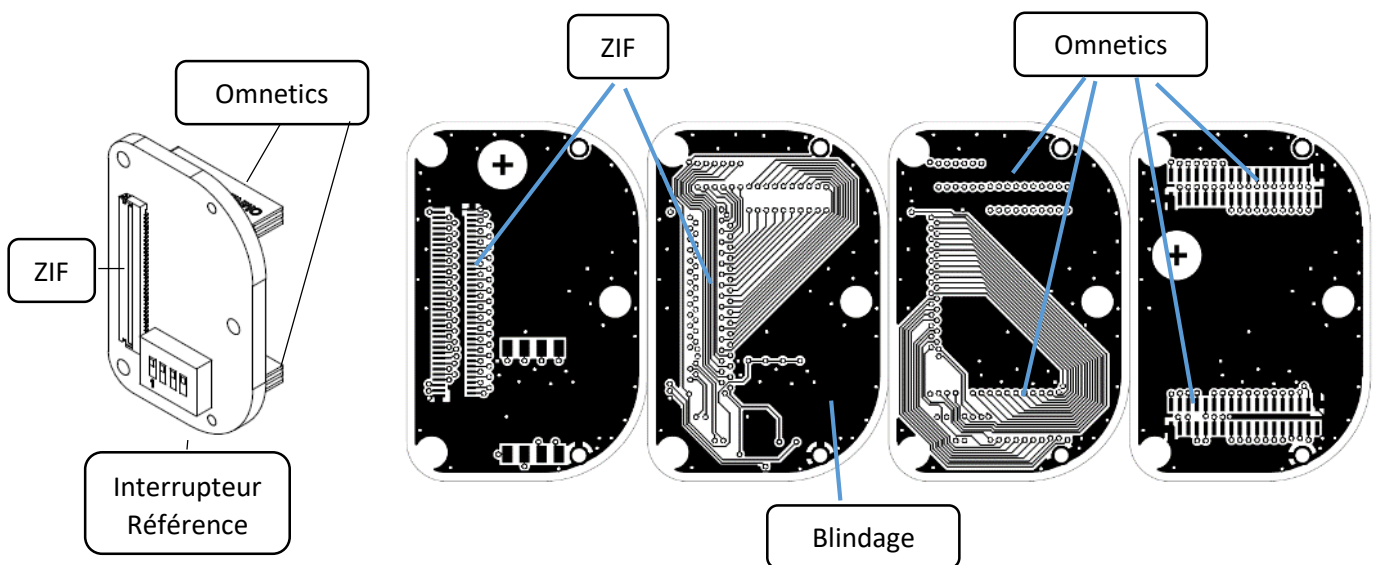


Figure 71 : Carte PCB de petite taille. A droite : modèle 3D. A gauche : vues des différentes couches de la carte

On peut observer sur la carte un interrupteur permettant de choisir quelle référence est utilisée parmi quatre références de l'implant ou d'interconnecter les différentes références. Les références dans l'implant ZIF version 2 sont un tentacule avec une électrode de 1 mm et 3 électrodes de 15  $\mu\text{m}$  de diamètre parmi les 11 électrodes au bout des fils de 50  $\mu\text{m}$  de large). Sur chacune des couches de la carte PCB, un blindage est intégré afin de réduire l'influence des bruits extérieurs sur les signaux durant le transfert.

#### 2.4.3.2 Head stage et système d'enregistrement

Amplifier le signal neuronal enregistré par les électrodes est très important car l'amplitude du signal est de l'ordre du  $\mu\text{V}$ . L'un des grands avantages de l'électronique embarquée est la capacité d'amplifier le signal le plus proche de sa source. Cela permet d'éviter que le signal soit pollué par des perturbations externes comme les radiations électromagnétiques.



Les pré-amplificateurs (headstages) sans fils (figure 72) peuvent enregistrer 32 canaux. Les signaux sont digitalisés et envoyés au récepteur. Le headstage permet d'enregistrer entre 1 Hz et 5 KHz avec un bruit d'entrée RMS inférieur à 1.9  $\mu$ V.

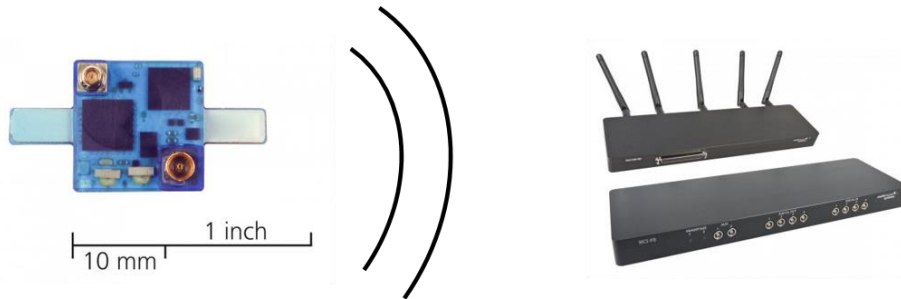


Figure 72 : Headstage MCS et station d'enregistrement

Pour une qualité de signal optimale dans les expériences in vivo, il est nécessaire de fournir une bonne mise à la terre (GND) et une électrode de référence (REF) bien placée. Par conséquent, toutes les têtes du système Wireless2100 sont équipées de broches dédiées pour une masse et une électrode de référence (figure 73).



Figure 73 : connecteur de l'Omnetics

L'électrode de référence est utilisée pour mesurer les différences de potentiel relatives par rapport aux électrodes d'enregistrement. L'implant comprend 2 références distinctes. La référence est idéalement placée à proximité des électrodes d'enregistrement, mais pas dans le tissu cortical pour ne pas enregistrer de signaux elle-même. La différence de potentiel entre l'électrode et la référence est amplifiée et numérisée.

Pour s'assurer que l'animal et le headstage ont le même potentiel électrique de référence, une connexion à la terre est également nécessaire (figure 74). Le pin de la masse est donc relié à une vis insérée dans l'os du crâne. L'électrode de masse est utilisée comme référentiel de l'alimentation des amplificateurs et est en général dotée d'une grande surface.

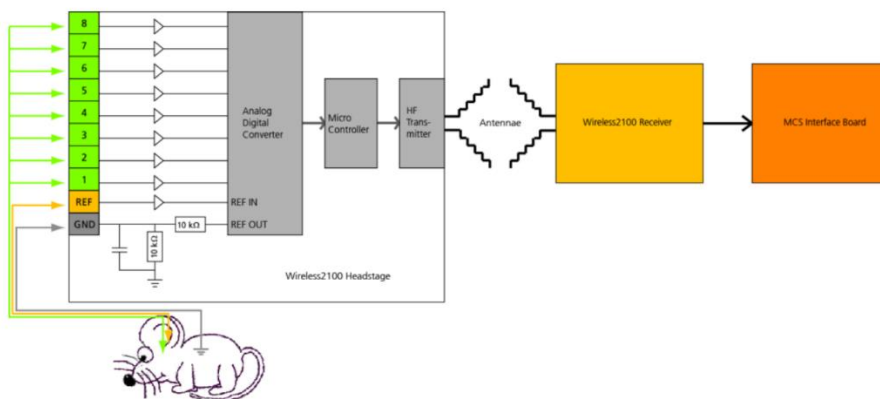


Figure 74 : Exemple de montage des headstages pour 8 électrodes

### 2.4.3.3 Montage pratique pour les mesures de bruit

La figure 75 montre le montage complet pour l'enregistrement du bruit. On aperçoit la batterie connectée à la tête sans fils qui est connectée à la carte PCB (carte plus grande ici mais avec la même connectique) qui est connectée à l'implant. L'implant est immergé dans une solution PBS.

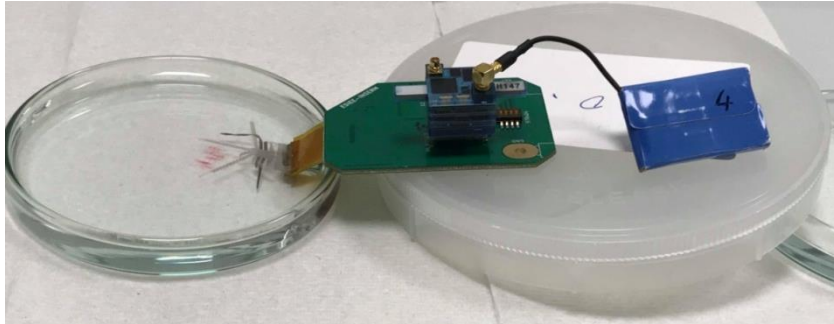


Figure 75 : Montage pour les mesures de bruit

Le logiciel utilisé pour traiter les données est Multi Channel experimenter. Ce logiciel permet de filtrer les données.

Les bruits ont été filtrés (Butterworth passe haut d'ordre 6 à 400 Hz) et analysés avec le logiciel spike2 (version 8.1.10). Les bruits RMS ont été réalisés avec l'outil présent dans spike2. Le bruit RMS a été calculé sur un enregistrement de 20 secondes pour chaque implant.

### 2.4.3.4 Bruit des électrodes

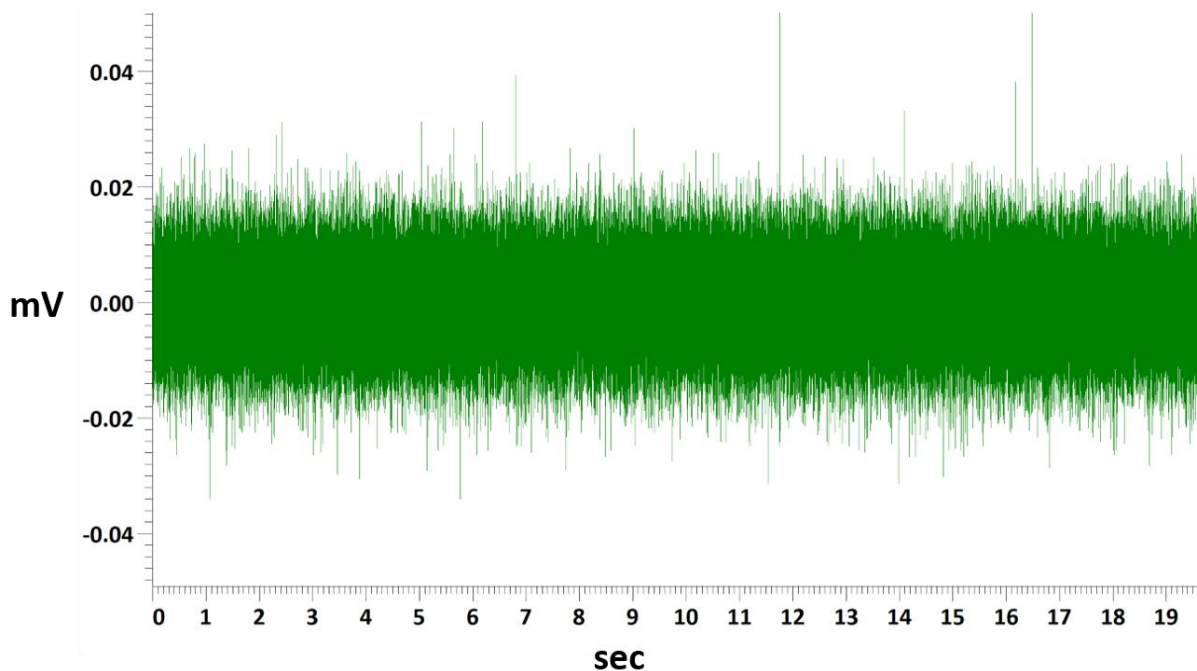


Figure 76 : Bruit d'une électrode de 15 µm de diamètre de platine après filtrage (passe haut 400 Hz ordre 6)

Les bruits RMS (figure 76) sont globalement en adéquation avec les impédances comme on peut le voir sur la figure 77. Plus le bruit est important plus l'impédance est importante. Les bruits RMS obtenus

avec les 3 meilleurs implants sont compris entre 8,48  $\mu\text{V}$  et 25  $\mu\text{V}$  (tableau 4). Les valeurs obtenues avec des électrodes de platine plat de 16  $\mu\text{m}$  de diamètre se situent autour de 7  $\mu\text{V}$  (Heim et al. 2012). Les valeurs obtenues avec les différents implants semblent donc un peu élevées (excepté l'implant 60-6 avec 8  $\mu\text{V}$  de bruit RMS). Les valeurs d'impédance des meilleurs implants laissaient espérer des bruits plus faibles. En effet, nos valeurs d'impédances étaient plus faibles que les valeurs données par Heim et al, or nos valeurs de bruits sont plus importantes. Cela pourrait donc provenir de la connectique entre l'implant et le cicor.

	Implants							
Bruit ( $\mu\text{V}$ )	60-6	60-5	60-4	60-3	60-2	60-1	59-4	59-1
Moyenne	10,31	25,29	28,85	23,30	29,67	105,41	62,87	86,62
Mediane	8,48	25,24	25,32	17,01	30,13	109,17	35,97	72,08
ecartype	5,15	6,33	9,79	39,83	8,42	27,66	61,82	49,00

Tableau 4 : bruits RMS des différents implants

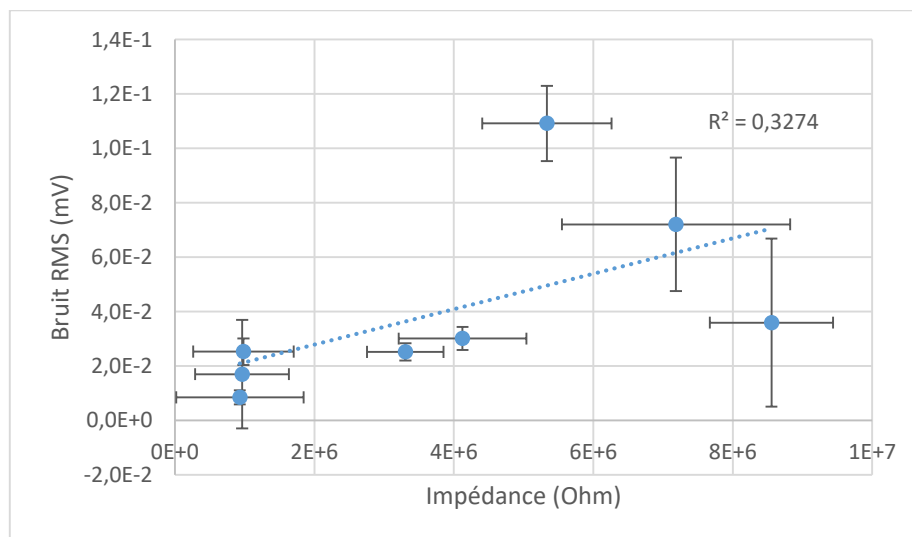


Figure 77 : Correspondance entre la moyenne des impédances et la moyenne des bruits pour chaque implant

Sur la figure 78 nous pouvons observer pour 2 implants l'alignement entre le cicor et l'implant. Aucune différence n'est vraiment observable entre certains implants ayant des impédances et des bruits différents. Entre le 60-5 et le 60-3, l'alignement semble être similaire avec un côté bien aligné et un autre où les écarts semblent plus prononcés. Or les impédances sont bien différentes.



Figure 78 : Photos de la connexion implant/cicor. En haut : Mauvaise connexion (impédance élevée) En bas : Bonne connexion (impédance faible)

#### 2.4.4 Voltamétrie cyclique (CV)

La caractérisation électrochimique de nos implants a été réalisée par voltamétrie cyclique pour 10 électrodes. La fenêtre de potentiel utilisée est celle du platine (-0,6-0,8V). La figure 79 montre la CV de 5 électrodes situées au bout de fils de 50  $\mu\text{m}$  de large.

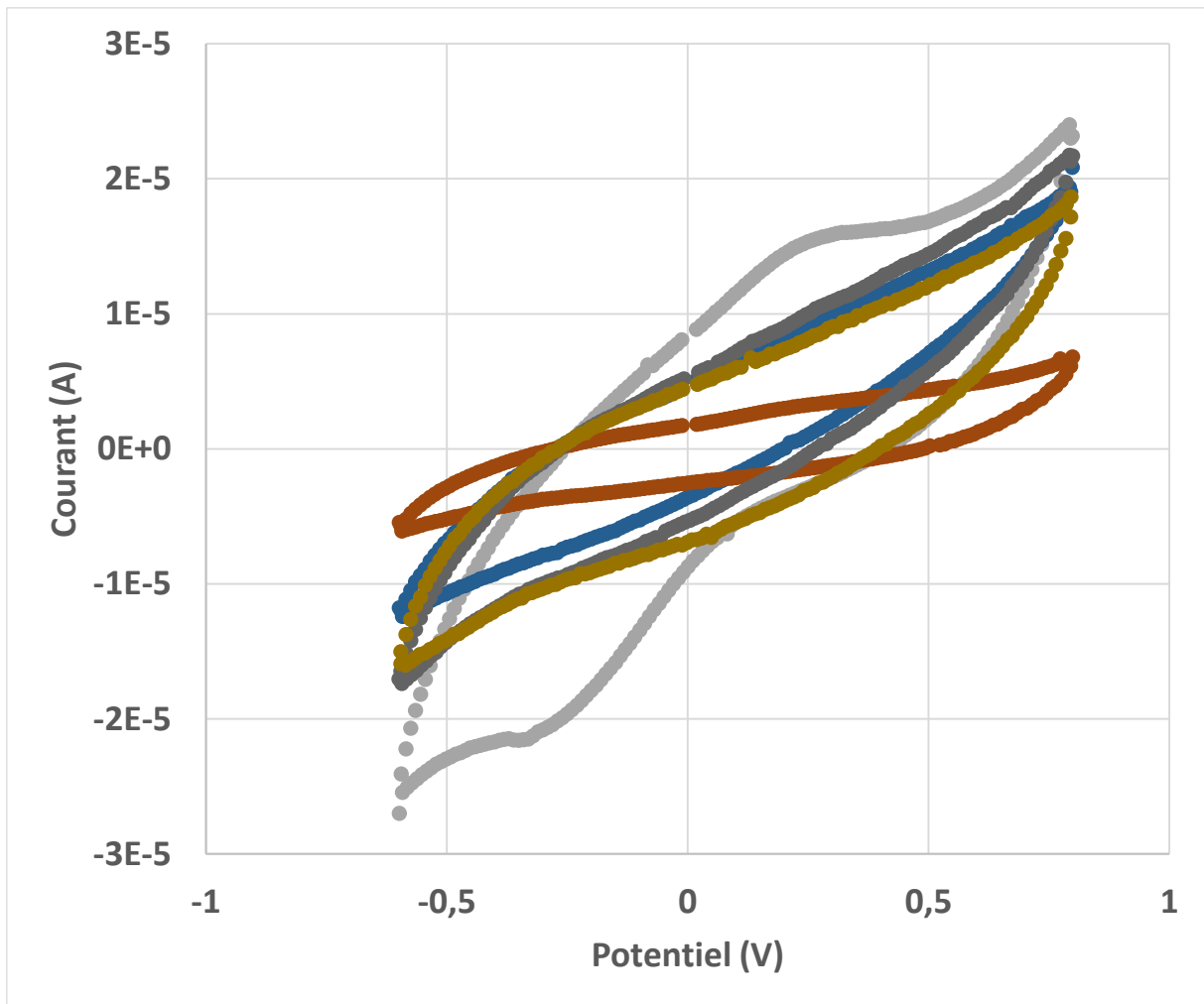


Figure 79 : CV de 5 électrodes situées au bout de fils de 50 µm de large

Les résultats obtenus par voltamétrie cyclique ont été comparés avec ceux obtenus pour des microélectrodes sur substrat rigide dont nous disposons au laboratoire (paragraphe 4). La figure 80 montre la voltamétrie cyclique (voir 4.2.2) réalisée sur 4 matériaux différents avec des diamètres pour chaque électrode testée différents. Le PEDOT (diamètre 30µm), le platine poreux (diamètre 20µm), le platine plat (diamètre 20µm), ainsi que le platine (qui est nanostructuré) de nos électrodes (diamètre 15µm) ont été caractérisés. La mesure de CV sur nos électrodes a été réalisée sur un implant connecté au cicor (implant 60-3), les électrodes étant situées sur le tentacule comportant les fils de 50 µm de diamètre. On observe que notre électrode qui a un diamètre moindre que l'électrode en platine plat, a un cycle avec une aire plus importante. Nos électrodes semblent avoir une capacité à stocker les charges qui est comprise entre celle du platine plat et celle du platine poreux.

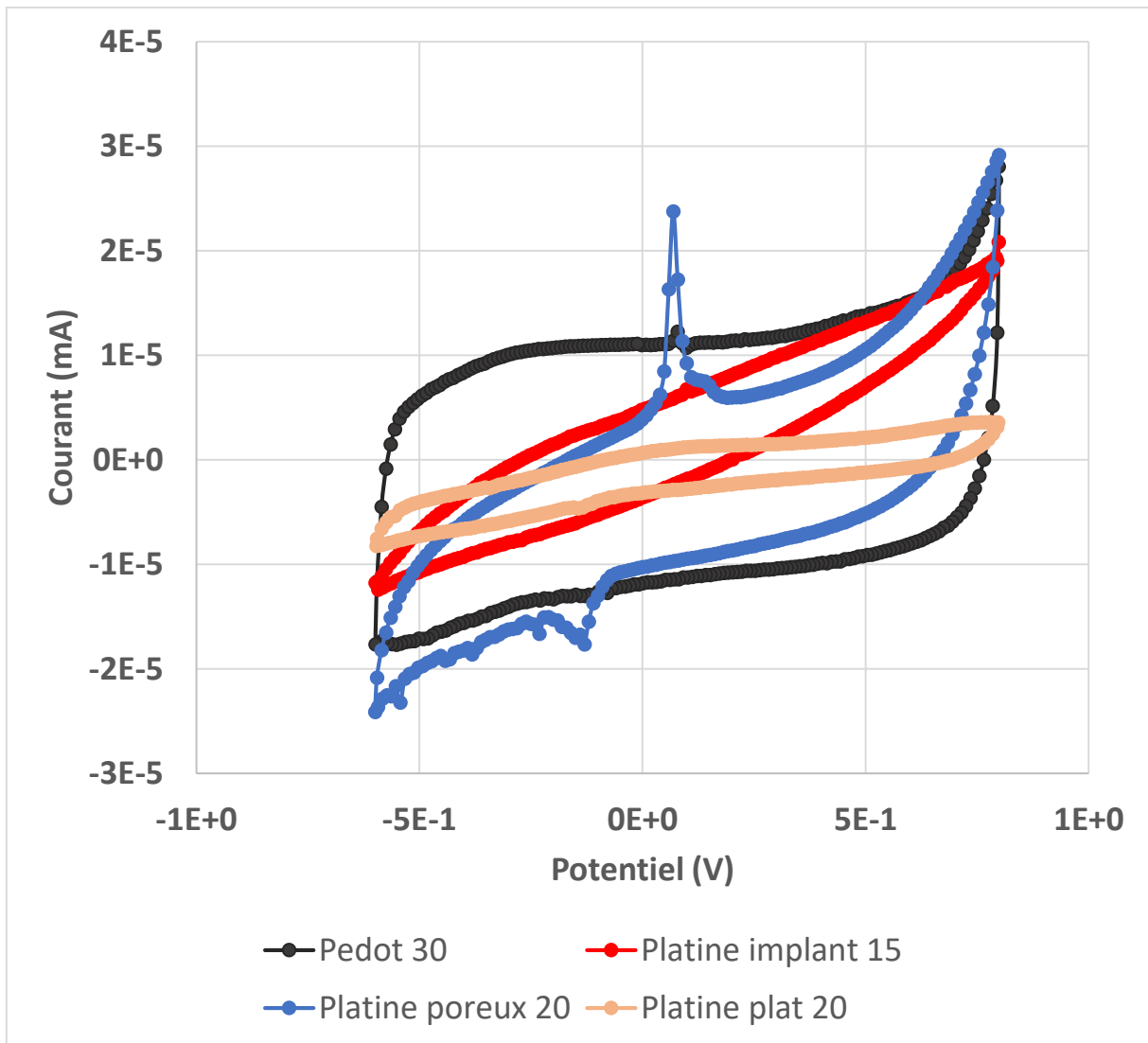


Figure 80 : Voltamétrie cyclique (100 mV/s) de 4 électrodes différentes

## 2.5 Perspectives

- Géométrie des implants

Lors de prochains enregistrements sur animaux, nous espérons que la géométrie actuelle de l'implant permette d'analyser l'influence de la taille et de la forme (droite ou ondulée) des fils sur la stabilité des signaux sur le moyen et le long terme. On a cependant pu constater que les fils de 11  $\mu\text{m}$  de large étaient relativement fragiles. En effet, lors de la manipulation des implants et de la mise en place des fils sur un véhicule de transport (voir 3.1.3), il est assez fréquent d'observer la détérioration de ces fils. Les fils de 20 et 50  $\mu\text{m}$  sont en revanche plus résistants. Nous allons observer si les fils seront toujours aussi fragiles en remplaçant la SU-8 par du polyimide qui est plus résistant.

La géométrie du connecteur de l'implant est aussi susceptible d'évoluer. En effet, la géométrie ZIF actuellement utilisée est fonctionnelle mais une distance de séparation plus importante des pads de contacts entre eux permettrait de limiter les risques d'interconnexion. De plus, les phases d'alignement entre le Cicor et l'implant seraient beaucoup plus rapides.

- Matériaux utilisés

La SU-8 est un matériau facile à utiliser mais sa fragilité en fait un matériau difficile à manipuler. Dans la cadre d'une collaboration avec l'ESIEE (projet ANR Neuromeddle), nous allons réaliser des implants en polyimide afin de pouvoir comparer la résistance mécanique des deux polymères. De plus, tous les tests de caractérisation seront aussi effectués sur les nouveaux implants en polyimide.

De nouveaux matériaux pourront être déposés sur l'électrode, dont la couche en contact avec le tissu est actuellement réalisée en platine. Des matériaux comme le PEDOT ou le diamant nanostructuré ont de très bonnes impédances (voir chapitre 4).

- Etapes de fabrication

Lors de la fabrication des implants de nombreuses étapes ont été optimisées mais il reste cependant quelques points à améliorer.

Les électrodes réalisées ont un diamètre de 15  $\mu\text{m}$ . Si on souhaite obtenir des diamètres de 20  $\mu\text{m}$ , une solution pourrait être de changer des paramètres lors de la fabrication. Le temps d'exposition au UV lors de lithographie pourrait être diminué. Lorsque le temps d'exposition est trop élevé, les UV peuvent se propager dans les régions masquées et faire polymériser la SU-8 au niveau de l'ouverture. Une autre possibilité pourrait être d'augmenter le temps de développement de la SU-8 dans le mr-dev 600. Ces méthodes seront testées afin d'augmenter le diamètre des électrodes.

Lors de la formation des nanostructures, l'EDX avait montré des traces d'aluminium au niveau des nanostructures qui devraient être constituées entièrement de platine. Une analyse plus poussée au microscope électronique en transmission (TEM) permettrait d'observer le taux d'occupation de l'aluminium. En effet, savoir si l'aluminium n'est présent qu'à la surface des nanostructures ou à l'intérieur pourrait nous aider à comprendre et à enlever l'aluminium qui peut être toxique. Une autre solution sera de tester d'autres matériaux pour réaliser le masque métallique permettant de réaliser la forme de l'implant.

- Caractérisation des implants

Lors des tests de passivation, seul les fils de 50  $\mu\text{m}$  ont montré une bonne tenue mécanique. Les impulsions de 2 volts étaient peut-être trop puissantes et ont engendré la détérioration de l'implant sur les fils de 11 et 20  $\mu\text{m}$ . D'autres manipulations similaires devront être réalisées avec de nouveaux implants afin de vérifier ces résultats.

Les mesures d'impédances ont montré une grande variabilité des résultats. Heim et al ont obtenu 2200 KOhm avec des électrodes de platine de 12  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les faibles impédances (autour de 710 KOhm) obtenues lors de la mesure sur l'implant seul peuvent être la conséquence des nanostructures ou des défauts d'isolation (même si les mesures ont été réalisées sur les fils de 50  $\mu\text{m}$ ). Un grand nombre d'électrodes (80%) sur les implants connectés avec un Cicor ont des impédances supérieures à 5000 KOhms ce qui est très élevé. Cette disparité des résultats peut provenir de différents paramètres. La position de la pointe lors de la mesure d'impédance influence la valeur de l'impédance. De plus, les nanostructures observables sur les différentes électrodes peuvent être de tailles et de formes variables ce qui joue sur la valeur des impédances. Pour finir, la connexion entre le cicor et l'implant est aussi un facteur pouvant modifier les impédances. Si lors de la connexion un décalage trop important est présent entre le cicor et l'implant alors certaines pistes peuvent être interconnectées ou mal connectées.

Les bruits lors des enregistrements sont plus importants que les bruits obtenus dans la littérature (10-30  $\mu$ V contre 7  $\mu$ V). Ces bruits élevés peuvent être la conséquence des micro mouvements de l'implant (électrodes flottantes) pendant la manipulation. Une impédance élevée au niveau de la connexion implant/Cicor peut aussi être une source de bruit. Ces hypothèses devront être vérifiées en améliorant la connectique implant/Cicor, ou en réalisant des mesures de bruit sur des implants non décollés du wafer silicium.

La raison la plus plausible de ces valeurs d'impédances et de bruits très variables est la connectique entre le Cicor et les implants. En effet, 6 des implants testés proviennent du même wafer, seule la connectique est différente et réalisée sur chaque implant indépendamment des autres. Les différents paramètres influençant la qualité de la connexion entre le cicor et l'implant sont la qualité de l'ACF, la montée en température de l'ACF lors du soudage, la pression exercée par la thermopresse lors de la soudure et l'alignement entre les pistes de l'implant et les pistes du cicor.

L'alignement entre l'implant et le cicor est différent pour chaque implant. L'alignement était réalisé sans point de repère précis (figure 81). Il dépend ainsi du ressenti et de la dextérité de l'opérateur (erreur de positionnement de l'ordre de 30  $\mu$ m).

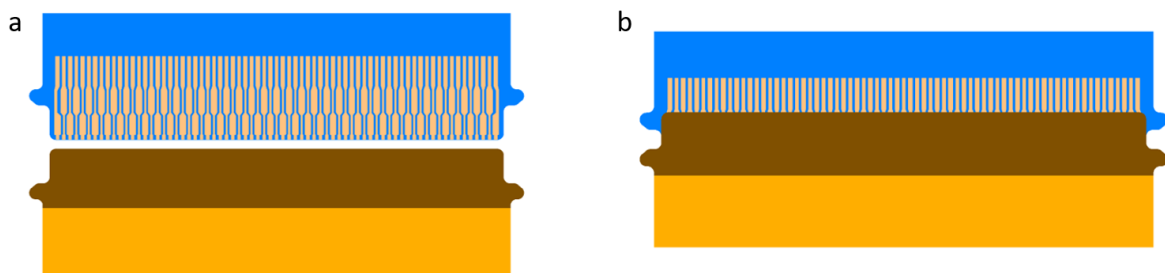


Figure 81 : Vue de dessus de la connexion implant/cicor a : pad de l'implant en bleu et pad du cicor (les contacts sont sur la face opposée) en jaune et marron. Les deux éléments ne sont pas alignés. b : Alignement parfait de l'ensemble implant/cicor réalisé grâce aux « oreilles » servant de points de repère situés sur les bords.

Bien que la température et la pression soient des paramètres rentrés dans la machine et donc identiques lors du soudage de chaque implant, la montée en température et la pression exercée au niveau de la connexion sont dépendantes du montage réalisé au niveau de la connexion. Un film de Téflon est déposé une fois l'ensemble Cicor/implant aligné. Un repli au niveau du film peu influencer le niveau de pression et la répartition de la température sur la connexion lors du thermopressage (figure 82b). L'alignement de la thermopresse avec la zone à connecter est aussi variable pour chaque implant. Il est important de bien aligner les deux car la tête (zone de la thermopresse en contact avec l'ensemble implant/Cicor) de la thermopresse n'est que très légèrement plus large que la zone à connecter (figure 82). Un mauvais alignement machine/zone de connexion conjugué avec la surépaisseur de 200  $\mu$ m du renfort sur le cicor peut entraîner un glissement du cicor sur l'implant et ainsi initier le désalignement de l'ensemble cicor/implant et un mauvais soudage cicor/implant (figure 82b).



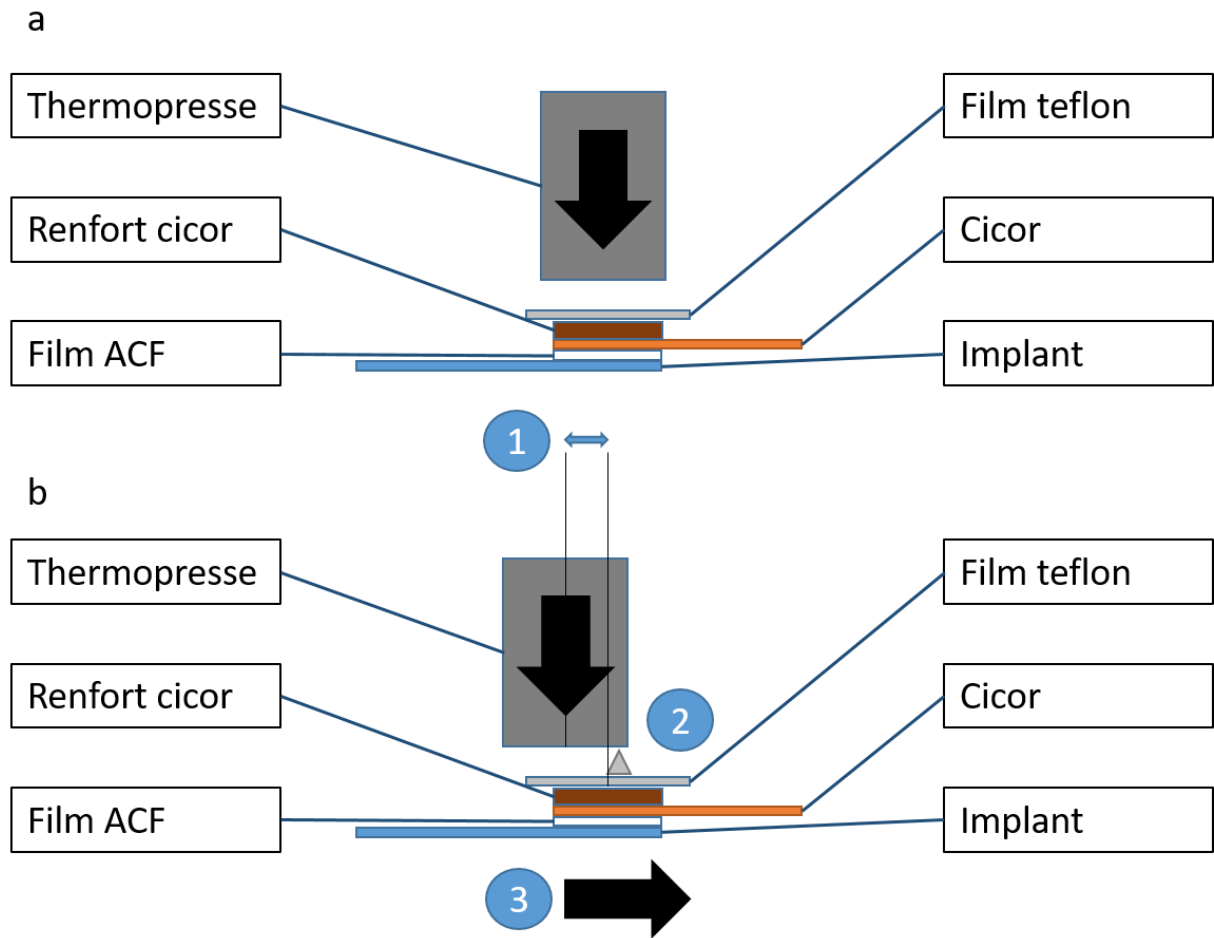


Figure 82 : Vue de côté du montage lors du soudage de l'ensemble implant/cicor. a : Montage idéal b : Montage comportant les problèmes rencontrés. 1 : décalage entre la machine et la zone de connexion. 2 : Repli en relief au niveau du film en Téflon. 3 : glissement du cicor lors de la mise sous pression.

Pour régler une partie de ces problèmes de nouveaux cicors vont être réalisés sans renfort. Cela devrait permettre d'éviter tout glissement et d'améliorer la montée en température. Les implants ont été connectés avant décollement directement sur le wafer en silicium. Or d'une part, le silicium conduit la chaleur ce qui ne permet pas une montée en température idéale au niveau de la connexion. D'autre part, le silicium ne permettait pas l'utilisation du rétro-éclairage (éclairage situé sous l'implant) afin d'aligner correctement l'implant et le Cicor. L'objectif sera donc de décoller les implants du wafer et de les placer sur une feuille en plastique transparente. Dans cette configuration il sera alors possible d'aligner au mieux l'implant et le Cicor ainsi que d'optimiser la montée en température de l'ACF.

# Chapitre 3 :

## Méthode d'insertion de l'implant, enregistrements in vivo et mise en place du protocole pour l'analyse de la biocompatibilité de l'implant

Dans cette partie les différentes méthodes d'implantation étudiées sont présentées. Les 3 méthodes testées sont l'insertion magnétique, l'insertion à l'aide du PLGA ainsi que l'insertion grâce à un véhicule de transport. Une partie sur les signaux enregistrés in vivo décrit les enregistrements obtenus sur différents rats. Enfin, des premiers résultats de biocompatibilité sont aussi exposés.

### 3 Méthode d'insertion de l'implant, enregistrements in vivo et mise en place du protocole pour l'analyse de la biocompatibilité de l'implant.

#### 3.1 Méthode d'insertion de l'implant

Différentes méthodes d'insertion sont testées afin d'implanter les électrodes à 2 mm de profondeur dans le cortex. Trois solutions ont été testées. Une première technique magnétique non concluante et deux autres techniques plus « classiques » avec l'utilisation d'un véhicule de transport et l'utilisation d'une pointe biodégradable en PLGA.

##### 3.1.1 Insertion magnétique

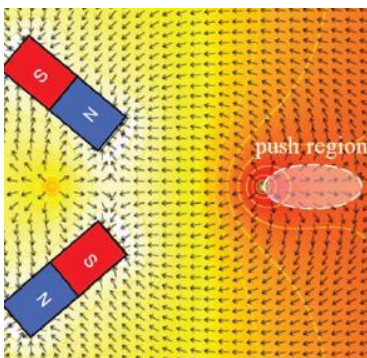


Figure 83 : Schéma de principe de la région de poussée (Shapiro et al. 2010)

L'objectif de l'insertion magnétique est l'insertion à distance des différentes électrodes grâce à un champ magnétique. Le système créé est basé sur les études menées par Shapiro et al (figure 83). Dans leurs travaux, Shapiro et al développent une technique pour délivrer des nanoparticules dans le fond de l'oreille. Pour cela ils utilisent deux aimants permanents. Bien que les aimants ne peuvent qu'attirer des matériaux ferromagnétiques, lorsque les deux aimants sont positionnés selon une certaine configuration, une zone de poussée est alors observable (figure 83).

Le but était donc d'utiliser ce principe afin d'insérer les électrodes. Un outil a été développé afin de créer cette région de poussée (figure 84). La stratégie était de placer sous chaque électrode une pastille de matériau ferromagnétique comme le Nickel Fer ou le cobalt fer. Ces pastilles devaient ensuite être poussées. Elles entraîneraient alors les fils avec elles dans le tissu cérébral grâce à l'outil conçu. L'outil est une sorte de stylet avec deux cavités pouvant recueillir les deux aimants (figure 84). Les aimants sont inclinés de 45° par rapport à la verticale.

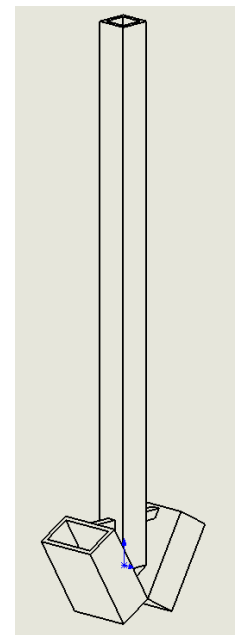


Figure 84 : "Stylet" permettant de pousser des particules métalliques

Les tests ont été réalisés sur des implants dit « fantômes », soit sans pistes or/platine mais où des disques de nickel/fer ont été créés par dépôt de métal puis photolithographie. Malheureusement, la force de poussée n'était pas assez importante pour permettre l'insertion des électrodes dans de l'agar à 0,6 % mimant les propriétés mécaniques du cerveau humain.

La taille des pastilles (20  $\mu\text{m}$ ) est trop faible pour obtenir une force de poussée suffisante. Des tests avec des morceaux de trombone (fil de 1 mm de diamètre et 1 cm de long) ont été effectués. Le stylet permettait l'insertion à distance dans l'agarose 0,6 % des morceaux de trombones qui étaient significativement plus gros que les pastilles ce qui permettait d'avoir une force magnétique beaucoup plus importante.

### 3.1.2 Insertion avec pointe biodégradable

- Réalisation des pointes

La deuxième option envisagée est l'insertion des fils d'électrodes une fois ceux-ci collés à une pointe rigide biodégradable (figure 85). Le matériau utilisé est le poly lactic-co-glycolic acid (PLGA). Ce matériau est déjà admis en clinique ce qui en fait une solution appréciable pour des applications cliniques. L'objectif est donc de créer des pointes en PLGA et de les coller au bout des fils d'électrode.

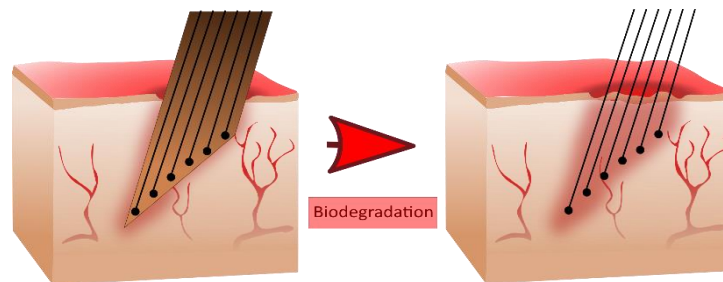


Figure 85 : Schéma de principe de l'insertion avec pointe biodégradable

Différentes solutions sont envisagées afin de concevoir les pointes PLGA. Le dépôt du PLGA est réalisé en phase liquide : 0,04 g de Resomer RG 504 H, Poly(S,L-lactide-co-glycolide) sont mélangés avec 750 ml d'acétone.

La dissolution du PLGA était effectuée en premier lieu dans le dichlorométhane. Or lorsqu'on souhaitait superposer plusieurs couches de PLGA afin d'obtenir une épaisseur assez importante autour de 75  $\mu\text{m}$  (une épaisseur trop faible n'est pas assez rigide pour pénétrer le tissu cérébrale), des bulles se formaient et rendaient le PLGA inutilisable. L'acétone a donc été choisi comme substitut et a montré de bons résultats.

Les pointes peuvent être réalisées avant le décollement des implants ou après. Dans le premier cas, des gouttes de PLGA en solution sont déposées sur les électrodes, l'ensemble est ensuite recuit 20 minutes à 65°C. Une fois le wafer refroidit, deux méthodes sont possibles pour découper les gouttes en pointes. La découpe peut se faire au scalpel manuellement ce qui n'est pas très précis. Une autre solution est l'utilisation de la découpe laser. Un laser vient graver le PLGA en suivant un motif de pointe dessiné au préalable dans un logiciel. Cependant, le wafer doit être placé très précisément à l'œil afin que le laser découpe les pointes autour des fils comme on peut le voir sur la figure 86. De plus, le laser chauffe le PLGA ce qui crée un bourrelet de PLGA sur les rebords des pointes.



Figure 86 : Pointe en PLGA avec fils de SU-8, découpée par découpe laser. Des fils de SU-8 sont englobés dans le PLGA (cercle noir)

Il est aussi possible de fabriquer les pointes PLGA à part puis ensuite de les déposer au bout des fils où sont positionnées les électrodes. Cette technique est réalisable avant et après décollement des implants du wafer. Pour que les pointes PLGA collent aux fils, les pointes doivent être chauffées à plus de 50°C (qui correspond à la température de fusion du PLGA) tout en étant en contact des fils. Lorsque les pointes reviennent à température ambiante elles restent collées aux fils.

Trois méthodes différentes ont été testées afin de réaliser les pointes PLGA (figure 87).

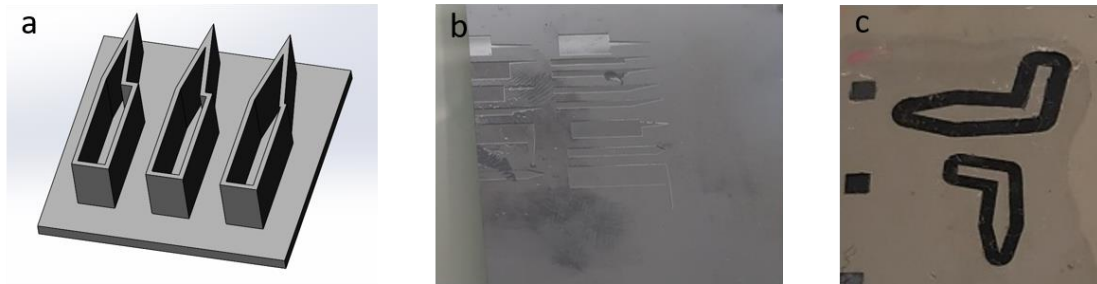


Figure 87 : a. Modèle 3D des moules utilisés pour couler le PLGA liquide. b. Moule avec des formes de pointe en silicium cassé suite au passage dans la DRIE c. Exemple de pointes PLGA découpées au laser.

La première méthode consiste à couler le PLGA dans des moules en forme de pointe. Différents types de moules ont été testés (figure 87). Les premiers moules ont été réalisés en polymère par impression 3D. Ces moules étaient en forme de pointe et d'une profondeur de 5 mm (figure 87a). Or lorsque le PLGA liquide était coulé à l'intérieur de ce moule, le PLGA ne se répartissait pas au fond du moule mais collait aux parois du moule et formait des « toiles d'araignées » dans le moule. Il était donc très difficile d'obtenir des pointes pleines et régulières avec cette méthode. Le polymère des moules peut aussi interagir chimiquement avec le solvant (acétone ou dichlorométhane) du PLGA liquide. De plus, le démoulage du PLGA est relativement difficile car le film de PLGA adhère très fortement au moule en polymère.

Dans le but d'améliorer le démoulage, nous avons essayé de réaliser des moules en PDMS avec les mêmes formes que la figure 87a. Pour cela un contre-moule en polymère a été réalisé en impression 3D sur lequel a été coulé le PDMS. Suite à la solidification du PDMS, il était alors impossible de séparer le moule en PDMS du contre moule en polymère.

Nous avons ensuite réalisé des moules moins profonds en silicium (figure 87b). Avec une hauteur plus faible le PLGA ne pourra pas faire de toiles d'araignées et un traitement au fluor sur le silicium permettra de pouvoir décoller plus facilement le PLGA du moule. Pour réaliser les moules en silicium, un wafer 4 pouces a été utilisé. Une couche de résine épaisse de 40 µm a été spin-coatée sur le wafer. Le wafer est ensuite chauffé 4 minutes à 200°C. Une machine de lithographie laser a ensuite permis de dessiner les pointes dans la résine. La résine a ensuite été placée dans un développeur (AZ développeur) pendant 5 minutes. Ce masque en résine permettra de graver le silicium par plasma. Comme nous désirons graver en profondeur (300 µm) le wafer (le wafer fait 400 µm d'épais) une résine épaisse était nécessaire. La gravure ionique réactive profonde (DRIE) (qui permet de réaliser des gravures sèches fonctionnant suivant le même principe que l'ICP) est alors utilisée pour graver le silicium. Or après avoir gravé 200 µm de silicium, le wafer casse dans la machine. Cela est dû au fait que le wafer devient plus fragile au fil du temps et au fait que le wafer est maintenu dans la machine en 4 points

qui représentent donc 4 points de contrainte importante. Des techniques comme coller un wafer faisant office de support ont été testées mais les résultats n'ont pas été concluants. Des morceaux de wafer ont cependant pu être récupérés et traités par un plasma au fluor. Du PLGA a alors été coulé dans ces moules de pointes mais du fait de la faible profondeur du moule il était difficile d'éviter de couler le PLGA liquide proprement dans les moules. De plus, le fluor n'a pas permis d'obtenir une surface facile à démouler.

L'utilisation de la gravure ICP (annexe 2) du PLGA pour réaliser les pointes PLGA a été testée. 10 couches de PLGA ont été superposées sur un wafer en silicium puis recuites 20 minutes à 65°C. Par la suite une couche de résine photosensible de 40 µm a été spin-coatée sur le wafer puis recuite et insolée par lithographie laser (annexe 2). Les formes insolées par lithographie laser étaient des pointes. Le développement de la résine était effectué dans le développeur de l'AZn-Lof. A la fin de cette étape, la couche de PLGA était recouverte de forme de pointe en résine servant de masque. Le wafer était ensuite placé 10 minutes dans l'ICP Oxford (annexe 2) afin de graver le PLGA non protégé. A la sortie de cette étape, aucune gravure distincte n'a été obtenue, les formes de pointes en résine avait disparu. L'hypothèse la plus probable quant à l'échec de la gravure est une montée en température trop important pendant la gravure, faisant fondre le PLGA (température de fusion à 50 °C). Les pointes en résine ont donc dû pénétrer dans le PLGA fondu.

La méthode la plus efficace pour réaliser des pointes en PLGA pour le moment reste donc l'utilisation de la découpe laser (figure 87c). Pour cela il faut utiliser un wafer recouvert d'une couche de titane et d'aluminium. Une couche sacrificielle est nécessaire afin de décoller les pointes après gravure. Plusieurs couches de PLGA sont ensuite coulées successivement sur le wafer (8 à 12 couches afin d'avoir une épaisseur comprise entre 60 et 100 µm). Des pointes sont ensuite gravées dans la couche de PLGA. Le décollement des pointes est alors réalisé avec la méthode utilisée pour décoller les implants.

- Implantation des pointes

Des pointes réalisées avec la méthode de découpe laser ont été implantées dans le cortex de rat avec succès (figure 88). Avant de couler le PLGA, des implants sans pistes métalliques ont été créés sur le wafer. Le PLGA a ensuite été coulé sur les fils, à l'extrémité des tentacules. Les pointes sont ensuite gravées au laser. Avec cette technique, les pointes sont déjà placés et collent bien aux tentacules.

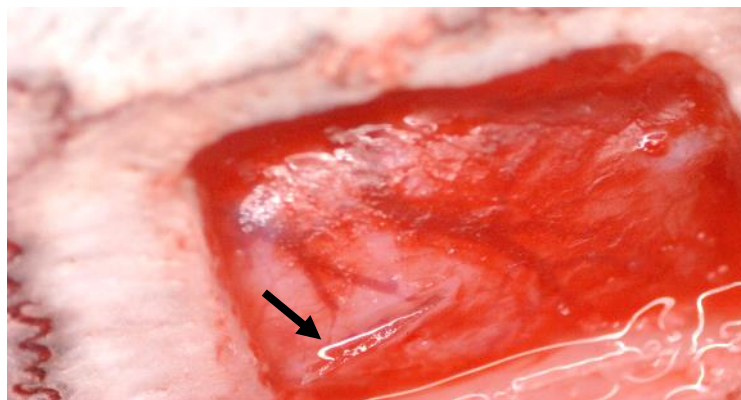


Figure 88 : Insertion de pointe PLGA dans le cortex de rat. La flèche indique le lieu de l'insertion

Cette méthode par encapsulation a l'avantage de ne pas avoir à implanter puis explanter un véhicule, ce qui peut endommager les fils d'électrodes. En revanche, la pointe PLGA permet de bien protéger les fils pendant leur insertion mais la taille importante de la pointe PLGA peut créer des réactions au niveau du tissu cortical.

### 3.1.3 Insertion avec véhicule de transport

La troisième solution consiste à utiliser un véhicule d'insertion. Nous avons choisi de coller de façon temporaire un fil d'acier inoxydable de 100 µm de diamètre au bout des fils de l'implants à l'aide de PEG (figure 89). Une fois inséré dans le cortex cérébral, le PEG se dissout ce qui désolidarise le fil d'acier des fils de l'implants. Le fil est ensuite retiré pour laisser les électrodes dans le tissu.

Le collage du fil d'acier aux fils de l'implant des électrodes se fait grâce à un fer à soudé à la température de 80 °C. L'avantage principal de cette méthode est le peu de dommage occasionné lors de l'implantation puisqu'on implante le fil de 100 µm de diamètre, ce qui est assez fin, et de plus le fil d'acier ne reste pas mais uniquement les fils de l'implant. De plus, les électrodes devraient être opérationnelles rapidement. Le désavantage est la mise en place des fils qui est délicate. Afin que l'insertion soit la plus efficace possible le bout du fil d'acier doit être collé le plus proche possible de l'extrémité des fils.

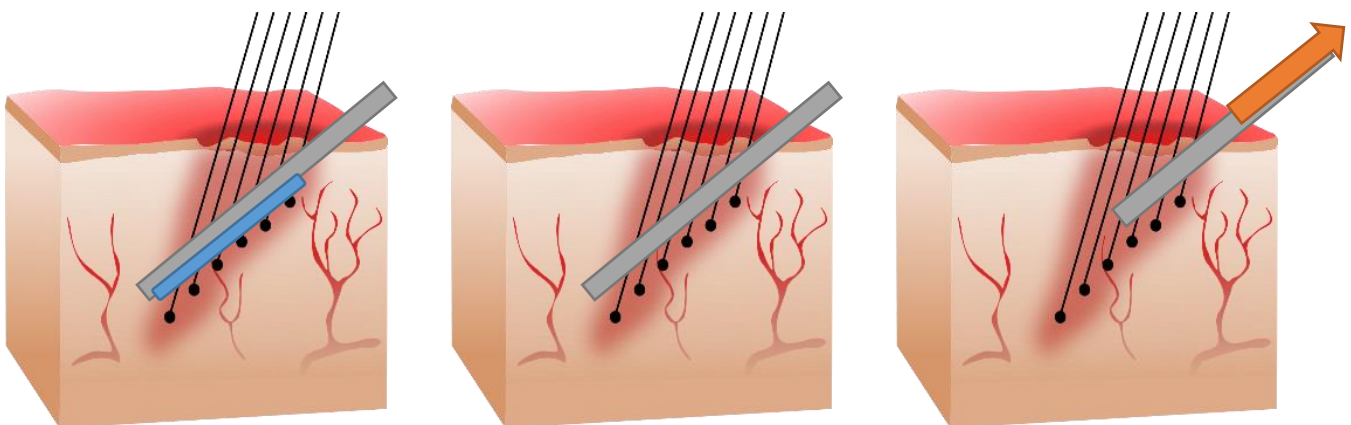
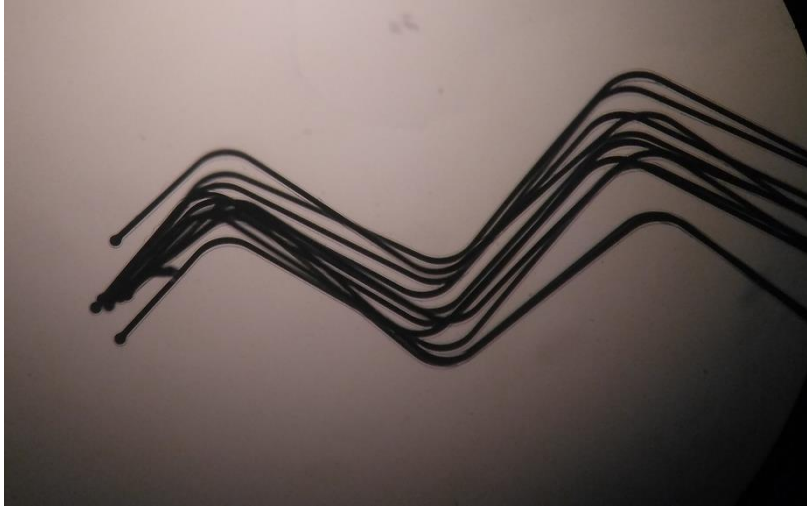


Figure 89 : Schéma de principe de l'insertion par utilisation d'un véhicule de transport

Afin de vérifier l'influence du PEG, qui est utilisé comme colle entre le véhicule de transport et les fils de l'implant, des fils ont été imprégnés de PEG puis placés dans du PBS afin de dissoudre le PEG.

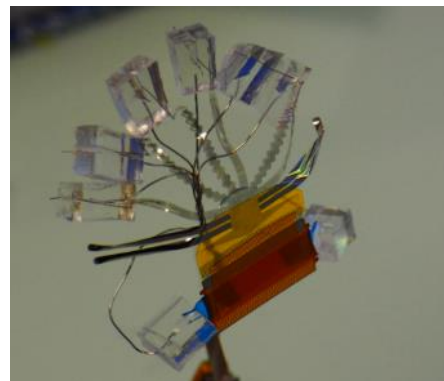
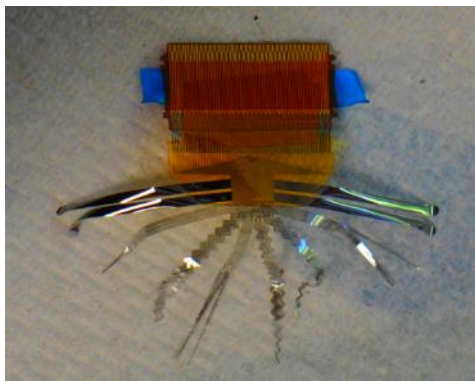
Les implants ont alors été observés au microscope pour visualiser divers dommages. La figure 90 montrent que le PEG n'engendre pas de dégradation observable au microscope au niveau des fils de l'implant. Les diverses manipulations de l'implant sont la principale raison de la casse des fils de l'implant.



*Figure 90 : Extrémité d'un tentacule avec 9 fils de 20 µm de largeur après dissolution du PEG*

Les différentes étapes de la chirurgie ont une importance primordiale pour assurer le bon fonctionnement des implants sur le long terme. Avant la chirurgie l'implant est autoclavé en utilisant un cycle à 121 °C. La chirurgie comprend l'anesthésie, la craniotomie, l'implantation et la fermeture du site de chirurgie (annexe 6). Elle a été réalisée par Fannie Darlot, post doc sur le projet BMI.

La phase d'implantation est très délicate. L'implant et le Cicor (connectés entre eux) sont positionnés dans un support sur mesure (figure 91).



*Figure 91 : A gauche : Implant connecté au cicor et renforcé au niveau de la jonction cicor/implant. A droite : Implant monté sur un support avec chaque tentacule collé à un fil d'acier.*



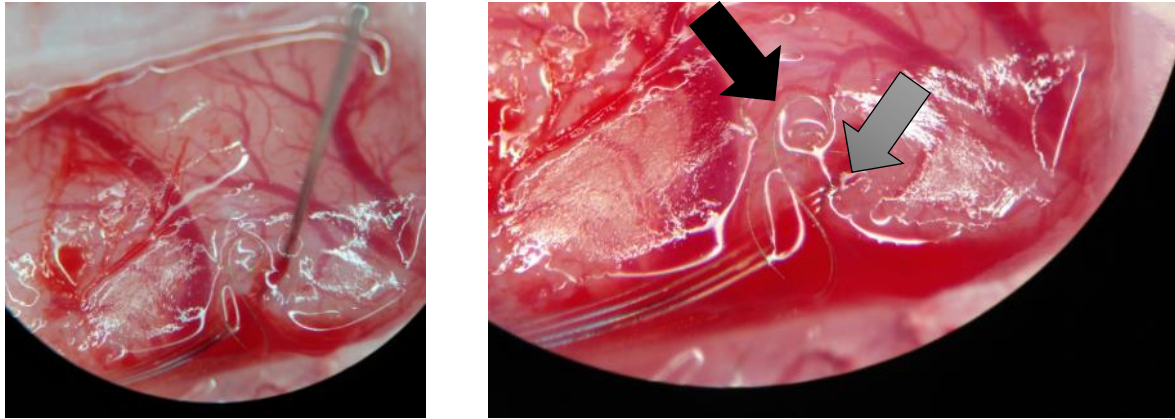


Figure 92 : A gauche : Implantation des fils avec le fil d'acier dans le cortex de rat. A droite : Position des fils après avoir retiré le fil d'acier, un fil est resté à la surface du cortex (flèche noire). Le site d'insertion est indiqué par une flèche grise

En effet, le CICOR est coincé dans des pinces en PDMS et chaque tentacule de l'implant est collé avec un fil qui est lui-même coincé dans une pince PDMS. L'ensemble est solidaire. L'implantation se fait tentacule par tentacule.

Une fois le tentacule inséré, 45 secondes sont nécessaires pour la dissolution du PEG avant de retirer le fil (figure 92). Pour réussir l'implantation, le bout du fil doit être collé au bout du tentacule. A chaque insertion il faut faire attention à ne pas tirer sur les tentacules déjà insérés. Toutes les insertions sont réalisées manuellement ce qui ne garantit pas l'implantation précise des électrodes dans le cortex à 2 mm de profondeur. Pour chaque implant, le nombre de tentacules correctement insérés a globalement augmenté (tableau 5), le montage étant de plus en plus optimisé. Puis lors des deux dernières implantations, l'insertion des tentacules n'a été possible qu'une fois car les tentacules se décollaient du fil d'implantation suite au vieillissement du PEG. Afin de s'assurer de la tenue des tentacules sur le fil d'implantation, la pose du PEG doit se faire peu de temps avant la chirurgie.

Tableau 5 : Nombre de tentacules sur l'implant (casse de certains tentacules) et nombre de tentacules insérés pour chaque rat implanté

Rat n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
nombre de tentacules	1	4	3	4	5	4	5	6	6	6	6	6
Nombre de tentacules implantés	1	2	0	0	1	4	2	4	3	4	1	0

## 3.2 Enregistrements in vivo chez le rat

L'enregistrement in vivo chez le rat est réalisé avec la même méthode utilisée pour l'enregistrement du bruit. L'extrémité du cicor du rat est placée dans le ZIF de la carte PCB sur laquelle les deux headstages MCS sont branchés. Chaque headstage est raccordé à une batterie placée dans un sac à dos afin de limiter le poids des éléments sur la tête du rat (figure 93).



Figure 93 : Rat implanté avec l'ensemble carte PCB, headstages et batteries connecté au cicor.

Deux rats ont été enregistrés. Les enregistrements sur les rats ont été effectués avec un fil de masse vissé dans l'os du crâne.

Les enregistrements du premier rat ont été réalisés lorsque ce dernier était sous anesthésie. En effet, l'objectif de cette manipulation était de stimuler électriquement la patte arrière gauche du rat afin d'observer les réponses au niveau du cortex. Ces stimulations électriques ne donnant pas satisfaction, (de nombreux artefacts étaient observables au niveau des enregistrements lors de la stimulation), nous avons décidé d'exercer de légères pressions manuelles sur le haut de la queue. Ces pressions généraient alors des variations amples du signal enregistré sur deux électrodes et plus faibles sur plusieurs autres électrodes (figure 94).

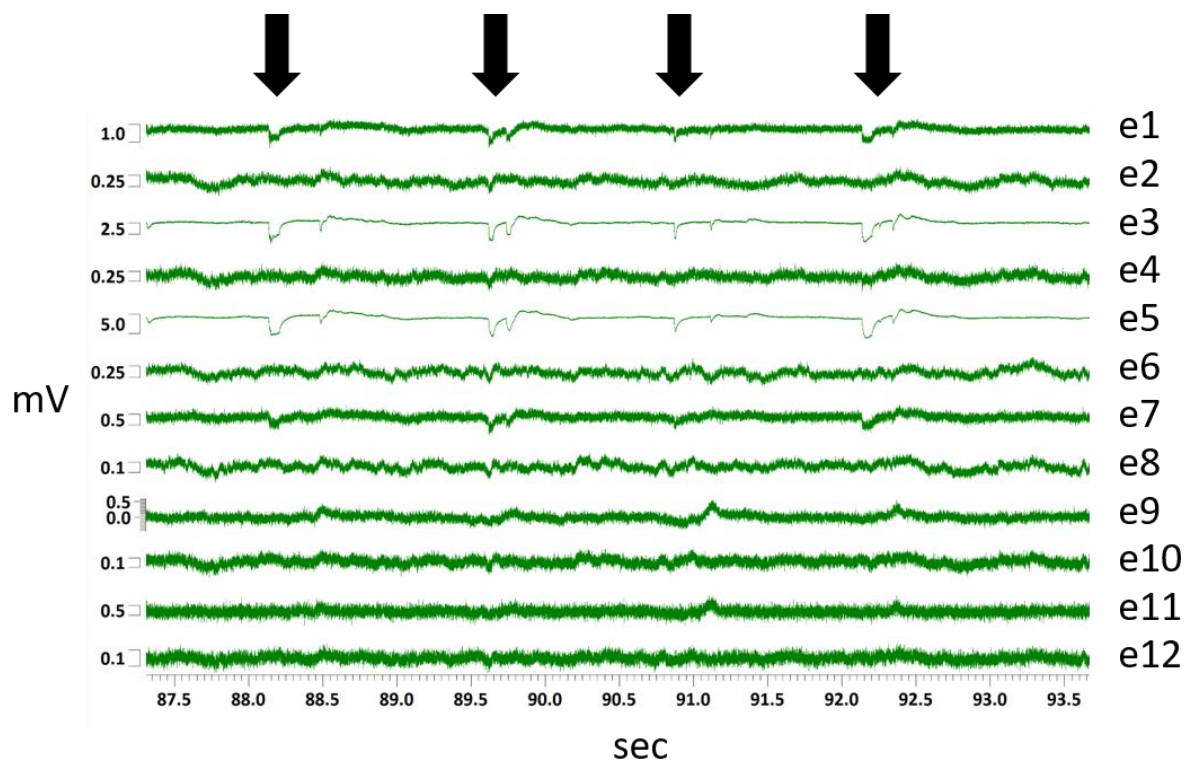


Figure 94 : 12 canaux enregistrés avec un headstage sur le rat anesthésié (échelle optimisée pour chaque canal). Pressions sur la queue représentées par les flèches noires.

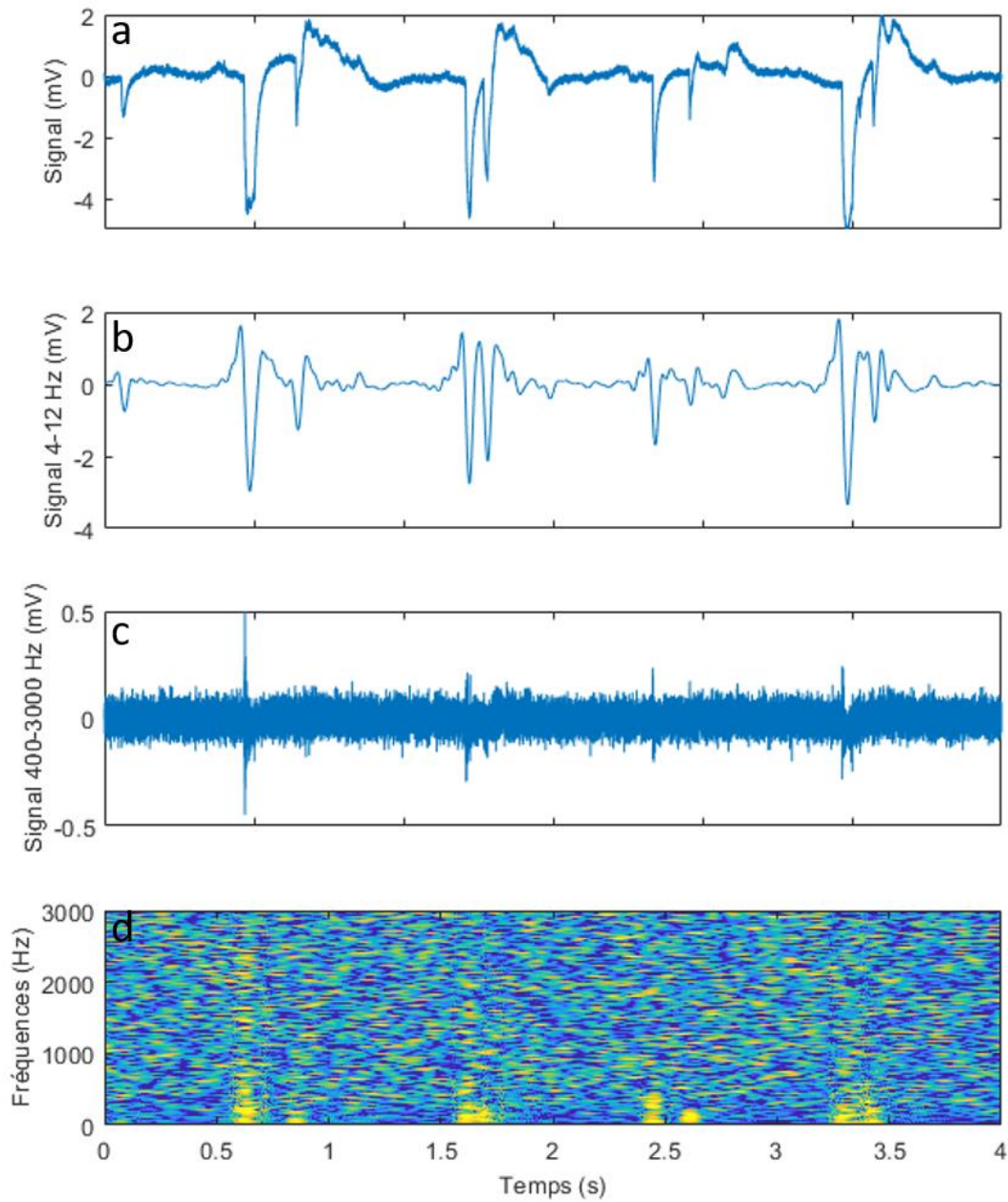


Figure 95 : a : Signal brut après soustraction de la référence commune d'une électrode implantée lors d'un enregistrement sur un rat anesthésié. Les 4 variations importantes sur le signal correspondent aux instants de pression sur la queue. b : Signal obtenu après avoir filtré le signal brut avec un filtre passe bande [4-12 Hz]. c : Signal obtenu après avoir filtré le signal avec un filtre passe bande [300-3000 Hz]. d : Spectrogramme du signal brut après avoir réalisé un Z-score pour chaque fréquence

On observe sur la figure 95 les variations du signal de l'une des électrodes (e3 figure 94) correspondant à la réponse du cortex aux stimuli (pression) appliqués sur le haut de la queue. La figure permet d'observer le signal brut une fois filtré avec un filtre passe bande [4-12 Hz] (Li et al., 2014) que le signal thêta est plus important lors des stimuli. La figure confirme bien que la puissance des ondes autour de 10 Hz est la plus importante. Des variations importantes des signaux sont aussi observables à haute

fréquence (figure 95c). Ces variations pourraient correspondre à un burst de potentiels d'action (Suzuki and Smith, 1985).

Chez un second rat, le signal enregistré semblait comporter des signaux de neurones individuels, des potentiels d'actions. Une fois le signal brut filtré [300-4000 Hz], un seuil a permis d'identifier les différents potentiels d'actions. Le seuil était égal à 6 fois l'écart médian absolu du signal. Ce seuil a été utilisé pour identifier les potentiels d'actions positifs et négatifs. Afin d'éviter éventuellement de détecter deux potentiels d'actions résultants d'un double pic, lorsque deux pics étaient séparés de moins de 2 ms un seul potentiel d'action était considéré. Deux types de potentiels d'actions ont été identifiés, l'un positif (noir) l'autre négatif (rouge) comme on peut l'observer sur la figure 96.

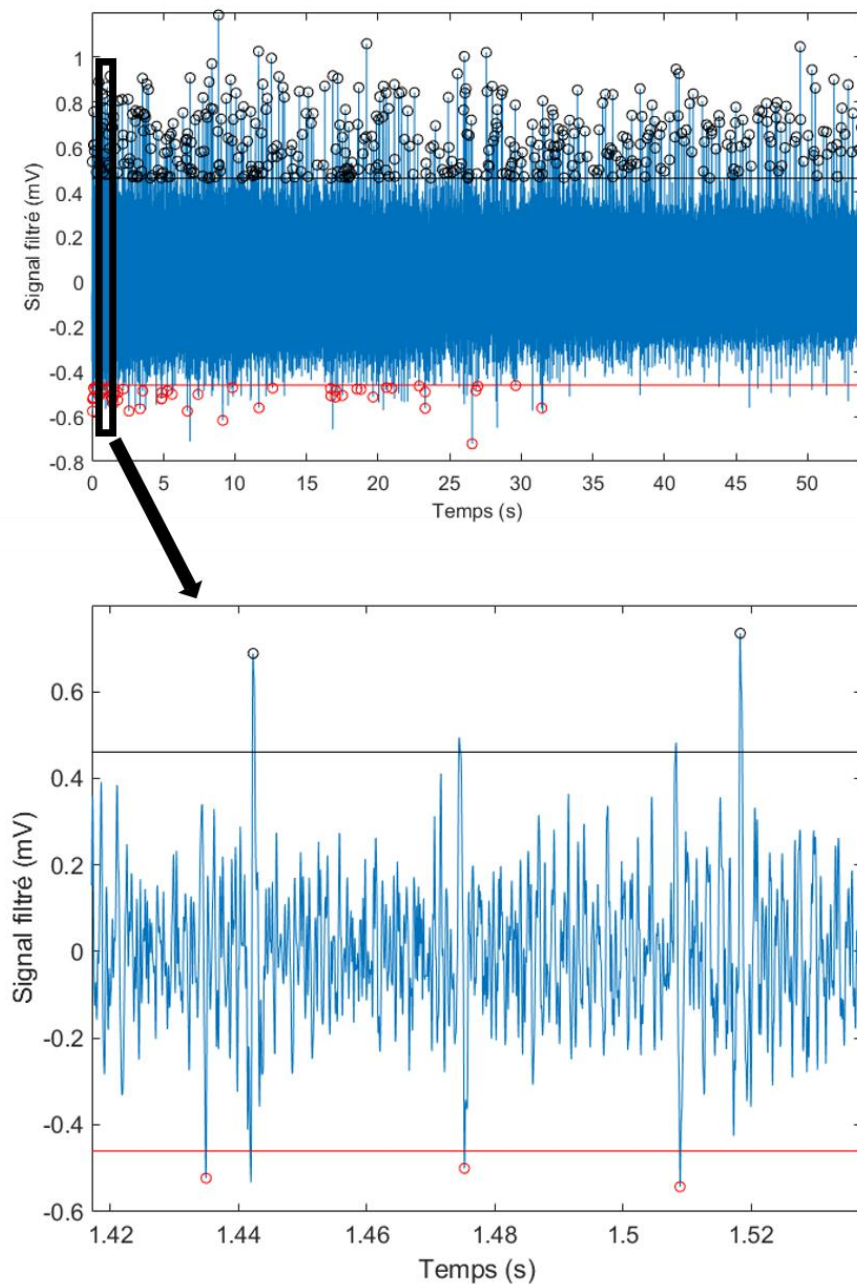


Figure 96 : En haut : Signal filtré [300-4000 Hz] enregistré sur le 3ème rat. Deux types de potentiels d'actions sont observables (pics rouges et pics noirs). En bas : Zoom signal filtré [300-4000 Hz] enregistré sur un rat.

429 potentiels d'action positifs et 51 potentiels d'actions négatifs ont été enregistrés sur une durée de 54 secondes. La figure 96 permet d'observer 3 spikes dépassant le seuil mis en place.

Les deux potentiels d'actions observés ont été analysés. Afin de valider que ces formes caractéristiques étaient bien des potentiels d'actions, ces dernières ont été superposés (figure 97). Une forme similaire de tous les signaux appuierait l'hypothèse que nous avons bien des potentiels d'actions.

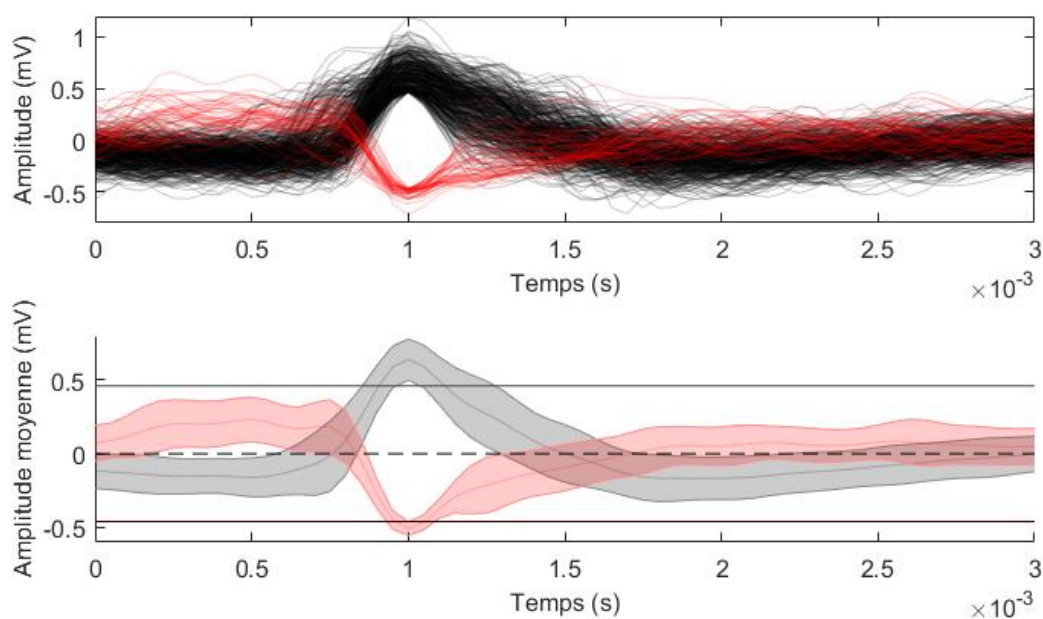


Figure 97 : En haut : Ensemble des potentiels d'actions positifs (noirs) et négatifs (rouges) superposés. En bas : moyenne et écart type de l'ensemble des signaux superposés sur la figure du haut.

On observe que les signaux se superposent bien. Les signaux caractéristiques ont une durée de 1 ms ce qui correspond au temps observé pour des potentiels d'actions locaux. L'implantation des électrodes a été réalisée manuellement ce qui ne nous permet pas d'évaluer précisément à quelles profondeurs les électrodes se situent. On suppose que l'électrode permettant l'enregistrement de ces signaux se situe à environ 3 mm de profondeur.

De plus, afin de vérifier que les signaux observés sont bien des potentiels d'actions, les temps entre 2 potentiels d'actions successifs ont été calculés. La figure 98 montre que le temps entre chaque potentiel d'action varie selon une distribution ressemblant à une distribution exponentielle. Cela est représentatif des trains de potentiels d'actions (Averbeck, 2009).

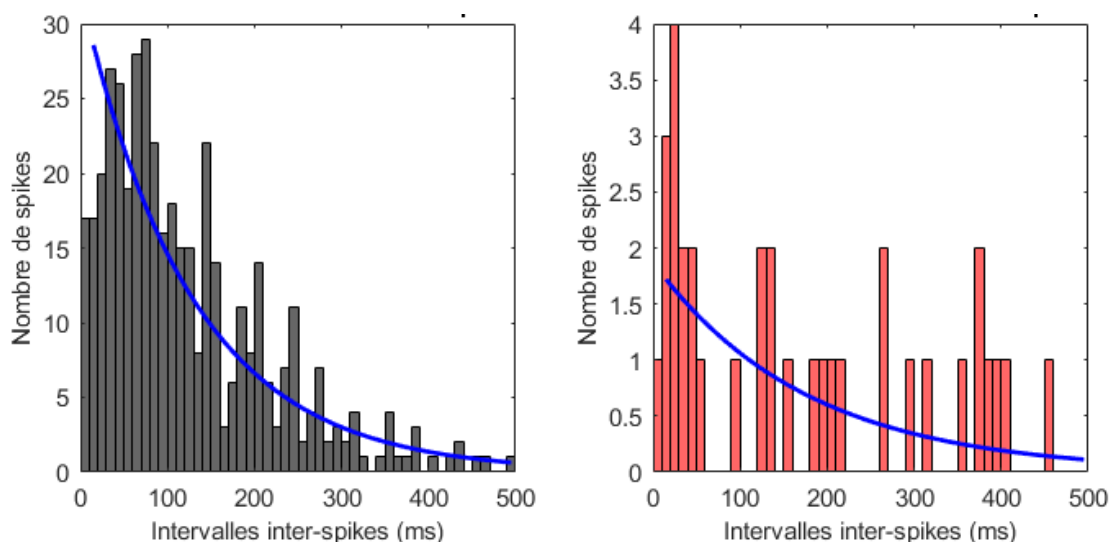


Figure 98 : Distribution des intervalles inter-spikes pour le neurone positif (à gauche) et le neurone négatif (à droite). La courbe bleue correspond à une distribution exponentielle.

Les bruits lors des mesures in vivo sont très variables. Pour 2 rats différents, les moyennes des bruits RMS sur 32 électrodes étaient de 13  $\mu\text{V}$  et 60  $\mu\text{V}$  avec des écarts types de respectivement 12  $\mu\text{V}$  et 37  $\mu\text{V}$ . Ces bruits correspondent à la variabilité observée au paragraphe 2.4.3.

Ces variations importantes peuvent provenir de la connexion entre l'implant et le cicor. En effet, l'alignement entre les deux éléments est différent pour chaque montage. L'implant a aussi pu être endommagé lors de l'insertion ou lors des différentes manipulations préopératoires.

Ces résultats préliminaires démontrent le fonctionnement de ces implants intra-corticaux. Pour s'assurer que des potentiels d'actions peuvent être enregistrés avec ce type d'implant de manière répétable, d'autres études sont nécessaires. Lors des prochaines chirurgies, il sera important d'implanter correctement dans le cortex, si possible dans des zones ayant des fonctions connues afin d'évaluer la qualité des signaux enregistrés.

### 3.3 Immunomarquage

L'implantation à long terme d'électrodes pénétrantes peut induire des réactions tissulaires complexes responsables d'une dégradation des signaux électrophysiologiques et d'une augmentation de l'impédance des électrodes. Plusieurs réactions cellulaires peuvent apparaître : l'activation de la microglie, la formation d'une cicatrice gliale sur le dispositif ainsi que l'absence ou la perte des neurones à proximité de l'implant (mort cellulaire).

Un des challenges majeurs est de comprendre les modifications cellulaires autour de l'implant au cours du temps. L'objectif de ce travail est d'étudier l'interface implant/tissu intact. Cela nécessite de développer une méthode permettant de récupérer les tissus sans faire bouger les électrodes et d'optimiser des immunomarquages permettant d'étudier la réaction du cerveau aux implants.

L'objectif est de marquer les cellules pouvant nous donner des indications quant à l'intégration de l'implant dans le cortex. Or pour arriver à marquer et observer ces cellules il faut au préalable extraire le cerveau du crâne du rat. Il faut ensuite pouvoir réaliser de fines tranches de cerveau. Une fois cela effectué, le marquage est réalisé puis les tranches sont observées au microscope bi-photon. Ce travail a été réalisé par Anne Quesnel-Hellmann.

Après une certaine période de temps après l'implantation des électrodes, le cerveau du rat est prélevé afin d'analyser le comportement des cellules autour de l'implant. La microglie, les astrocytes ainsi que les neurones sont les trois grands types de cellules que nous observons. Après fixation du cerveau au PFA et extraction du cerveau (voir annexe 7), le cerveau est coupé en tranches de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur grâce à un vibratome. Ces tranches sont ensuite marquées avec différents anticorps primaires. Des anticorps secondaires correspondants sont ensuite utilisés afin de pouvoir visualiser les cellules au microscope à fluorescence puis au confocal (annexe 7). Des tests sur un morceau de SU-8 aux grandes dimensions (1mmx2mmx12 $\mu\text{m}$ ) implanté pendant 8 semaines dans le cortex de rat ont montré de premiers résultats (figure 99). Des astrocytes sont présents et forment un « tapis » autour de l'implant : cette cicatrice gliale est à éviter avec les implants car elle peut se placer au niveau des électrodes et empêcher le contact entre les électrodes et les neurones.

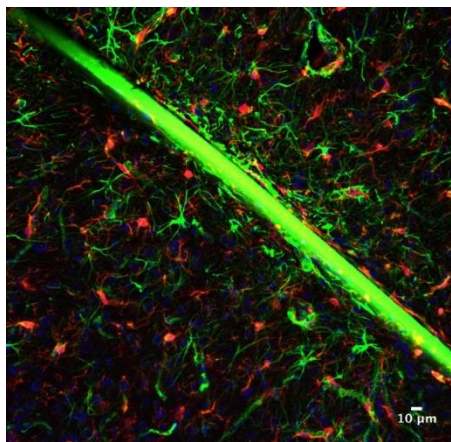


Figure 99 : Histologie Ex Vivo 8 semaines après l'implantation d'un morceau de SU-8 de dimension 1x2x0,012 mm

La cicatrice observable autour du morceau de SU-8 peut être dû à sa taille importante. Les fils de l'implants insérés dans le cortex sont beaucoup plus petits ce qui pourrait modifier la réponse immunitaire.

Des premières coupes d'un cerveau de rat implanté grâce à la méthode du véhicule de transport montre une certaine nécrose autour des fils (voir figure 100). Cette implantation était très profonde et a eu lieu bien au delà du cortex.

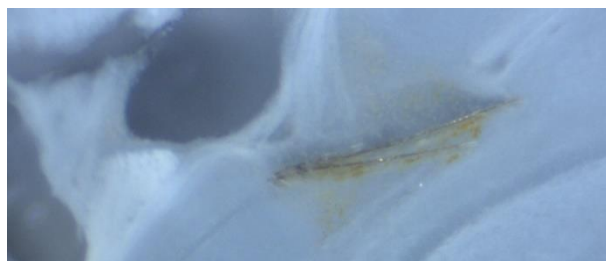


Figure 100 : Coupe de cerveau de rat implanté, avec un fil entouré de de tissu nécrosé



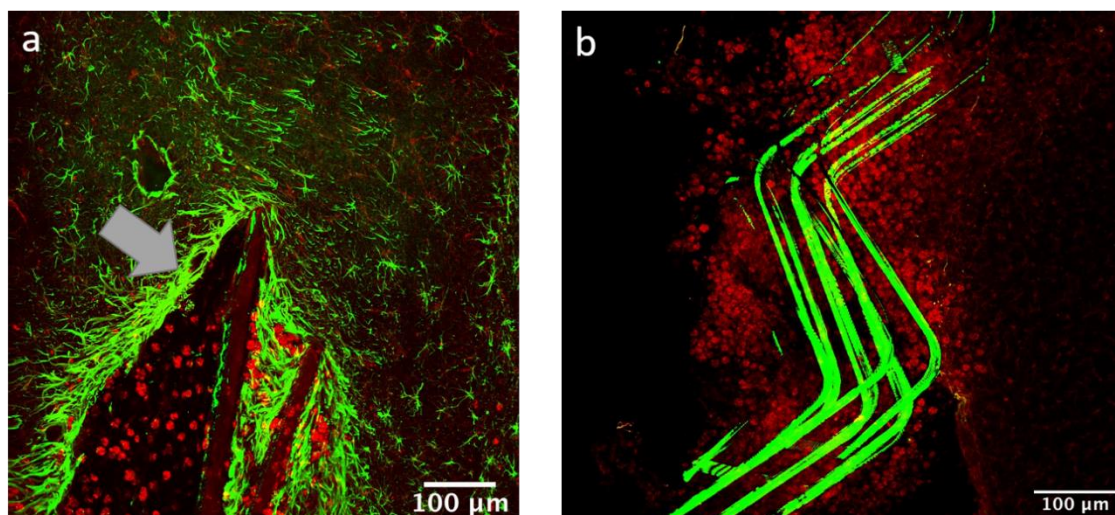


Figure 101 : a : Marquage de la microglie (en rouge) et des astrocytes (en vert) d'une coupe de cerveau de rat implanté avec un tentacule avec des fils droits. La flèche montre une cicatrice. b : Marquage de la microglie (en rouge) d'une coupe de cerveau de rat implanté avec les fils ondulés d'un tentacule.

D'autres coupes et marquages ont été réalisés 8 semaines après implantation d'un autre rat. La figure 101 montre la présence de macrophage (en rouge) autour de l'implant. Sur la figure 101a une cicatrice (en vert) est aussi observable autour de l'implant. On suppose que la méthode d'implantation a créé certains dommages. Il reste à déterminer quelles sont les raisons précises de la présence importante de microglie et d'astrocytes autour de l'implant. Des marquages seront réalisés chez d'autres rats implantés plus longtemps afin d'observer l'évolution de l'implant et de son environnement à moyen/long terme. La figure 101b permet d'observer les fils de SU-8 dans une coupe de cerveau implanté. La présence importante de macrophages autour des fils laisse présager une forte réponse immunitaire.

### 3.4 Perspectives

- Méthode d'insertion de l'implant

Les pointes en PLGA réalisées ne sont pas encore assez fines pour permettre une bonne implantation. De futurs tests de la gravure du PLGA par plasma seront menés. La résine sera remplacée par un film photosensible. Le film sera collé sur le wafer et ne nécessitera aucun recuit qui pourrait faire fondre le PLGA et créer un mélange PLGA/résine comme lors des essais précédents. Le temps de gravure sera découpé, une pause d'une minute entre chaque gravure d'une minute permettra d'éviter une hausse trop importante de la température et par conséquent la déformation du PLGA.

La soie photosensible est un autre matériau biodégradable qui pourra être testé. Les méthodes utilisées pour découper ou graver le PLGA pourront être appliquées sur la soie non photosensible. La soie photosensible devrait pouvoir permettre de créer des pointes sur le wafer avant décollement de l'implant. La définition et le positionnement des pointes devraient alors être très bons grâce à la précision de la photolithographie (annexe 2).

Afin de faciliter la manipulation lors de l'insertion des pointes avec le véhicule de transport, des fils rigides et droits de faibles diamètres pourraient être testés. De longs fils rigides (3 cm) collés grâce au PEG aux extrémités des tentacules nous laisseraient envisager plus facilement l'utilisation de système d'insertion automatique. En effet, pour améliorer la précision et la répétabilité des implantations, les

files permettant d'insérer les électrodes seront contrôlés grâce à un descendeur. Le descendeur permettant d'effectuer l'insertion à différentes vitesses, une étude sur la vitesse d'insertion sera aussi réalisée dans le futur. De plus, un support de l'implant plus rigide devrait aussi permettre des implantations plus précises.

- Enregistrements in vivo

Les enregistrements effectués sur les différents rats ont permis d'enregistrer des potentiels d'actions ainsi que des champs de potentiels locaux. Les potentiels d'actions n'ont été enregistrés que sur quelques électrodes d'un implant. D'autres implantations suivront suite aux changements apportés lors de la chirurgie comme le retrait de l'hémostase (annexe 6) ou à l'amélioration de la connexion entre l'implant et le Cicor.

Afin de valider le bon fonctionnement du système, il est envisagé d'implanter des rats sur plusieurs mois (3-8 mois) et de suivre l'évolution des signaux au cours du temps. De plus, nous souhaitons réaliser les implantations dans des zones motrices afin d'observer la correspondance entre les enregistrements et les mouvements du rat.

- Immunomarquage

Les premiers résultats préliminaires de l'immunomarquage ont permis d'établir la présence d'astrocytes et de macrophages sur le lieu de l'implantation (cicatrice) voire même de la nécrose. Les causes de la nécrose et de la réaction immunitaire importante peuvent être multiples. Un geste chirurgical trop invasif, une implantation sur un vaisseau sanguin, le fait que le fil d'implantation n'ait pas été autoclavé ou encore l'utilisation d'un hémostase pour reconstruire la dure mère (voir annexe 6) (normalement conçu pour reconstruire la dure mère humaine) sont des causes possibles de la nécrose. Ces premières coupes de cerveau ne nous permettent pas de conclure complètement sur la nature de la réponse du tissu. Afin de comprendre les raisons de la nécrose et du réveil de la réponse immunitaire d'autres rats ont été implantés.

# Chapitre 4 : Caractérisation par fluorescence des limites d'injection de charge des microélectrodes

Ce chapitre traite d'une méthode de caractérisation des électrodes de stimulation par fluorescence. Cette méthode permet de visualiser les changements de pH autour d'une électrode lorsqu'un courant de stimulation est injecté. Différents matériaux d'électrodes ont été caractérisés et testés avec cette méthode. Les performances en stimulation de ces matériaux sont comparées. La méthode par fluorescence est comparée à la méthode par voltamétrie cyclique. Pour finir, une étude sur la densité de courant lors de la stimulation permet de comprendre une des voies d'optimisation de la stimulation.

## 4 Méthode de caractérisation avec colorant fluorescent

Les implants développés lors de cette étude ont pour objectif d'enregistrer les signaux corticaux. Une des évolutions possibles de l'implant pourrait être l'intégration d'électrodes de stimulation. La stimulation électrique est une option thérapeutique très utilisée pour traiter divers troubles du système nerveux central et périphérique (O'Reardon et al., 2006). Cela nécessite des électrodes pour délivrer suffisamment de courant pour dépolariser les membranes des cellules excitables tout en évitant les réactions faradiques indésirables pour prévenir les dommages tissulaires. Pour s'assurer que les électrodes se conforment à cette règle, elles sont généralement caractérisées électrochimiquement par spectroscopie d'impédance, voltamétrie cyclique et transitoires de tension (Cogan, 2008). Lors de stimulation in vivo les impulsions électriques peuvent avoir une forme de créneau biphasique sur un temps très bref. Pour se rapprocher des conditions de stimulation neuronale in vivo, les transitoires de tension permettent d'estimer la charge maximale qu'une électrode devrait délivrer lorsqu'un courant lui est appliqué sous forme d'impulsion donc pendant un temps très bref. Cependant, cette estimation n'est pas toujours évidente pour une faible intensité de courant et la mesure de potentiel réalisée avec une électrode de référence distante est une moyenne sur la surface de l'électrode de stimulation (Cogan, 2008). Comme il a été démontré que les potentiels ne sont pas uniformément répartis à travers une électrode, une meilleure méthode pour évaluer la charge maximale qu'une électrode peut injecter est nécessaire. J'ai testé plusieurs matériaux d'électrodes à l'aide d'une méthode développée précédemment dans l'équipe qui permet une visualisation directe des changements de pH sur le site de l'électrode lorsque des courants sont appliqués sous forme d'impulsions. De cette façon, on peut évaluer la limite d'injection de charge de microélectrodes de différents matériaux tels que le platine, le platine rugueux, le nitrure de titane, l'oxyde d'iridium, le PEDOT : PSS, le diamant dopé au bore-plat (BDD) et BDD nanoporeux. Ce travail a été encadré par Blaise Yvert.

### 4.1 Matériaux des électrodes

Tous les tests ont été réalisés sur des matrices multi-électrodes rigides (MEA). Ces MEAs (figure 102) sont constitués d'une chambre de culture avec des électrodes planes intégrées au fond de la chambre. Les cellules ou les préparations tissulaires peuvent être déposées dans cette chambre et maintenues en vie sur les électrodes de mesure. L'enregistrement et la stimulation de l'activité biologique se font à travers les électrodes de mesure. Les signaux obtenus sont amplifiés et envoyés à un système d'acquisition de données.

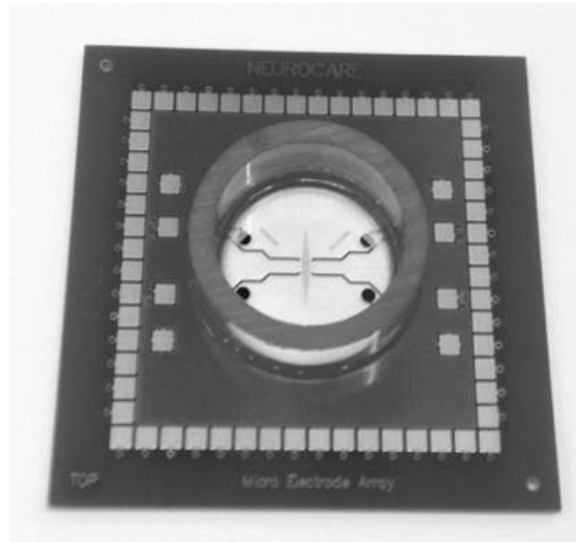


Figure 102 : MEA

La plupart des MEA sont réalisés sur un substrat en verre. La forme des électrodes peut changer d'une MEA à l'autre, et la taille est généralement comprise entre 10 et 80  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Dix MEA différentes ont été caractérisées. Deux MEA de platine (Qwane Biosciences SA) avec des électrodes de 20 et 40  $\mu\text{m}$  de diamètre. Une MEA de platine noir poreux (Qwane Biosciences SA) avec des électrodes de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. Deux MEA de diamants (CEA, LIST, Diamond Sensors Laboratory), une avec des électrodes en diamant poreux de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre et une avec des électrodes en diamant plat de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre (Hébert et al., 2015; Piret et al., 2015a). Deux MEA en Pedot:PSS (Qwane Biosciences SA) avec électrodes de 10 et 30  $\mu\text{m}$  de diamètre. Deux MEA en nitrure de titane (Multichannel System GmbH) avec électrodes de 10 et 30  $\mu\text{m}$  de diamètre. Une MEA d'oxyde d'iridium électrodéposé (Mailley et al. 2002) sur des MEA de platine (Qwane Biosciences SA) avec des électrodes de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. Des images MEB ont été réalisées pour les électrodes comme on peut le voir sur la figure 103.

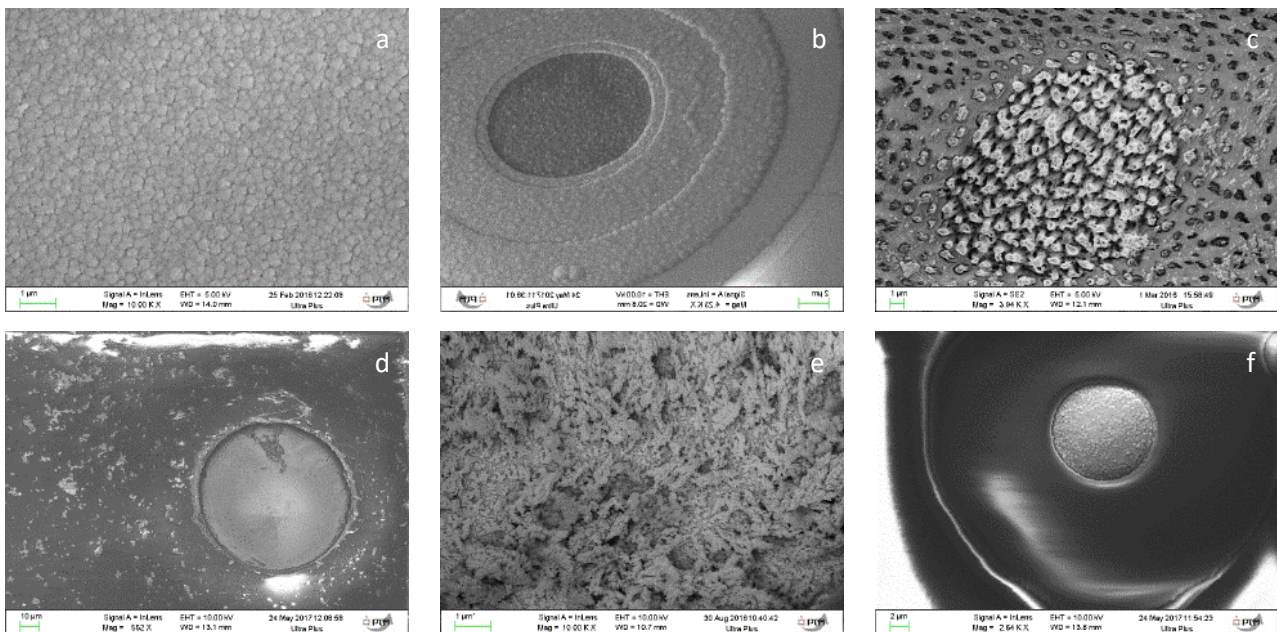


Figure 103 : Image MEB des différentes électrodes : a : Nitrure de titane 30  $\mu\text{m}$ . b : Diamant plat. c : Diamant poreux. d : platine plat. e : platine poreux. f : nitrure de titane 10  $\mu\text{m}$ .

Le sel d'iridium  $K_3IrCl_6$ , 4 mM, a été dissous dans de l'eau et complexé avec de l'acide oxalique, 23 mM. Le pH de la solution a ensuite été ajusté à une valeur de 10 avec l'ajout de  $K_2CO_3$ , 80 mM. Après préparation, le bain d'électrolyse a été vieilli pendant 4 jours à 35 ° C puis maintenu à 4 ° C pendant 2 semaines avant l'électrodéposition. L'électrodéposition s'est déroulée avec un système à deux électrodes, l'électrode de travail et la contre électrode en platine bien plus grande que l'électrode de travail. Une fois la solution à base d'iridium versée dans la cuve où les électrodes de travail étaient présentes, le potentiel de l'électrode de travail suivait un cycle de 44 secondes compris entre -0,3 et 0,8 V. Le cycle était répété 20 fois.

## 4.2 Caractérisation des MEA

### 4.2.1 Mesure de l'impédance et du bruit

Toutes les impédances à 1 kHz des électrodes ont été mesurées avec un impédance mètre juste avant chaque test de stimulation en fluorescence. Les électrodes étaient dans la solution fluorescente (annexe 9) et l'impédance était mesurée par rapport à une électrode de masse Ag/AgCl et une électrode.

Les bruits d'électrodes ont été mesurés avec un système multicanaux MCS MEA 1060 pendant 1 min dans du NaCl à 0,9% entre chaque microélectrode et une électrode de masse Ag / AgCl. Les signaux ont été amplifiés (x 1100) et filtrés (bande passante [1Hz-3kHz]). Les données ont été acquises à 10 kHz en utilisant deux convertisseurs CED Power1401 AD synchronisés et le logiciel Spike2 v7 de Cambridge Electronic Design (Cambridge, Angleterre). L'écart-type du signal  $\sigma_e$  a ensuite été calculé sur l'enregistrement d'une minute pour chaque électrode du réseau. Ensuite, le bruit RMS de chaque électrode  $\sigma_e$  a été calculé avec cette formule:  $\sigma_e = \sqrt{\sigma_s^2 - \sigma_a^2}$  où  $\sigma_s$  est le bruit mesuré et  $\sigma_a$  (=1.49  $\mu$ V) le niveau de bruit électronique des amplificateurs (Heim et al., 2012).

### 4.2.2 Caractérisation par voltampérométrie cyclique

Nous avons ensuite caractérisé les différentes électrodes par voltamétrie cyclique. Le montage utilisé est un système à deux électrodes composé de l'électrode de travail et d'une contre-électrode suffisamment grande pour être aussi l'électrode de référence. Le réservoir de la MEA est rempli de solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Une électrode Ag/AgCl est placée dans le réservoir MEA et connectée à la prise de la contre-électrode du potentiostat (SP-200 biologique) (qui est branchée sur la prise de référence). Un pad de contact de la MEA connecté à une électrode est connecté à la prise d'électrode de travail du potentiostat.

Tous les câbles sont blindés avec de l'aluminium pour supprimer tous les signaux parasites. La capacité à stocker des charges (CSC) a été calculée avec cette formule:  $CSC = \frac{1}{v} \int idV$  où  $v$  est la vitesse de balayage. Un exemple de CV est observable sur la figure 104.

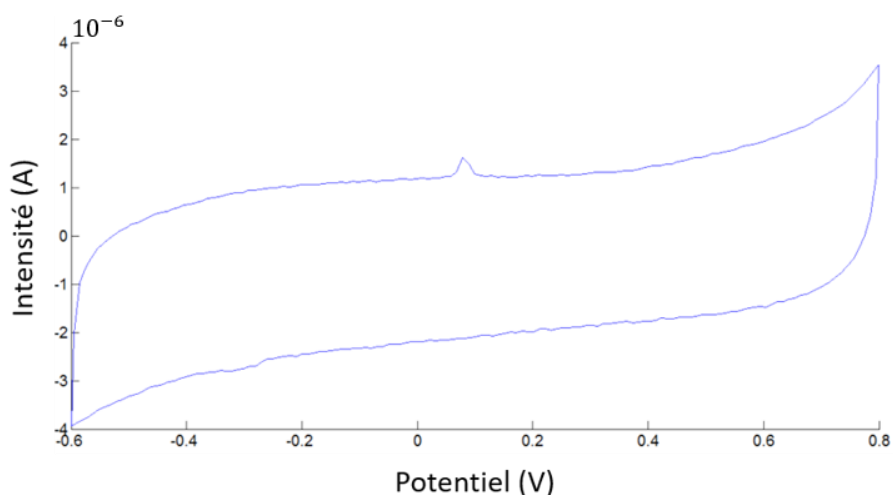


Figure 104 : CV d'une électrode de PEDOT de 30  $\mu\text{m}$  de diamètre

La fenêtre de potentiel utilisée pour les différents matériaux est variable suivant les caractéristiques du matériau (tableau 6).

Tableau 6 : Fenêtre de potentiel utilisée pour chaque matériau

Volt	Fenêtre des CV
Dia10	(-1,5)-(-1,5)
Diap20	(-1,5)-(-1,5)
Pedot10	(-0,6)-(0,8)
Pedot30	(-0,6)-(0,8)
Irox10	(-0,6)-(0,8)
TiN10	(-0,6)-(0,8)
TiN30	(-0,6)-(0,8)
PtB20	(-0,6)-(0,8)
Pt20	(-0,6)-(0,8)
Pt40	(-0,6)-(0,8)

#### 4.2.3 Mesure du potentiel transitoire

Une méthode répandue pour mesurer les capacités d'injection de charges est basée sur la mesure du potentiel transitoire (Cogan, 2008). Nous avons mesuré le potentiel de l'électrode en réponse à un créneau de courant. Le montage est un système à deux électrodes. Le réservoir MEA est rempli de solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Une électrode Ag/AgCl est placée dans le réservoir MEA et connectée au connecteur -I du stimulateur (multichannel system). Un pad de contact de la MEA connecté à une électrode est connecté au connecteur +I du stimulateur. Des impulsions de courant biphasique (cathodique puis anodique de 100  $\mu\text{s}$ ) d'intensités de plus en plus importante sont envoyées à l'électrode. Simultanément à la stimulation, le potentiel de l'électrode est enregistré. Sur la figure 105, le potentiel observé en réponse à deux impulsions révèle que pour une valeur importante du courant, la pente de la partie parabolique change, ce qui traduit une réaction faradique irréversible (Cogan, 2008). L'étude de la courbure pourrait ainsi nous permettre d'évaluer la capacité d'injection

de charge. Il est cependant difficile d'identifier précisément quel changement de la courbure peut être considéré comme une réaction faradique irréversible.

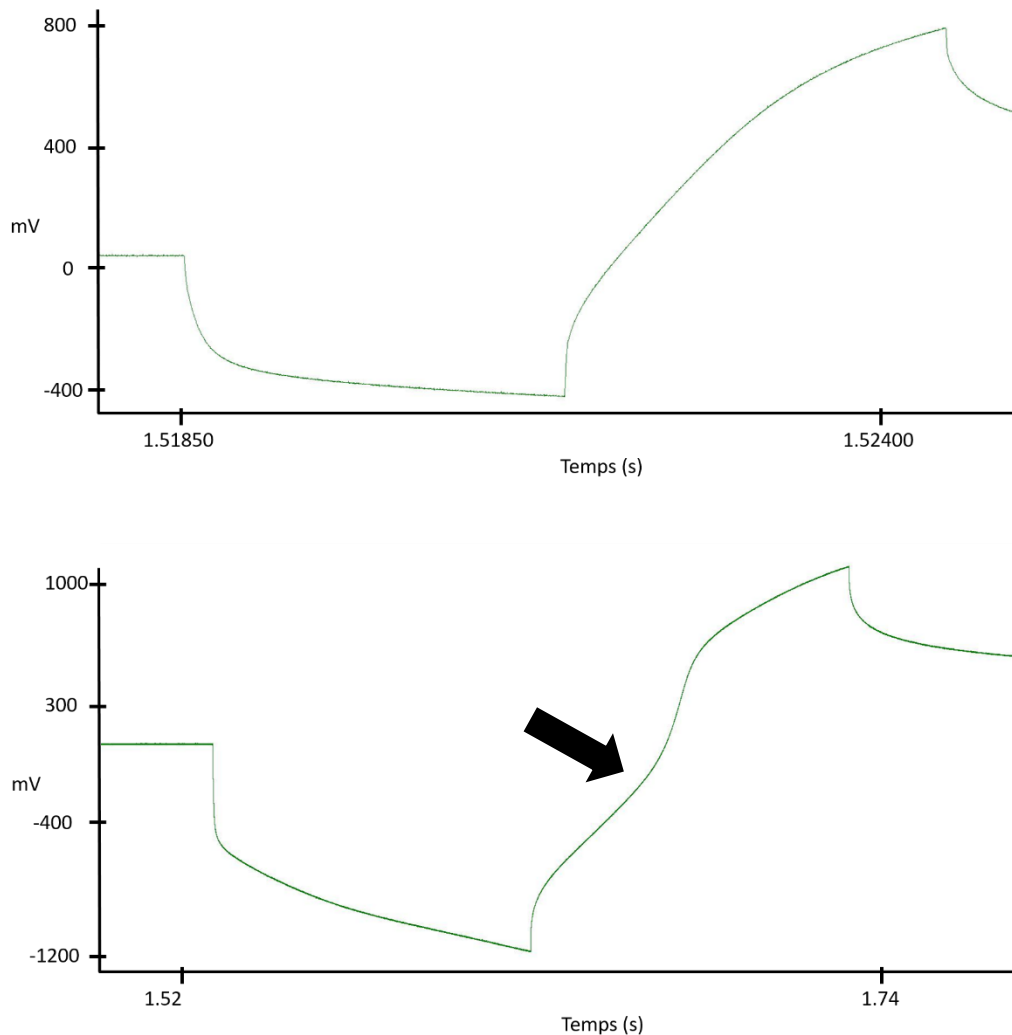


Figure 105 : Graphique représentant la méthode transitoire. Un créneau de courant est appliqué sur un fil de platine, les graphiques montrent la réponse en tension. En haut, le créneau est d'une longueur de 3 ms et d'une amplitude de 100  $\mu$ A. En bas, le créneau est d'une longueur de 100 ms et d'une amplitude 500  $\mu$ A. La flèche montre le changement de pente

Dans la littérature, la capacité d'injection de charge est déterminée en utilisant le potentiel maximal cathodique et anodique auquel on soustrait la chute de potentiel dû à la résistance de l'électrolyte (voir 1.8.1.5). Lorsqu'une de ces valeurs appelées  $E_{mc}$  et  $E_{ma}$  dépasse la fenêtre de potentiel de l'eau, on obtient alors la quantité de charge maximale injectable.

Or pour mesurer cette chute de potentiel, il faut insérer entre le créneau cathodique et le créneau anodique (dans le créneau de courant biphasique) une temporisation. Cette temporisation de l'ordre de 100  $\mu$ s (Meijs et al., 2015; Park et al., 2018) est aussi longue en temps que les pulses de courant. Or la meilleure façon d'éviter d'endommager le tissu lors de la stimulation est d'utiliser une stimulation biphasique sans temporisation entre la phase cathodique et anodique (Merrill et al., 2005). Cette méthode ne permet donc pas de mesurer la charge injectée lorsque l'on stimule en biphasique sans temporisation.



#### 4.2.4 Caractérisation des différents matériaux par fluorescence

La deuxième méthode utilisée pour déterminer la charge injectable d'une électrode est l'observation de l'évolution du pH par fluorescence. Le montage utilisé pour caractériser les électrodes comprend l'élaboration d'un mélange fluorescent et d'une station de stimulation. Le colorant BCECF, un indicateur de changement de pH, est dissous dans du NaCl à 0,9% en proportion entre 1: 1000 et 3 : 1000. Le réservoir MEA est rempli avec cette solution. Une électrode Ag/AgCl est placée dans la solution BCECF dans le réservoir MEA et connectée à la terre du générateur de courant (Multichannel system) (figure 106). Un pad de contact MEA connecté à une électrode est connecté au générateur de courant. L'électrode étudiée est observée par une caméra à travers un microscope avec un objectif 60x (figure 106).

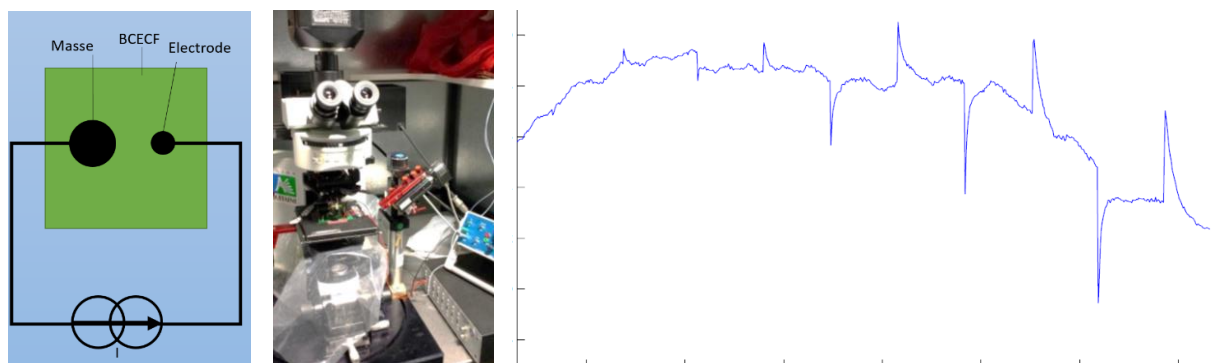


Figure 106 : A droite Schéma du montage utilisé pour la fluorescence. Au centre : Montage utilisé pour la fluorescence. A droite : Graphe montrant l'intensité de fluorescence en fonction du temps. Des pics sont observables au moment des stimulations

En fonction de l'expérience, des impulsions de courant anodique ou cathodique ou biphasique (109  $\mu$ s) (figure 107) croissantes en intensité sont envoyées à l'électrode.

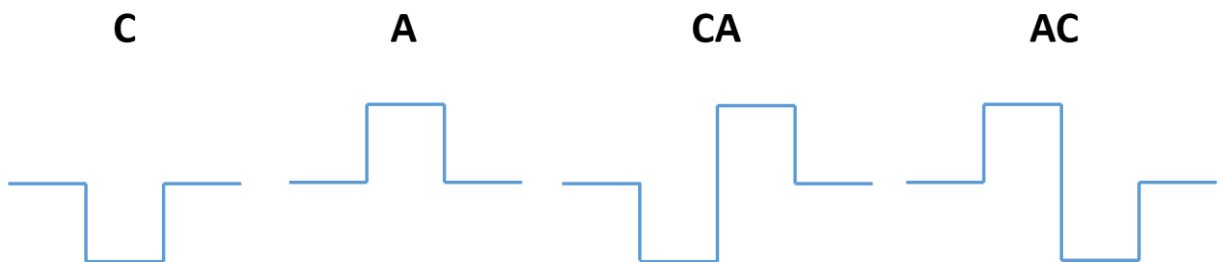


Figure 107 : Différents types de stimulation. De gauche à droite : cathodique (C), anodique (A), biphasique cathodique (CA), biphasique anodique (AC)

Lorsqu'une impulsion est envoyée, le niveau de fluorescence à la surface de l'électrode est observé. Lorsque le courant (charge injectée) est trop élevé, une réaction faradique se produit au niveau de l'électrode, entraînant une variation du pH et par conséquent une variation de la fluorescence. Cette variation de fluorescence est représentée par un pic sur le graphique des valeurs de gris en fonction du temps comme on peut le voir en figure 108. La première valeur de courant où un pic est trois fois supérieur au signal du bruit représente la limite d'injection de charge de l'électrode.

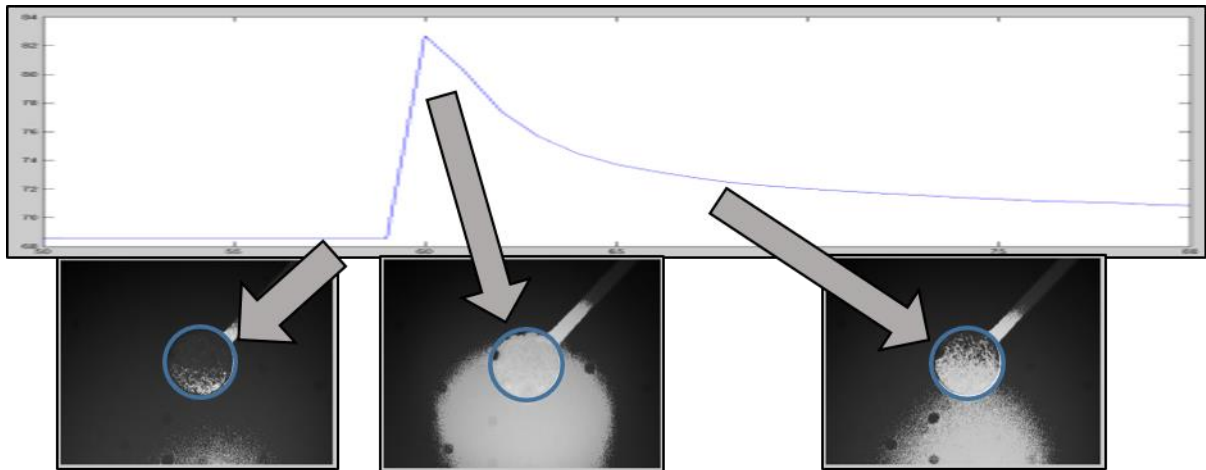


Figure 108 : En haut : graphique des valeurs de gris en fonction du temps. En bas : Images enregistrées par la caméra montrant l'évolution de la fluorescence entre 3 temps donnés au niveau de l'électrode (cercle bleu). Corrélation entre l'augmentation de l'intensité de la solution fluorescente et le moment de la stimulation (pic du graphique)

Cette méthode, contrairement à la méthode des transitoires de potentiel permet l'évaluation de la capacité d'injection de charge lorsque qu'un créneau biphasique sans temporisation est utilisé.

### 4.3 Résultats et discussion

#### 4.3.1 Bruit et impédance

Pour 98 électrodes on a mesuré l'impédance et le bruit. La figure montre la relation entre les 2 mesures. Suite à la mesure de bruit et d'impédance, les résultats obtenus sont globalement cohérents (figure 109).

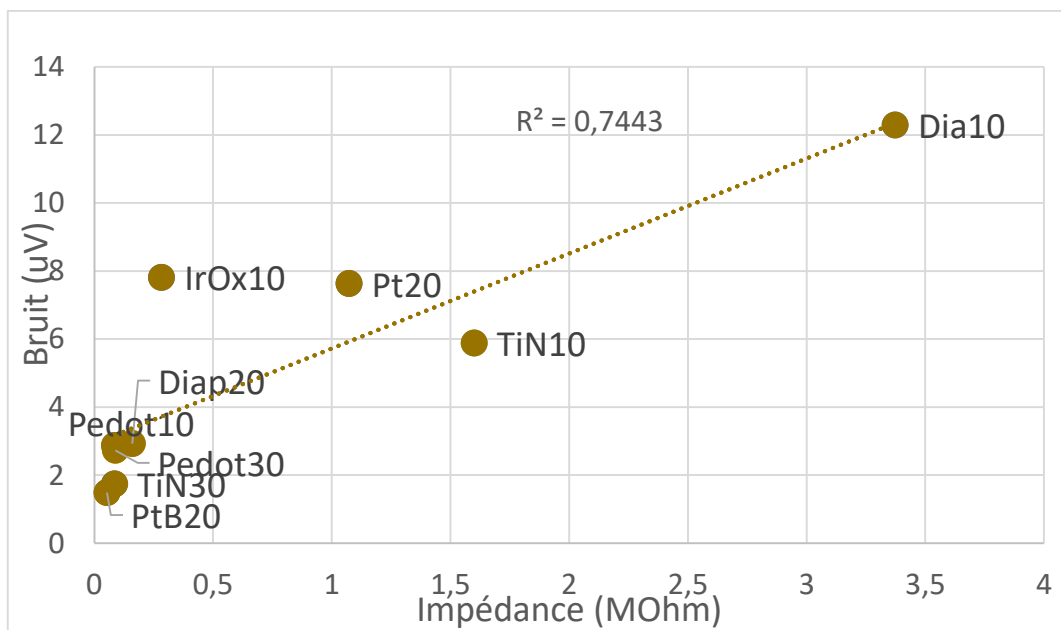


Figure 109 : Bruit en fonction de l'impédance

Le diamant plat est le matériau avec la plus grande impédance et le bruit le plus important. Les électrodes non poreuses et/ou avec un diamètre de faible ont une impédance et un bruit plus importants. Comme attendu, les caractéristiques du platine sont moins intéressantes que les autres matériaux (voir tableau 1). On observe que les autres matériaux ont des caractéristiques relativement proches. L'influence du diamètre des électrodes est importante pour le nitrure de titane mais moins marquée pour le PEDOT. Le platine poreux semble être le matériau avec l'impédance la plus faible et le bruit le moins grand. Le bruit et l'impédance des électrodes sont corrélés, plus l'impédance est importante plus le bruit est important. Cela est cohérent avec la formule du bruit de Johnson (voir 1.8.1.3).

#### 4.3.2 Cohérence de la fluorescence

Une première étape afin de valider la pertinence des valeurs obtenues par fluorescence est de comparer les valeurs de capacité d'injection de charge obtenues lors des différents types de stimulation. Les résultats obtenus grâce à la méthode par fluorescence montrent une cohérence par rapport à la littérature. Cogan et al ont montré que stimuler avec un courant biphasique permettait d'augmenter la capacité d'injection de charges comme le montre la figure 110. De plus, une stimulation avec un courant négatif permet aussi d'injecter plus de charge que la stimulation avec un courant positif.

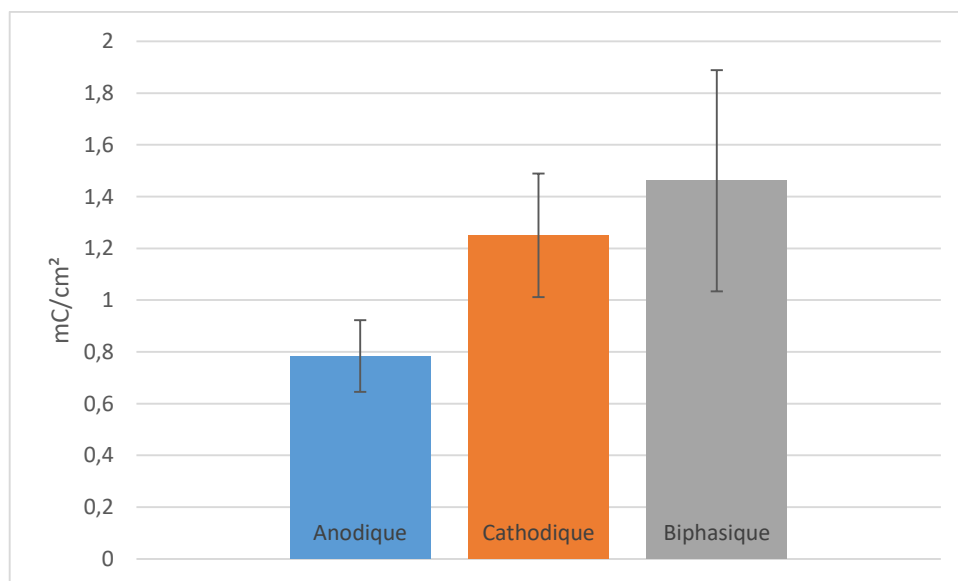


Figure 110 : Capacité d'injection de charge (moyenne sur 196 mesures sur 98 électrodes différentes) en fonction du type de stimulation

Comparer les valeurs de capacité d'injection de charge obtenues par la méthode par fluorescence pour chaque matériau permet aussi de vérifier la pertinence de la nouvelle méthode (figure 111).

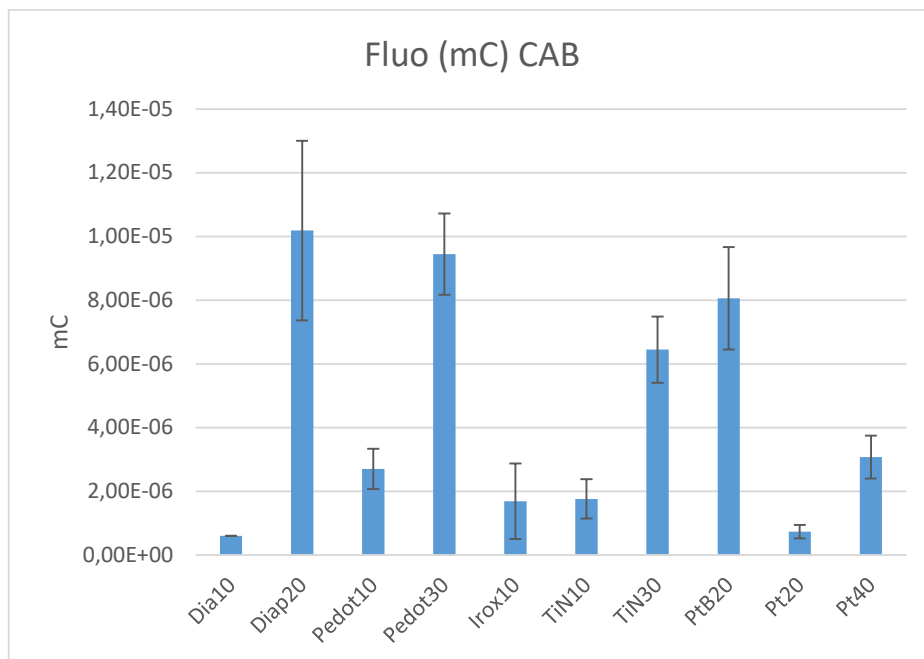


Figure 111 : Charge pouvant être injectée de manière purement capacitive en fonction des différents matériaux obtenue par la méthode par fluorescence (pour des stimulation cathodique puis anodique biphasique (CAB))

Comme observable dans la littérature (voir tableau 1), le platine permet d’injecter moins de charge de façon capacitive que le diamant poreux, le PEDOT ou le platine poreux. La méthode par fluorescence permet d’observer que le diamant poreux est le matériau permettant d’injecter le plus de charge de manière purement capacitive. Suit ensuite le PEDOT et le platine poreux. Le diamant plat et le platine ont en revanche une faible capacité à injecter les charges. Cela correspond bien aux résultats obtenus lors des mesures de bruit et d’impédance (voir paragraphe précédent). En revanche, on observe que le platine poreux avait le bruit et l’impédance les plus faibles or le diamant 3D et le PEDOT30 ont les capacités d’injection de charge les plus importantes.

#### 4.3.3 Comparaison fluorescence/CV

Nous avons comparé les charges limites déterminées par fluorescence et les CSC calculés à partir des CV. On observe une cohérence entre les résultats obtenus par fluorescence et par CV (figure 112).

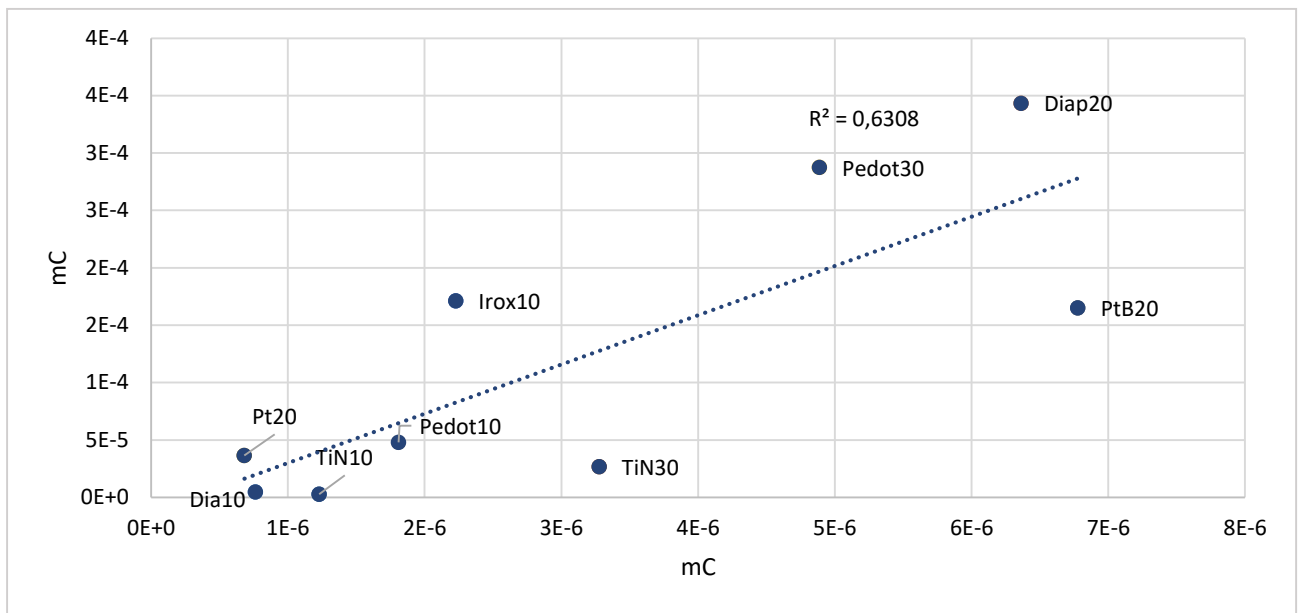


Figure 112 : Capacité d'injection de charge obtenue par la méthode CV en fonction de la capacité d'injection de charge obtenue par la méthode par fluorescence (pour des stimulation anodique puis cathodique biphasique).

Les valeurs obtenues par CV sont presque 100 fois plus grande que les valeurs obtenues par fluorescence. Cela est dû à la vitesse de balayage lors de la mesure du CV. En effet, la vitesse utilisée pour réaliser les CV est 100 mV/s ce qui permet de charger et décharger bien plus progressivement l'électrode que lors d'une impulsion brève. La vitesse de 100 mV/s a été choisie au vue de la littérature (Cogan et al. 2009, 50 mV/s). Un cycle de charge/décharge dure 14 secondes (avec une fenêtre  $-0,8 ; 0,6$ ) alors que le pulse utilisé avec la méthode par fluorescence dure 100 ms. On observe qu'en augmentant la vitesse de scan lors du CV, les valeurs de CSC diminuent fortement pour se rapprocher des valeurs obtenues par fluorescence (figure 113).

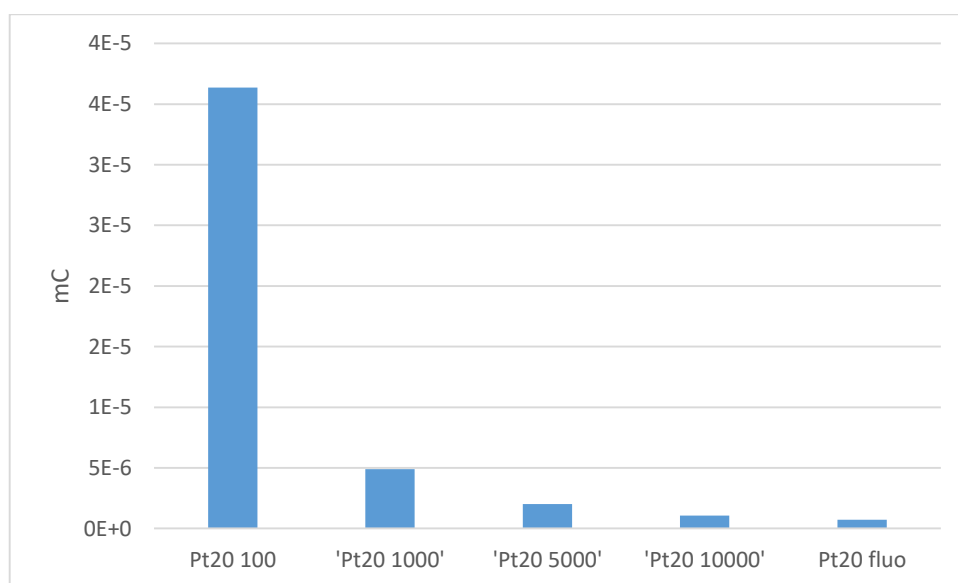


Figure 113 : Charges injectées en fonction de la vitesse de scan

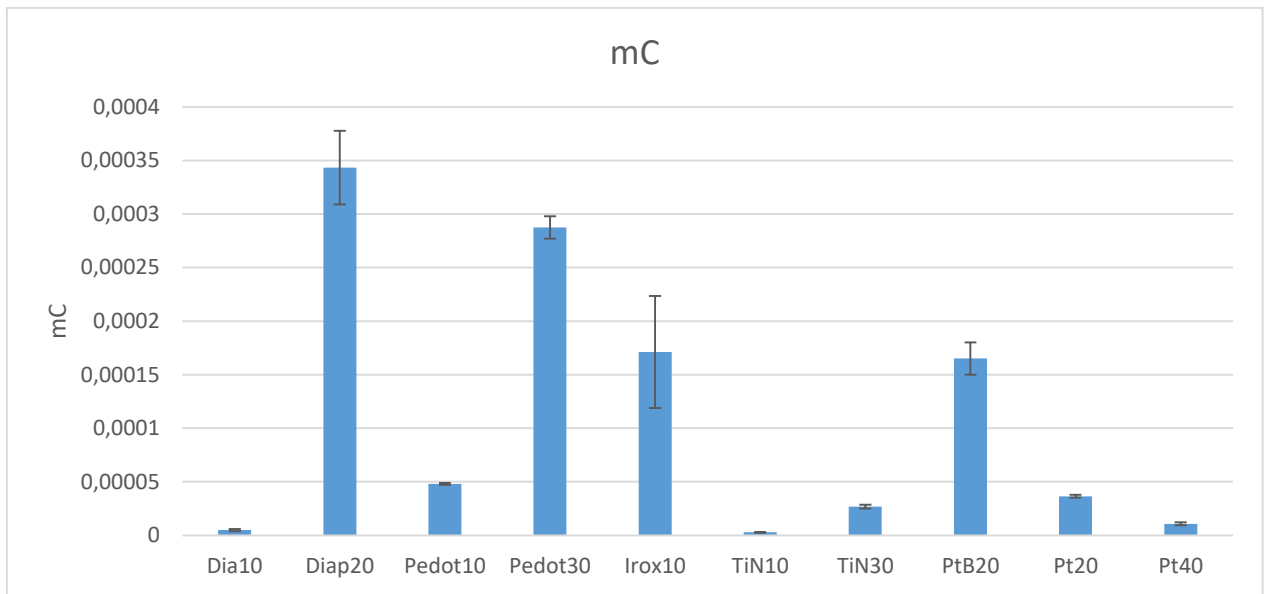


Figure 114 : Charge pouvant être injectée de manière purement capacitive en fonction des différents matériaux obtenue par la méthode CV

Les matériaux les plus performants restent le diamant poreux, le platine poreux ainsi que le PEDOT. Le diamant plat ainsi que le platine plat sont toujours les moins bons matériaux. Il est intéressant d'observer que certains matériaux sont plus performants lors des mesures CV mais pas lors des mesures de fluorescence. En effet, comme le montre la figure 114, le platine poreux est le plus performant avec la méthode par fluorescence alors qu'il n'est le troisième matériau le plus performant lors de l'utilisation de la méthode CV. Cela signifie que peut-être que certains matériaux comme le PEDOT stockent mieux les charges que le platine poreux lorsque la stimulation est basse fréquence. En revanche le platine poreux paraît plus intéressant lorsque la stimulation est courte.

#### 4.3.4 Périmètre Vs Surface

Dans la littérature, les capacités à stocker des charges sont généralement présentées en  $\text{mC}/\text{cm}^2$ . Cela permet de comparer les performances de différentes électrodes (différents matériaux, différentes formes...) sans pour autant que la taille des électrodes soit la même. Or utiliser les  $\text{mC}/\text{cm}^2$  afin de comparer les électrodes se base sur l'hypothèse que toutes les charges sont injectées de façon homogène sur toute la surface de l'électrode. Il a cependant été montré que la densité de courant a tendance à être plus importante sur les bords de l'électrode (Wang et al., 2014) lorsque les impulsions sont rectangulaires. Les résultats obtenus avec la méthode par fluorescence appuient ces conclusions. En effet, lorsque les charges calculées sont divisées par la surface de l'électrode on obtient que le Pedot et le nitrure de titane déposés sur les électrodes de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre sont bien meilleurs (un rapport 2,57 pour le pedot et 2,45 pour le TiN) que le Pedot et le nitrure de titane déposés sur les électrodes de 30  $\mu\text{m}$  de diamètre (figure 115). Or les matériaux étant les mêmes, les valeurs devraient être similaires si les charges étaient injectées de façon uniforme sur toute la surface de l'électrode. En revanche, lorsque les charges calculées sont divisées par le périmètre les valeurs du Pedot10 et du Pedot 30 ainsi que les valeurs du TiN10 et du TiN30 sont plus proches (un rapport 1,17 pour le pedot et 1,22 pour le TiN) (figure 116).

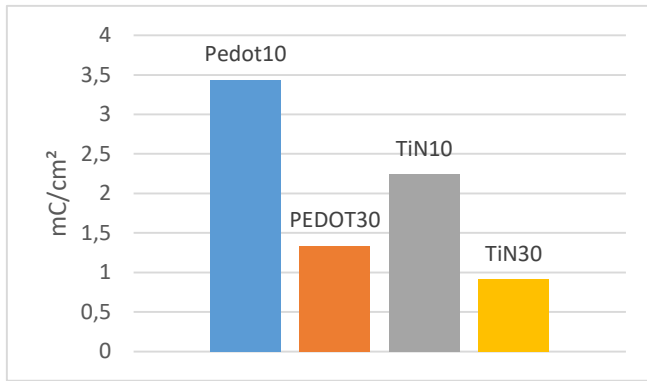


Figure 115 : Charge injectée par méthode fluorescente rapporté à la surface

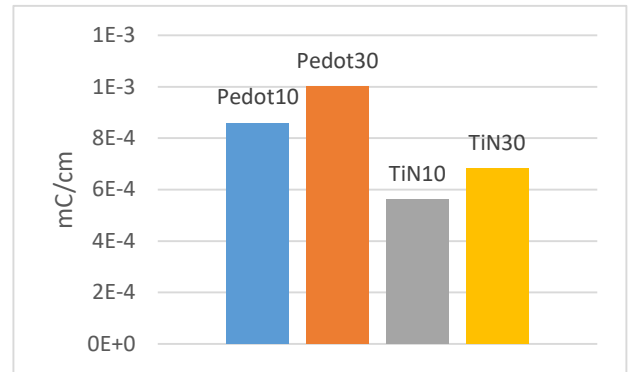


Figure 116 : Charge injectée par méthode fluorescente rapporté au périmètre

Cela soulève donc la question de savoir si présenter tous les CSC de toutes les électrodes en  $mC/cm^2$  est vraiment pertinent. Il semblerait que cela dépende de la méthode de stimulation. En effet, avec les valeurs de CSC obtenues avec les CV, lorsque l'on divise les charges calculées par la surface, les électrodes de 10 et 30  $\mu m$  du même matériau présente des valeurs semblables. On trouve un rapport respectivement un rapport 1,5 et 0,92 pour le Pedot et le TiN (figure 118) alors que les rapports sont de 2 et 3,2 lorsque les charges sont divisées par le périmètre (figure 117).

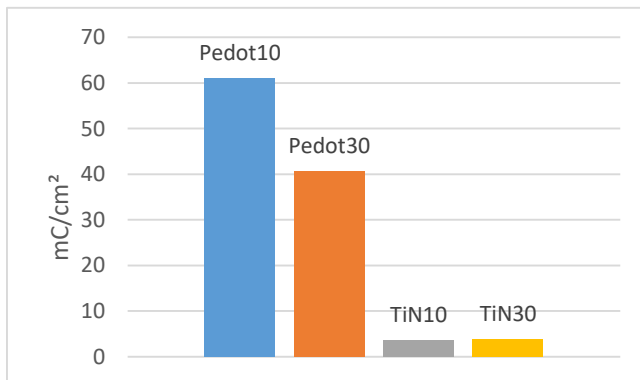


Figure 117 : Charge injectée par méthode Cv rapporté à la surface

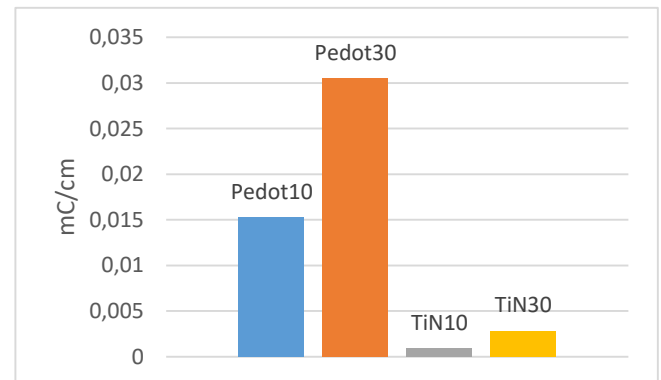


Figure 118 : Charge injectée par méthode CV rapporté au périmètre

Il est donc intéressant d'observer que suivant le mode de stimulation, les densités de courant ne se répartissent pas de la même manière. Lorsque la stimulation est lente comme lors des tests CV, les charges se répartissent plus facilement sur toute la surface de l'électrode. Lorsque la stimulation est rapide, les densités de courant se trouvent être plus importantes sur les bords.

La stimulation des neurones étant réalisée avec des impulsions courtes, la méthode par fluorescence semble être une estimation plus réelle de la capacité à stocker des charges que la méthode par CV. Or dès lors que les électrodes sont caractérisées avec une méthode avec des stimulations courtes et intenses, il est plus approprié de ramener les charges injectées au périmètre.

#### 4.4 Perspectives

La nouvelle méthode de caractérisation avec colorant fluorescent a permis d'évaluer la capacité d'injection de charge de différents matériaux et ainsi d'observer que le diamant et le Pedot sont les

matériaux les plus prometteurs. D'autres matériaux comme le graphène poreux (Lu et al., 2016) ou les platines nanostructurés (Boehler et al., 2015; Heim et al., 2012) pourraient être caractérisés grâce à cette nouvelle méthode.

On a pu observer que les valeurs d'injection de charge obtenues par CV sont bien supérieures aux valeurs obtenues grâce la nouvelle méthode. Cela est principalement dû à la différence de vitesse avec laquelle le courant ou la tension évolue à la surface de l'électrode lors des deux manipulations. Afin de valider notre choix d'utiliser la nouvelle méthode pour obtenir la capacité d'injection de charge, il pourrait être intéressant d'utiliser la méthode du potentiel transitoire afin de comparer les valeurs obtenues par les deux méthodes. Cela permettrait d'évaluer si la nouvelle méthode est plus ou moins sensible que la méthode du potentiel transitoire.



## 5 Conclusion

Dans cette thèse l'objectif final était la création d'un implant intra-cortical permettant d'enregistrer l'activité de neurones individuels. Il existe aujourd'hui de nombreux implants neuronaux utilisés pour enregistrer les potentiels d'actions. Tous ces implants ont des caractéristiques bien différentes. Entre les implants rigides facilement implantables et les implants souples plus difficiles à implanter et les différentes densités d'électrodes, aucun ne permet aujourd'hui d'enregistrer un grand nombre de neurones sur une très longue période de temps. Certains permettent d'enregistrer sur du très long terme le même neurone comme l'implant conique de Kennedy mais ne permet pas de réaliser de la haute densité. Le Utah Array permet d'enregistrer de nombreux neurones simultanément mais ne permet pas de suivre chaque neurone sur une durée très longue à cause de sa rigidité. Pour tenter d'enregistrer sur le long terme un grand nombre de neurones, de nombreuses équipes ont réalisé des implants flexibles de petites dimensions dotés de plusieurs électrodes mais aucun n'est encore utilisé en clinique de manière récurrentes.

Nous avons donc lors de cette thèse tenté de réaliser un implant répondant à tous les critères nécessaires pour enregistrer un grand nombre de potentiels d'action simultanément de manière stable dans le temps. L'implant doit être fin, flexible, biocompatible, haute densité, performant électriquement, stérilisable, avec une bonne connectique, résistant mécaniquement et chimiquement et implantable. Tous ces aspects ont été étudiés dans cette thèse afin de trouver une solution viable pour remplir le cahier des charges assez complexe.

La géométrie de l'implant a donc constitué le premier axe de travail dans cette thèse. Nous avons essayé de trouver la forme d'implant la plus complète possible. Différentes versions ont été nécessaires afin d'optimiser le design du dispositif. Deux premières versions d'implant comportant 256 électrodes ont été réalisées, l'un étant un implant destiné au rat et l'autre au mini-porc. Ces premiers implants hautes densités devraient permettre des enregistrements corticaux sur de nombreux sites avec leurs 16 tentacules comportant 16 électrodes chacune. Les électrodes sont toutes situées à l'extrémité d'un fil très fin libre de ses mouvements. L'un des problèmes majeurs de cet implant est sa connexion à la station d'enregistrement. Le connecteur de l'implant nécessite la création d'un câble spécial pouvant se clipper sur l'implant. Une fois le câble terminé, les implants devront être caractérisés.

En parallèle du développement de ce câble, nous avons choisi de concevoir de nouveaux implants avec une connectique plus « standard ». Ces nouvelles versions comportaient 64 électrodes et pouvaient être connectées à la station d'enregistrement grâce à un connecteur ZIF. Le processus de fabrication des implants a évolué tout au long de la thèse l'objectif étant de trouver un processus rapide et répétable. Pour cela les gravures des métaux ont progressivement toutes été réalisées par plasma. Nous avons fait le choix d'utiliser de la SU-8 pour l'isolant pour sa flexibilité et du platine pour l'électrode pour sa bonne tenue à la corrosion. Afin d'augmenter la résistance mécanique de l'implant, l'utilisation de polyimide est une option que nous envisageons en collaboration avec l'ESIEE. De plus, comme on a pu l'observer dans le dernier chapitre, le PEDOT et le diamant poreux sont beaucoup plus performants que le platine. Il serait donc intéressant de déposer du Pedot sur nos électrodes pour commencer. Le processus de fabrication du diamant étant plus complexe, l'intégration du diamant pourra être envisagée dans un second temps. L'utilisation de nouvelles techniques de fabrication à l'image de l'impression de pistes directement sur le polymère isolant pourrait permettre d'accélérer la fabrication des implants.

Un point important de l'implant est sa fragilité mécanique. L'ajout d'une fine couche de PLGA et d'un film de polyimide a permis de consolider l'implant. Pour éviter la détérioration du connecteur ZIF de l'implant (qui est inséré dans un ZIF) lors des multiples séances d'enregistrement, un circuit imprimé a été créé. Cette petite rallonge connectée à l'implant grâce à l'ACF permet de pouvoir connecter et déconnecter l'implant d'un ZIF à de nombreuses reprises sans endommager l'implant. La connexion entre l'implant et le Cicor n'est pas encore optimale. En effet, entre la difficulté d'aligner proprement l'implant et le Cicor lors de la connexion et le manque d'assurance d'une bonne montée en température de l'ACF lors du thermopressage, tous les implants ont une connexion de qualité variable.

Les implants ont été caractérisés afin de vérifier le bon fonctionnement de l'implant. Le test de la passivation a montré les premières limites de l'implant. Les fils trop fins (11 et 20  $\mu\text{m}$  de large) ne sont pas parfaitement isolés et des bulles ont pu être observées suite à l'envoi de pulse de tension au borne des électrodes. Comme on a pu observer un nombre croissant de bulle se créer le long des fils après les pulses successifs, on peut émettre l'hypothèse que les stimulations ont détérioré l'isolant. D'autres tests seront effectués sur les implants afin de s'assurer du problème. Ces premiers résultats nous poussent à envisager de réaliser des fils plus larges (30  $\mu\text{m}$  ou plus) pour la nouvelle génération d'implant.

Les impédances, les bruits ainsi que la voltamétrie cyclique ont permis de montrer que certaines électrodes de certains implants avaient des caractéristiques électriques intéressantes. Une première mesure des impédances directement sur l'implant (sans le Cicor) donne des impédances autour de 710 KOhm, des valeurs bien inférieures aux électrodes en platine plat de la littérature. Ces valeurs peuvent être la conséquence des nanostructures présentes sur les électrodes en fin de processus de fabrication. Ces nanostructures créées par IBE augmente la surface développée de l'électrode et ainsi fait diminuer l'impédance. Ces nanostructures ont été étudiées à l'EDX, et ce dernier laisse penser qu'un résidu d'aluminium est présent sur ou dans les nanostructures de platine. Des tests avec d'autres matériaux que l'aluminium (qui sert de masque pour réaliser la forme de l'implant) seront réalisés. Les bruits et les impédances des électrodes sont variables d'un implant à l'autre. Nous supposons que cette variabilité provient de la connexion entre le Cicor et l'implant comme expliqué précédemment. Les nouveaux Cicor devrait nous permettre de vérifier cela. Pour les meilleures électrodes, nous avons une impédance autour de 500 KOhm et un bruit autour de 6  $\mu\text{V}$  ce qui correspond aux valeurs de la littérature pour des électrodes en platine plat de 16  $\mu\text{m}$ . La faible valeur d'impédance pouvait laisser présager des valeurs de bruit plus faibles. La mauvaise connexion implant/Cicor est peut-être à l'origine de ce décalage. Pour remédier à cela, de nouveaux Cicors vont être fabriqués qui seront transparents afin de garantir un meilleur alignement. Pour assurer une bonne montée en température, les implants seront connectés après avoir placé sur une feuille en plastique (et non sur un wafer silicium) pour éviter toute dissipation de chaleur. L'utilisation d'autres connecteurs industriels est aussi envisageable pour faciliter la connexion entre le cicor et la carte d'enregistrement. La voltamétrie cyclique nous permet d'observer que nos électrodes se situent entre le platine plat et le platine noir.

Une fois l'implant caractérisé, nous devons trouver la meilleure solution pour insérer les électrodes dans le tissu cortical. Trois méthodes d'insertion ont été testées. Une méthode magnétique ne nous donnant pas satisfaction car les forces créées n'étaient pas assez importantes. Une autre méthode consistant à encapsuler les électrodes dans une pointe biodégradable rigide a donné de premiers résultats intéressants. Des pointes en PLGA ont été réalisées via différents processus de fabrication mais aucun n'a donné de très bons résultats. Les pointes les plus réussies (c'est-à-dire les plus fines et rigides) ont été réalisées par découpe laser mais la largeur des pointes reste importante et un bourrelet se forme sur les bords de la pointe à cause de la température du laser. L'utilisation d'un laser plus fin

pourrait être une solution. D'autres tests pour graver le PLGA par plasma seront aussi testés. Malgré la taille encore importante des pointes en PLGA, l'insertion avec l'utilisation des pointes biodégradables pourrait être testée. L'insertion avec un véhicule de transport est la dernière méthode à avoir été testée et a été choisie pour insérer les électrodes. Le collage des tentacules sur le fil peut encore être optimisé. Lors de l'insertion des fils dans le cortex de rat, les tentacules se détachent parfois du fil. Pour éviter cela, la soudure au PEG doit être réalisée au dernier moment. L'utilisation de la soie est aussi une perspective intéressante. Réaliser et positionner les pointes en soie avec une grande précision par photolithographie semble aussi être une vraie option viable.

Suite à l'implantation des tentacules dans le cortex de rat, des premiers enregistrements chez des rats anesthésiés ou en mouvement ont montré de l'activité neuronale provenant de certaines électrodes. En effet, des potentiels de champs locaux ont été enregistrés suite à des stimuli sensoriels (pressions exercées sur le dos de l'animal). Des potentiels d'actions ont été enregistrés par des électrodes sur un rat implanté depuis plus de 2 semaines. Il n'a pas été possible de faire de lien entre le comportement de l'animal et les potentiels d'actions enregistrés. Lors des futures implantations, il sera intéressant de cibler des zones motrices afin de pouvoir corrélérer les enregistrements et les mouvements du rat.

Le cerveau de certains rats implantés a été soumis à une étude par immunomarquage. Les premiers résultats ont permis d'analyser le comportement du tissu nerveux autour de l'implant. Les premières expériences montrent qu'un morceau de SU-8 de taille trop importante crée des cicatrices gliales et active la microglie. Sur les coupes de cerveau de rats implantés, le tissu autour des fils de l'implant semble être nécrosé. Cela peut être dû à la présence d'hémopatch. Des regroupements astocytaires ainsi que d'importantes communautés de macrophages sont présents autour des fils de l'implants. Il reste à déterminer la cause de cette inflammation qui pourrait être la méthode d'implantation ou la casquette déposée lors de la chirurgie. Afin de confirmer les premiers enregistrements et les premières observations du tissu autour de l'implant, de nombreux rats devraient être implantés. Les électrodes devraient être insérées précisément grâce à un descendeur.

Bien que l'implant de départ ait comme objectif d'enregistrer l'activité corticale, il serait très intéressant de pouvoir les utiliser pour stimuler les neurones. Or la stimulation requiert certaines exigences concernant l'électrode. Il est important de stimuler avec suffisamment d'intensité tout en évitant d'endommager les cellules. Pour cela, le matériau et la topographie de l'électrode sont très importants. Nous avons comparé les différents matériaux utilisés pour la stimulation neuronale grâce à plusieurs méthodes. Les impédances, les bruits ainsi que les capacités d'injection de charge ont été évalués pour chaque matériau. Nous avons évalué une nouvelle méthode pour obtenir la capacité d'injection de charge. Cette technique repose sur l'utilisation d'un colorant fluorescent qui change de fluorescence en fonction du pH. Tous les matériaux ont été testés avec cette méthode et par voltamétrie cyclique. La méthode par voltamétrie cyclique donne des valeurs de capacité d'injection de charge bien supérieures aux valeurs obtenues avec la nouvelle méthode. L'étude a aussi confirmé que le diamant ainsi que le PEDOT sont les matériaux les plus performants pour stimuler efficacement. Pour finir, nous avons observé que plus le pulse utilisé pour stimuler est rapide plus la densité de courant est importante sur les bords de l'électrode. De nouveaux matériaux pourront être testés avec la nouvelle méthode. De plus, il serait intéressant de comparer la sensibilité de notre méthode et de la méthode par mesure du potentiel transitoire.

Les implants corticaux développés aujourd'hui ne répondent pas complètement à tous les besoins. En effet, ils ne permettent pas d'enregistrer et de stimuler simultanément de nombreux sites sur le très long terme. L'arrivée de nouveaux outils combinant diverses technologies capables d'enregistrer et de stimuler les neurones sans provoquer de réactions immunitaires permettraient de réaliser des cartes d'activités cérébrales très complètes. Le développement d'outils d'optogénétiques a ouvert de

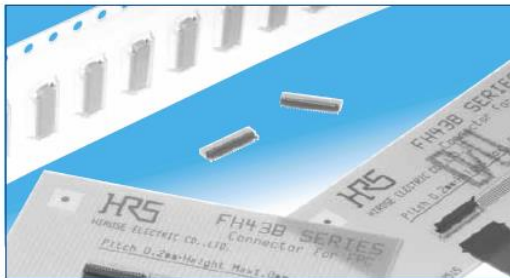
nouvelles possibilités. L'intégration de systèmes optiques et microfluidiques dans les implants offrent également de nouvelles opportunités (Canales et al., 2015; Lee et al., 2015). L'enregistrement et la stimulation des neurones à distance est également un nouvel axe de recherche très prometteur (Seo et al., 2015). Certains matériaux, avec leurs propriétés, peuvent convertir des stimuli optiques, acoustiques et magnétiques en signaux biologiques, et inversement ce qui offrent de belles perspectives.

## 6 Annexe

### 6.1 Annexe 1 : ZIF

## 0.2 mm Pitch, 0.9 mm Height FPC Connectors

### FH43B Series



The staggered lead structure simplifies PCB mounting and provides a low profile height of 0.9 mm and a 2.77 mm mounting width depth.

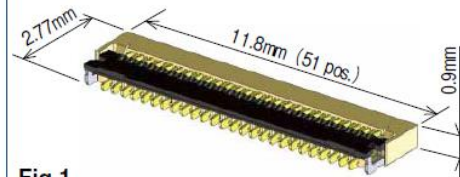


Fig 1.

### ■ Features

#### 1. 0.2 mm pitch low profile bottom contact FPC connector

Maximizes space with contact pitch of 0.2 mm, a mated height of 0.9 mm, and mounted depth of 2.77 mm.

\*45% reduction in occupied PCB area

\*55% reduction in weight

(Compared to our 0.3 mm pitch FH26 Series 51 position connector)

#### 2. Easy PCB mounting

The PCB leads use 0.4 mm pitch and are staggered which simplifies the PCB mounting process.

#### 3. Supports high-speed transmissions

By utilizing differential pairs of identical contacts (even - even contact or odd - odd contacts) these connectors are able to provide superb transmission characteristics and supports eDP (ver. 1.3), MIPI (D-PHY), HDMI (ver 1.3), and USB (3.0) standards.

#### 4. Molded structure aids PCB layout

The bottom of this connector is enclosed by a fully molded structure that protects the contacts and removes any restrictions from PCB patterning and layout design.

#### 5. Rotating one-touch ZIF mechanism

The one-touch rotating ZIF mechanism is easier to operate and works with a light force, and a clear tactile click is delivered upon the successful completion of the mating process.

#### 6. Easy FPC insertion

The FPC aligning mechanism holds onto the FPC prior to locking the actuator.

#### 7. Insertion check window

There is a cutout on the actuator that allows you to visually inspect the FPC to make sure that it is locked into place, preventing incorrect insertion of the FPC.

#### 8. Accepts standard 0.2 mm thick FPC

This connector accepts standard 0.2 mm thick FPC. (A stiffener with adequate strength will prevent FPC deformation and ease insertion and mating.)

#### 9. Halogen-free available (FH43BW Series)

The connector does not use chlorine and bromine exceeding standard limits. (FH43BW Series)

\*Defined in accordance with IEC61249-2-21

Br 900ppm or lower, Cl 900ppm or lower, Br + Cl 1,500ppm or lower

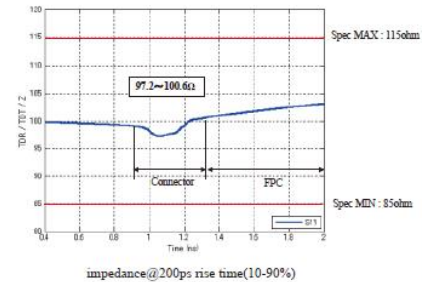
#### 10. Available for 500 pieces packaging

Although the normal product is 5,000 pieces per reel, 500 winds per reel is also available.

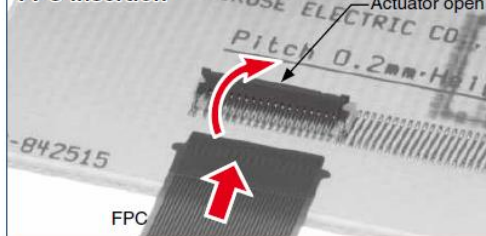
(Emboss reel external diameter is  $\phi$ 180mm.)

#### FH43B differential impedance

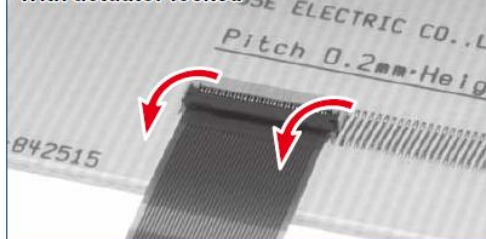
130ps rise time (20-80%)



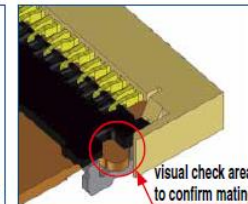
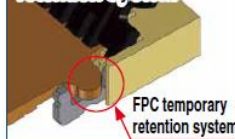
#### FPC insertion



#### With actuator locked



#### FPC temporary retention system



## 6.2 Annexe 2 : Fabrication

### Dépôt CVD

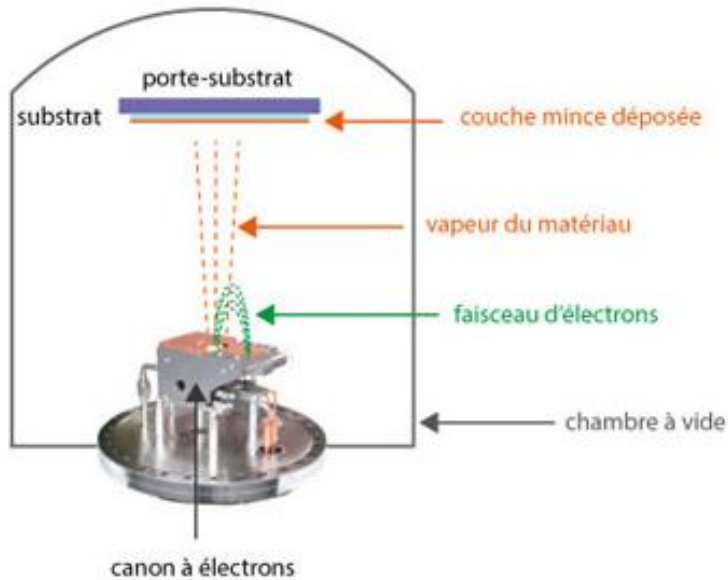


Figure 119 : Schéma de principe du dépôt CVD

Le matériau souhaité est évaporé sous vide dans une enceinte, le vide permettant aux particules d'atteindre directement le substrat où elles se condensent à l'état solide (figure 119).

Le matériau à évaporer est placé dans un creuset en Cuivre où il est chauffé par un faisceau d'électrons émis par un filament de Tungstène et défléchi par un aimant permanent.

### Photolithographie

La résine a les propriétés de polymériser ou non lorsqu'elle est insolée par des rayons ultra-violettes (figure 120). Cette technique utilise les UV pour transférer une forme géométrique d'un photomasque à une "résine photosensible" sur le substrat. La résine peut être positive ou négative. Lorsqu'elle est négative, la résine insolée par les UV polymérise et pendant le développement de la résine, la résine insolée reste tandis que le révélateur enlève la résine vierge d'exposition aux UV. Dans le cas positif, le contraire se produit, et la résine insolée est alors gravée par le développeur.

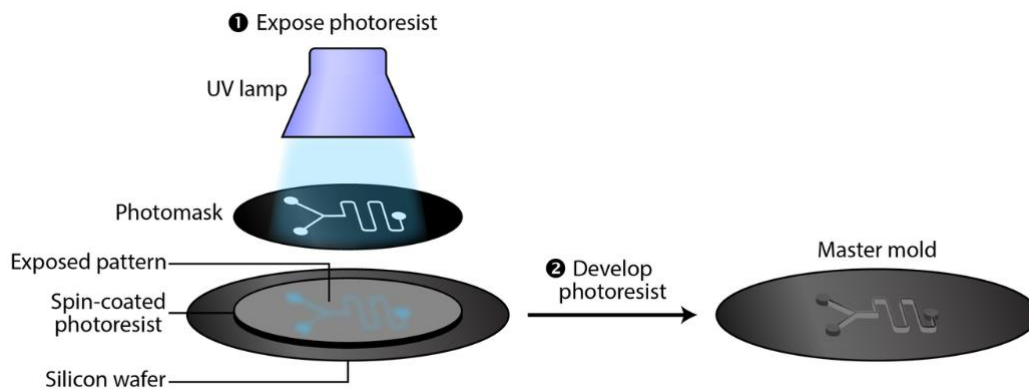


Figure 120 : Schéma de principe de la photolithographie (<http://biomechanicalregulation-lab.org/photolithography/>)

Il existe la photolithographie laser qui permet de réaliser des lithographies sans masques. Le dessin désirée doit être envoyé à la machine. Un laser va ensuite balayer la zone désirée et va faire polymériser la résine. Le laser peut avoir différentes tailles (de 1 à 15  $\mu\text{m}$ ) ce qui va jouer sur le détail des motifs à dessiner et sur le temps de balayage du laser. La lithographie laser est utilisé pour tester différents motifs sans avoir besoin de réaliser un masque physique en chrome.

### Gravure par faisceau d'ion

La gravure ionique (IBE) grave le matériau de la cible par bombardement avec des énergies ioniques dirigées et contrôlées avec précision (figure 121).

Une source d'ions génère un large faisceau d'ions dirigé vers le substrat (ou le produit à structurer). Les ions sont générés dans une chambre de décharge où les atomes d'un gaz (Argon) sont ionisés par un bombardement électronique d'électrons. Les électrons sont émis par un filament de cathode et recueillis par l'anode. Un champ magnétique est utilisé pour contenir les électrons et augmenter la probabilité d'ionisation. Le bombardement d'électrons avec des atomes de gaz forme un gaz ou un plasma conducteur. Une grille polarisée négativement est utilisée pour accélérer les ions qui traversent la grille pour former le faisceau ionique. Le courant et la tension du faisceau peuvent être contrôlés indépendamment pour obtenir l'énergie ionique souhaitée et la densité de courant du faisceau.

Un vide de  $10^{-6}$  Torr à  $10^{-5}$  Torr est créé avec une pompe primaire et une pompe moléculaire à vide poussé. Le vide est nécessaire pour produire le plasma à faisceau d'ions et pour minimiser la contamination du substrat pendant le processus de gravure. Le substrat est généralement monté sur un ensemble rotatif. Plusieurs axes de rotation sont utilisés pour obtenir un profil de gravure uniforme et pour contrôler également l'angle d'incidence du faisceau d'ions.

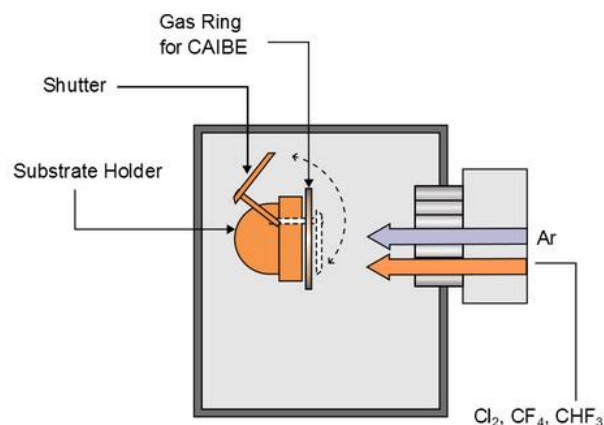


Figure 121 : Schéma de principe de l'IBE  
(<https://plasma.oxinst.com/campaigns/technology/ibe/>)

## Gravure à couplage inductif

La gravure ICP-RIE est basée sur l'utilisation d'une source plasma à couplage inductif (figure 122). La source ICP génère un plasma haute densité en raison du couplage inductif entre l'antenne RF et le plasma. L'antenne, située dans la région de génération du plasma, crée un champ magnétique RF alternatif et induit des champs électriques RF, qui dynamisent les électrons qui participent à l'ionisation des molécules de gaz et des atomes à basse pression. En raison de l'absence de champ électrique à proximité des parois du réacteur, il n'y a pratiquement pas de bombardement ionique ni d'érosion des parois.

La principale différence entre ICP RIE et RIE est la source de puissance RF ICP séparée et connectée à la cathode qui génère une polarisation CC et attire les ions vers la plaquette. Les matériaux sont gravés à l'aide d'un plasma chimiquement réactif dans des conditions de basse pression, potentiellement associé à une attaque chimique induite par des ions.

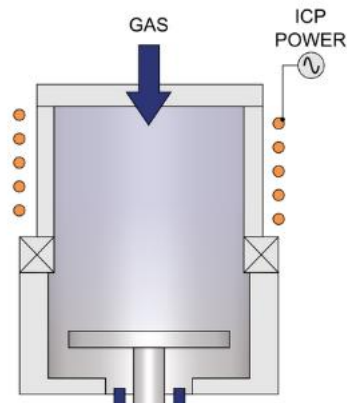


Figure 122 : Schéma de principe de l'ICP  
(<https://plasma.oxinst.com/campaigns/technology/icp>)



## 6.3 Annexe 3 : ACF

# 3M™ Anisotropic Conductive Film 7371

### Product Description

3M™ Anisotropic Conductive Film (ACF) 7371 is a heat-bondable, electrically conductive adhesive film. The unbonded film is slightly tacky at room temperature and consists of a thermoset-elastomer and thermoplastic adhesive matrix randomly loaded with conductive particles. These particles allow interconnection of circuit lines through the adhesive thickness, but are spaced far enough apart for the product to be electrically insulating in the plane of the adhesive. Application of heat and pressure causes the adhesive to flow and to bring the circuit pads into contact by trapping the conductive particles. The adhesive rapidly cross-links at modest bonding temperature and pressure. 3M ACF 7371 may be used to bond a flexible printed circuit to another flexible printed circuit or to a plastic touch screen or plastic flat panel display device.

### Construction

#### General Properties

Property	Value
Adhesive Type	Thermosetting Type
Particle Type	Gold-Coated Polymer
Particle Size	10 micron
Liner Type	Polyester Film with Silicone Release
Adhesive Thickness	25 micron
Liner Thickness	50 micron

### Typical Physical Properties and Performance Characteristics

**Note:** The following technical information and data should be considered representative or typical only and should not be used for specification purposes.

#### Design Requirements

Property	Value	Units
Minimum Space Between Conductors	100 (4)	micron (mil)
Minimum Pitch	200 (8)	micron (mil)
Minimum Pad Area	0.1 (160)	sq. mm (sq. mil)

#### Ambient Physical Properties

Property <sup>(1)</sup>	Test Substrates	Value	Test Method
Interconnect Resistance	Flex-to-PC board <sup>(2)</sup>	< 20 mOhms	3M TM-2314 <sup>(3)</sup>
Interconnect Resistance	Flex-to-Ag-Ink/PET <sup>(4)</sup>	< 20 mOhms	3M TM-2314 <sup>(3)</sup>
Peel Strength	Flex-to-ITO/PET <sup>(5)</sup>	> 700 gf/cm	3M TM-2313 <sup>(6)</sup>
Peel Strength	Flex-to-Ag-Ink/PET <sup>(4)</sup>	> 600 gf/cm	3M TM-2313 <sup>(6)</sup>
Peel Strength	Flex-to-bare-PET <sup>(7)</sup>	> 900 gf/cm	3M TM-2313 <sup>(6)</sup>

(1) For a given application, values may differ depending on particular substrate material or type of circuitry.

(2) Measured for gold/nickel/copper polyimide flex circuits bonded to printed circuit board. Contact overlap area was 0.38 sq. mm. Pad pitch was 500 microns.

(3) 3M internal test method TM-2314 based on IPC 650 - Section 2.6.24. The flex has the shorting strap located near the bond-line to approximate a 4-wire test structure and eliminate most extraneous resistance in the measurement due to the circuit lines.

(4) Measured for gold/nickel/copper polyimide flex circuits bonded to silver-ink/indium-tin-oxide/polyester. Contact overlap area was 2.0 sq. mm. Pad pitch was 2 mm.

(5) Measured for gold/nickel/copper polyimide flex circuits bonded to indium-tin-oxide/polyester. Flex circuit pitch was 500 microns.

(6) 3M internal test method TM-2313 based on IPC 650 - Section 2.4.9.1.

(7) Measured for gold/nickel/copper polyimide flex circuits bonded to bare polyester. Flex circuit pitch was 2 mm.



## 6.4 Annexe 4 : Autoclave

### CYCLES DE STÉRILISATION

#### B 134

CYCLE POUR MATÉRIEL SOLIDE, POREUX OU CREUX ENVELOPPÉ ET NON ENVELOPPÉ

#### B 134 PRION

CYCLE PRION POUR MATÉRIEL SOLIDE, POREUX OU CREUX, ENVELOPPÉ ET NON ENVELOPPÉ

#### B 121

CYCLE POUR MATÉRIEL SOLIDE OU POREUX, ENVELOPPÉ ET NON ENVELOPPÉ, PARTICULIÈREMENT INDIQUÉ POUR LA STÉRILISATION DE MATIÈRES PLASTIQUES, TURBINES ET PIÈCES À MAIN

#### B 134 ⚡

CYCLE RAPIDE POUR MATÉRIEL SOLIDE, POREUX OU CREUX, ENVELOPPÉ ET NON ENVELOPPÉ (1 PLATEAU)

#### B 134 PRION ⚡

CYCLE RAPIDE PRION POUR MATÉRIEL SOLIDE, POREUX OU CREUX ENVELOPPÉ ET NON ENVELOPPÉ (1 PLATEAU)

#### 18 LITRES

TEMPÉRATURE	135,5° C	135,5° C	122,5° C	135,5° C	135,5° C
PRESSION	2,16 bar	2,16 bar	1,16 bar	2,16 bar	2,16 bar
DURÉE PHASE DE STÉRILISATION	4'	18'	20'	3'30"	18'
DURÉE PHASE DE SÉCHAGE	15'	15'	15'	5'	5'
CHARGE MAXIMALE SOLIDE/POREUSE	4,5 kg / 1,5 kg	4,5 kg / 1,5 kg	4,5 kg / 1,5 kg	0,6 kg / 0,2 kg	0,6 kg / 0,2 kg
DURÉE TOTALE AVEC CHARGE STANDARD*	42'	56'	58'	33'	47'

#### 24 LITRES

TEMPÉRATURE	135,5° C	135,5° C	122,5° C	135,5° C	135,5° C
PRESSION	2,16 bar	2,16 bar	1,16 bar	2,16 bar	2,16 bar
DURÉE PHASE DE STÉRILISATION	4'	18'	20'	3'30"	18'
DURÉE PHASE DE SÉCHAGE	15'	15'	15'	5'	5'
CHARGE MAXIMALE SOLIDE/POREUSE	6 kg / 2 kg	6 kg / 2 kg	6 kg / 2 kg	0,6 kg / 0,2 kg	0,6 kg / 0,2 kg
DURÉE TOTALE AVEC CHARGE STANDARD*	41'	55'	54'	32'	46'

#### 18 LITRES STEAM GENERATOR

DURÉE TOTALE AVEC CHARGE STANDARD*	32'	49'	45'	28'	45'
------------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----

#### 24 LITRES STEAM GENERATOR

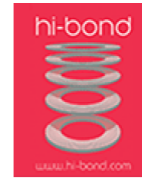
DURÉE TOTALE AVEC CHARGE STANDARD*	32'	49'	45'	28'	45'
------------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----

\*Les durées s'entendent sans la phase de préchauffage et la phase de séchage. Toutes les durées sont fonction de la charge et de l'alimentation électrique.

## 6.5 Annexe 5 : Kapton

### Bondplus Electrical Tapes

The Bondplus +- range of high performance electrical tapes feature high quality films and foils coated to precise coat-weights with silicone, acrylic and electrically conductive adhesives.



These tapes are suitable for the most demanding of applications within the electronics industries with a wide range of uses, suitable for die- cutting to precise tolerances for intricate surface protection and masking application.

HB 830, HB 830FL, HB 930, HB 833

High temperature masking, no adhesive residue. Masking terminals on PCB. Very High temperature resistance 250 °C surface protection applications. High temperature clamping, 200 °C, heat resistance, clean removable.

	HB 830	HB 830FL	HB 930	HB 833
Carrier	Polyimide	Polyimide	Polyimide	Polyimide
Adhesive	Silicone	Silicone	Silicone Double Sided	Silicone
Colour	Amber	Amber	Amber	Amber
Thickness Carrier	25	25	25	25
Thickness Total	70	70	100	40
Peel Adhesion (g/25mm)	700	700	600	40
Tensile Strength (kg/mm <sup>2</sup> )	≥ 7	≥ 7	≥ 7	≥ 7
Elongation %	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 50
Temperature Resistance °C	250 °C	250 °C	200 °C	250 °C
Dielectric Breakdown (kv)	8			
Electric Resistance (%CM)				

#### Applications

- Electrical insulation
- E.M.I. / R.F.I. shielding
- Fixing Static laminators
- Clamping at high temperatures
- Membrane switch and keypad applications
- Anti-static applications
- P.C.B. Masking
- Surface protection
- Splicing of silicone-coated films, papers etc.
- Bonding to high temperature surfaces.
- Bonding to low energy surfaces.
- Conductive connection & fixing
- Powder coating masking
- Metal process masking (electroplating)

## 6.6 Annexe 6 : Chirurgie

### Chirurgie

#### Anesthésie et mise en place dans le cadre

L'animal subi d'abord une induction anesthésique à l'isoflurane (4%). Ensuite, le rat est pesé. Le poids de l'animal permet de calculer la dose d'anesthésiant à injecter à l'animal. L'anesthésiant est un mélange de xylazine et kétamine : cent microlitres de xylazine (5mg/kg) pour 900 microlitres de kétamine (100 mg/kg). Il faut injecter à l'animal une dose de 10  $\mu$ l pour 100 g. Une demi-dose est ensuite injectée dès lors que d'éventuels signes de réveil chez l'animal sont perceptibles.

Après l'anesthésie, le rat est rasé au niveau du crâne et positionné dans un cadre stéréotaxique (figure 123). Deux barres sont insérées dans les oreilles de l'animal afin de bien fixer le crâne de l'animal.

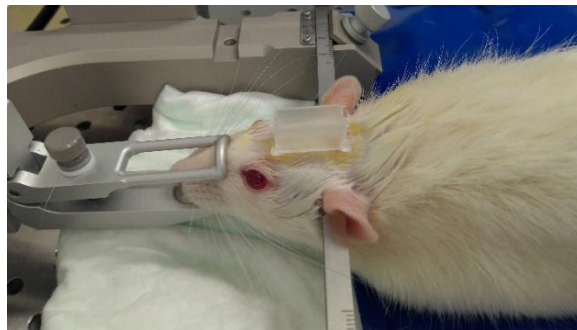


Figure 123 : mise en place de l'animal dans le cadre stéréotaxique

#### Craniotomie

Suite à l'administration d'un anesthésiant local (lidocaïne (100  $\mu$ l/rat), nous incisons la peau au scalpel. Ensuite l'os est dégagé à l'aide d'un coton tige. Une dremelle est ensuite utilisée pour réaliser une craniotomie. Des passages successifs de l'outil suivant une trajectoire rectangulaire permet de créer un volet osseux qui est ensuite retiré pour avoir accès au cerveau. La craniotomie est faite sur l'hémisphère droit de l'animal. Elle représente un rectangle de 0,7 mm par 0,9 mm entre le sillon central et la crête osseuse. Une fois le volet osseux retiré (figure 124), la dure mère est retirée afin de faciliter l'insertion des électrodes flexibles dans le cortex.



Figure 124 : Craniotomie réalisée à la dremell

## Fermeture du site

Dès lors l'insertion des tentacules terminés, il faut couvrir le site de l'opération afin d'éviter que les électrodes bougent, que l'implant s'endommage et que le site s'infecte.



Figure 125 : Passage du cicor dans la casquette après implantation

Le volet osseux est remplacé par un hemopatch faisant office de première couche protectrice. Ensuite une casquette sur mesure imprimé par impression 3D est posée sur le crâne de l'animal (figure 125).

La casquette a plusieurs fonctions distinctes. Elle doit protéger l'implant et la zone de craniotomie tout en laissant passer le cicor pour permettre la connexion avec la carte PCB. Plusieurs stratégies ont été testées en fonction des différentes versions des implants et de la présence ou non du cicor. Comme au départ nous souhaitions insérer le connecteur de l'implant directement dans la carte PCB (le cicor n'existait pas), nous voulions laisser la carte PCB sur le rat en continue. En effet, connecter et déconnecter l'implant de la carte endommagerait beaucoup trop le connecteur de l'implant étant donné sa fragilité.

La casquette alors conçue était très volumineuse 35x28x21 mm (voir figure 126) ce qui pourrait entrainer de gros désagrément pour l'animal.

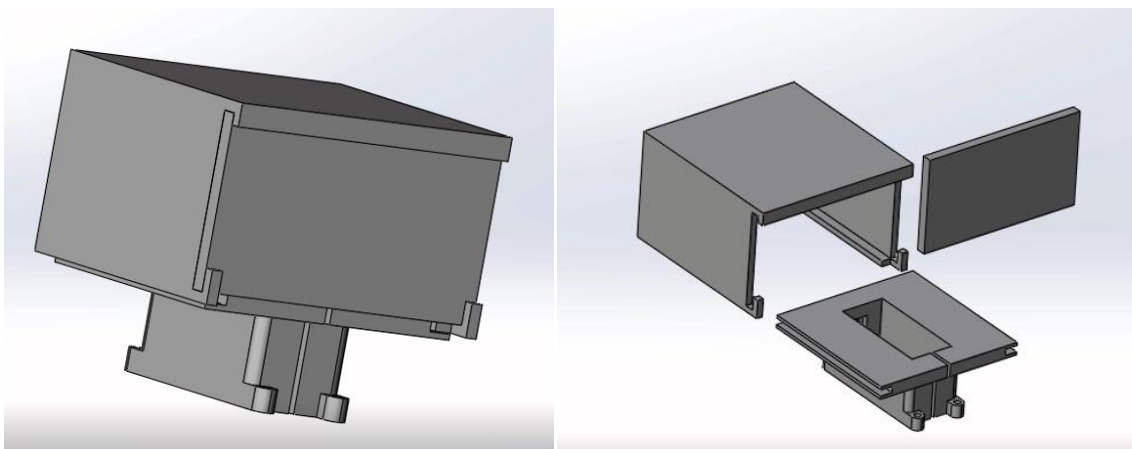


Figure 126 : Casquette rat première version

Suite à la conception du Cicor, nous avons envisagé la conception d'une nouvelle casquette moins volumineuse. Etant donné que connecter et déconnecter le cicor de la carte PCB était possible avec le cicor (beaucoup plus résistant que le connecteur de l'implant), seul l'implant ainsi que le cicor vont

rester en permanence sur le rat. La carte PCB ne sera connectée qu'aux moments des enregistrements. La nouvelle casquette ne doit donc contenir que l'ensemble implant/cicor (voir figure 127). Cette version comporte des murets intérieurs permettant d'attacher le cicor afin que celui-ci ne bouge pas. Le problème majeur de cette casquette est sa hauteur (15 mm) beaucoup trop importante. Le bien-être du rat pourrait être mise à mal avec une structure aussi grande sur le crâne.

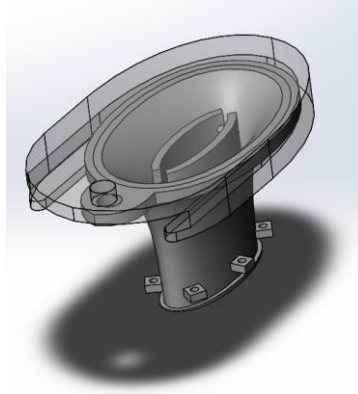


Figure 127 : Casquette rat version 2

Une nouvelle version de casquette a donc été conçue avec des dimensions optimisées. Comme le montre la figure 128, la nouvelle casquette possède des dimensions (19x14x5 mm) bien inférieures que les autres casquettes. On observe qu'une moitié de la casquette est couverte, la craniotomie sera positionnée sous ce « toit ». Le cicor sortira du côté ouvert. On observe deux extensions au fond de la casquette qui serviront pour visser la casquette dans l'os du rat. Les 4 petits trous sur le dessus de la casquette permettent de fixer le chapeau protecteur ou la carte PCB lors des enregistrements.

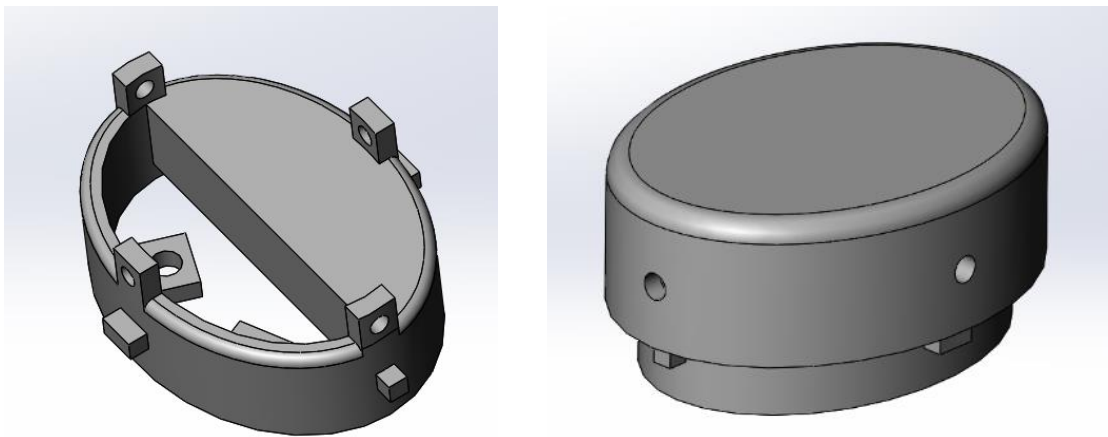


Figure 128 : casquette rat version optimisée, avec (à gauche) et sans chapeau protecteur (à droite)

La forme minimaliste de la casquette permet de ne pas trop perturber le comportement du rat. Ainsi il est aussi possible de mettre 2 rats implantés dans la même cage. Pour les études comportementales il est important que le rat ne soit pas isolé.

La casquette est d'abord fixée au crâne par l'intermédiaire de 2 vis auto-perforantes. Une colle est ensuite appliquée autour de la casquette sur la zone de contact entre la casquette et l'os. La casquette est ensuite remplie de ciment dentaire afin que tout soit stable. La dernière étape consiste à rajouter un chapeau sur la casquette. Le chapeau a pour rôle de protéger le cicor de tout dommage.

## 6.7 Annexe 7 : Protocole d'immunomarquage

Les animaux sont sacrifiés par une dose létale de kétamine/xylazine (200 mg/kg et 10 mg/kg) ou de doléthal (150 mg/kg), puis perfusés par voie transcardiaque avec une exsanguination par solution de PBS héparinée suivie de formaldéhyde à 4%. Les animaux sont ensuite décapités et les têtes sont conservées pendant 48 heures dans la même solution afin de bien fixer les tissus puis rincés avec du PBS.

### **Dissection :**

La casquette sera ouverte par chauffage et l'hémopatch sera délicatement éliminé avec des ciseaux sous une loupe. Les fils reliant l'implant au cicor seront coupés en faisant attention de ne pas pousser ou tirer les électrodes dans le tissu fixé. Le cerveau portant l'implant sera alors séparé du crâne.

Le cerveau est placé dans un bain de PBS. Des tranches de 100 µm ou 50 µm sont coupées avec un vibratome (VT1200S, Leica Biosystems, Allemagne).

### **Immunomarquages :**

Les coupes de tissu sont bloquées avec une solution de PBS contenant 2% BSA et 0,2% Triton-X100 pendant 1 heure à température ambiante. Elles sont ensuite incubées pendant 48 heures à 4°C en présence d'anticorps primaires dilués à 1:200 permettant de détecter la microglie (anti-Iba1, Wako Chemicals, USA), l'astroglie (anti-GFAP, Abcam, Cambridge, UK), neurofilament (anti- NF200, Abcam, Cambridge, UK), la rupture de la barrière hémato-encéphalique (anti-IgG de rat, Abcam, Cambridge, UK), la laminine (Abcam, Cambridge, UK).

Les coupes sont alors rincées trois fois pendant 1 heure avec du PBS puis incubées avec différentes combinaisons d'anticorps secondaires dilués à 1:1000 d'âne conjugués à l'Alexa Fluor (tous les anticorps secondaires proviennent de Abcam, Cambridge, UK, sauf AF546 anti-IgG de lapin, AF546 anti-IgG de chèvre, AF546 anti-IgG de souris, AF647 anti IgG de lapin (Invitrogen, Carlsbad, USA) pendant 48 heures à 4°C.

Les coupes sont rincées trois fois pendant 1 heure avec du PBS et montées avec du Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame California, USA).

Les lames sont observées avec un microscope confocal à haute résolution Airyscan (LSM 710, Carl Zeiss Microscopy, Allemagne).

## 7 Bibliographie

- Adrian, E.D., and Bronk, D.W. (1929). The discharge of impulses in motor nerve fibres: Part II. The frequency of discharge in reflex and voluntary contractions. *J. Physiol.* *67*, 9–151.
- Altuna, A., Menendez de la Prida, L., Bellistri, E., Gabriel, G., Guimerá, A., Berganzo, J., Villa, R., and Fernández, L.J. (2012). SU-8 based microprobes with integrated planar electrodes for enhanced neural depth recording. *Biosens. Bioelectron.* *37*, 1–5.
- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O’Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* *532*, 195–200.
- Aregueta-Robles, U.A., Woolley, A.J., Poole-Warren, L.A., Lovell, N.H., and Green, R.A. (2014). Organic electrode coatings for next-generation neural interfaces. *Front. Neuroengineering* *7*.
- Asplund, M., Thaning, E., Lundberg, J., Sandberg-Nordqvist, A.C., Kostyszyn, B., Inganäs, O., and von Holst, H. (2009). Toxicity evaluation of PEDOT/biomolecular composites intended for neural communication electrodes. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* *4*, 045009.
- Attard, G.S. (1997). Mesoporous Platinum Films from Lyotropic Liquid Crystalline Phases. *Science* *278*, 838–840.
- Averbeck, B.B. (2009). Poisson or Not Poisson: Differences in Spike Train Statistics between Parietal Cortical Areas. *Neuron* *62*, 310–311.
- Azemi, E., Lagenaur, C.F., and Cui, X.T. (2011). The surface immobilization of the neural adhesion molecule L1 on neural probes and its effect on neuronal density and gliosis at the probe/tissue interface. *Biomaterials* *32*, 681–692.
- Baek, S., Green, R.A., and Poole-Warren, L.A. (2014). Effects of dopants on the biomechanical properties of conducting polymer films on platinum electrodes. *J. Biomed. Mater. Res. A* *102*, 2743–2754.
- Barrese, J.C., Rao, N., Paroo, K., Triebwasser, C., Vargas-Irwin, C., Franquemont, L., and Donoghue, J.P. (2013). Failure mode analysis of silicon-based intracortical microelectrode arrays in non-human primates. *J. Neural Eng.* *10*, 066014.
- Bendali, A., Rousseau, L., Lissorgues, G., Scorsoni, E., Djilas, M., Dégardin, J., Dubus, E., Fouquet, S., Benosman, R., Berganzo, P., et al. (2015). Synthetic 3D diamond-based electrodes for flexible retinal neuroprostheses: Model, production and in vivo biocompatibility. *Biomaterials* *67*, 73–83.
- Berger, H. (1929). Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Arch. Für Psychiatr. Nervenkrankh.* *87*, 527–570.
- Bernert, M., and Yvert, B. (2017). Fully unsupervised online spike sorting based on an artificial spiking neural network. *BioRxiv*.
- Bhandari, R., Negi, S., and Solzbacher, F. (2010). Wafer-scale fabrication of penetrating neural microelectrode arrays. *Biomed. Microdevices* *12*, 797–807.



- Bhatti, P., Van Beek-King, J., Sharpe, A., Crawford, J., Tridandapani, S., McKinnon, B., and Blake, D. (2015). Highly Flexible Silicone Coated Neural Array for Intracochlear Electrical Stimulation. *BioMed Res. Int.* 2015, 1–10.
- Bhushan, B., and Jung, Y.C. (2011). Natural and biomimetic artificial surfaces for superhydrophobicity, self-cleaning, low adhesion, and drag reduction. *Prog. Mater. Sci.* 56, 1–108.
- Bjornsson, C.S., Oh, S.J., Al-Kofahi, Y.A., Lim, Y.J., Smith, K.L., Turner, J.N., De, S., Roysam, B., Shain, W., and Kim, S.J. (2006). Effects of insertion conditions on tissue strain and vascular damage during neuroprosthetic device insertion. *J. Neural Eng.* 3, 196–207.
- Bjugstad, K.B., Lampe, K., Kern, D.S., and Mahoney, M. (2010). Biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: An analysis of the glial response across space and time. *J. Biomed. Mater. Res. A* 95A, 79–91.
- Boehler, C., Stieglitz, T., and Asplund, M. (2015). Nanostructured platinum grass enables superior impedance reduction for neural microelectrodes. *Biomaterials* 67, 346–353.
- Bredeson, S.D., and Troyk, P.R. (2014). Device for the implantation of neural electrode arrays. In 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, (Chicago, IL: IEEE), pp. 434–437.
- Brummer, S.B., and Turner, M.J. (1977). Electrochemical considerations for safe electrical stimulation of the nervous system with platinum electrodes. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 24, 59–63.
- Burdick, M.M., McCarty, O.J.T., Jadhav, S., and Konstantopoulos, K. (2001). Cell-cell interactions in inflammation and cancer metastasis. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 20, 86–91.
- Bussy, C., Al-Jamal, K.T., Boczkowski, J., Lanone, S., Prato, M., Bianco, A., and Kostarelos, K. (2015). Microglia Determine Brain Region-Specific Neurotoxic Responses to Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *ACS Nano* 9, 7815–7830.
- Butson, C.R., Maks, C.B., and McIntyre, C.C. (2006). Sources and effects of electrode impedance during deep brain stimulation. *Clin. Neurophysiol.* 117, 447–454.
- Buzsáki, G., Anastassiou, C.A., and Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 407–420.
- Cai, Y., Edin, F., Jin, Z., Alexsson, A., Gudjonsson, O., Liu, W., Rask-Andersen, H., Karlsson, M., and Li, H. (2016). Strategy towards independent electrical stimulation from cochlear implants: Guided auditory neuron growth on topographically modified nanocrystalline diamond. *Acta Biomater.* 31, 211–220.
- Canales, A., Jia, X., Froriep, U.P., Koppes, R.A., Tringides, C.M., Selvidge, J., Lu, C., Hou, C., Wei, L., Fink, Y., et al. (2015). Multifunctional fibers for simultaneous optical, electrical and chemical interrogation of neural circuits in vivo. *Nat. Biotechnol.* 33, 277–284.
- Carretero, N.M., Lichtenstein, M.P., Pérez, E., Cabana, L., Suñol, C., and Casañ-Pastor, N. (2014). IrOx-carbon nanotube hybrids: A nanostructured material for electrodes with increased charge capacity in neural systems. *Acta Biomater.* 10, 4548–4558.
- Casanova, F., Carney, P.R., and Sarntinoranont, M. (2014). In vivo evaluation of needle force and friction stress during insertion at varying insertion speed into the brain. *J. Neurosci. Methods* 237, 79–89.

- Castagnola, E., Maiolo, L., Maggolini, E., Minotti, A., Marrani, M., Maita, F., Pecora, A., Angotzi, G.N., Ansaldo, A., Boffini, M., et al. (2015a). PEDOT-CNT-Coated Low-Impedance, Ultra-Flexible, and Brain-Conformable Micro-ECoG Arrays. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* *23*, 342–350.
- Castagnola, V., Descamps, E., Lecestre, A., Dahan, L., Remaud, J., Nowak, L.G., and Bergaud, C. (2015b). Parylene-based flexible neural probes with PEDOT coated surface for brain stimulation and recording. *Biosens. Bioelectron.* *67*, 450–457.
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., and Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 2050–2055.
- Ceyssens, F., and Puers, R. (2015). Insulation lifetime improvement of polyimide thin film neural implants. *J. Neural Eng.* *12*, 054001.
- Cham, J.G., Branchaud, E.A., Nenadic, Z., Greger, B., Andersen, R.A., and Burdick, J.W. (2005). Semi-chronic motorized microdrive and control algorithm for autonomously isolating and maintaining optimal extracellular action potentials. *J. Neurophysiol.* *93*, 570–579.
- Chang, S.-M., Jou, J.-H., Hsieh, A., Chen, T.-H., Chang, C.-Y., Wang, Y.-H., and Huang, C.-M. (2001). Characteristic study of anisotropic-conductive <sup>®</sup>Im for chip-on-<sup>®</sup>Im packaging. *Microelectron. Reliab.* *9*.
- Charlier, J.-C., Blase, X., and Roche, S. (2007). Electronic and transport properties of nanotubes. *Rev. Mod. Phys.* *79*, 677–732.
- Chen, N., Tian, L., Patil, A.C., Peng, S., Yang, I.H., Thakor, N.V., and Ramakrishna, S. (2017a). Neural interfaces engineered via micro- and nanostructured coatings. *Nano Today* *14*, 59–83.
- Chen, S., Pei, W., Gui, Q., Tang, R., Chen, Y., Zhao, S., Wang, H., and Chen, H. (2013). PEDOT/MWCNT composite film coated microelectrode arrays for neural interface improvement. *Sens. Actuators Phys.* *193*, 141–148.
- Chen, Y.-M., Chung, T.-W., Wu, P.-W., and Chen, P.-C. (2017b). A cost-effective fabrication of iridium oxide films as biocompatible electrostimulation electrodes for neural interface applications. *J. Alloys Compd.* *692*, 339–345.
- Cheung, K., Lee, G., Djupsund, K., Dan, Y., and Lee, L.P. (2000). A new neural probe using SOI wafers with topological interlocking mechanisms. In 1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology. Proceedings (Cat. No.00EX451), pp. 507–511.
- Cheung, K.C., Renaud, P., Tanila, H., and Djupsund, K. (2007). Flexible polyimide microelectrode array for in vivo recordings and current source density analysis. *Biosens. Bioelectron.* *22*, 1783–1790.
- Chung, T., Wang, J.Q., Wang, J., Cao, B., Li, Y., and Pang, S.W. (2015). Electrode modifications to lower electrode impedance and improve neural signal recording sensitivity. *J. Neural Eng.* *12*, 056018.
- Ciraci, S., Dag, S., Yildirim, T., Gülseren, O., and Senger, R.T. (2004). Functionalized carbon nanotubes and device applications. *J. Phys. Condens. Matter* *16*, R901.
- Cogan, S.F. (2008). Neural stimulation and recording electrodes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *10*, 275–309.

- Cogan, S.F., Plante, T.D., and Ehrlich, J. (2004). Sputtered iridium oxide films (SIROFs) for low-impedance neural stimulation and recording electrodes. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.* 6, 4153–4156.
- Collinger, J.L., Foldes, S., Bruns, T.M., Wodlinger, B., Gaunt, R., and Weber, D.J. (2013). Neuroprosthetic technology for individuals with spinal cord injury. *J. Spinal Cord Med.* 36, 258–272.
- Cooley, R.K., and Vanderwolf, C.H. (1978). Construction of wire leads and electrodes for use in slow wave recording in small animals. *Brain Res. Bull.* 3, 175–179.
- Crompton, K.E., Goud, J.D., Bellamkonda, R.V., Gengenbach, T.R., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., and Forsythe, J.S. (2007). Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering. *Biomaterials* 28, 441–449.
- Crone, N.E., Miglioretti, D.L., Gordon, B., and Lesser, R.P. (1998). Functional mapping of human sensorimotor cortex with electrocorticographic spectral analysis. II. Event-related synchronization in the gamma band. *Brain J. Neurol.* 121 ( Pt 12), 2301–2315.
- Crone, N.E., Boatman, D., Gordon, B., and Hao, L. (2001). Induced electrocorticographic gamma activity during auditory perception. Brazier Award-winning article, 2001. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 112, 565–582.
- Cui, X., and Martin, D.C. (2003). Electrochemical deposition and characterization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on neural microelectrode arrays. *Sens. Actuators B Chem.* 89, 92–102.
- Cui, X.T., and Zhou, D.D. (2007). Poly (3,4-Ethylenedioxythiophene) for Chronic Neural Stimulation. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 15, 502–508.
- Desai, S.A., Rolston, J.D., Guo, L., and Potter, S.M. (2010). Improving Impedance of Implantable Microwire Multi-Electrode Arrays by Ultrasonic Electroplating of Durable Platinum Black. *Front. Neuroengineering* 3.
- Domart, M.-C., Hobday, T.M.C., Peddie, C.J., Chung, G.H.C., Wang, A., Yeh, K., Jethwa, N., Zhang, Q., Wakelam, M.J.O., Woscholski, R., et al. (2012). Acute manipulation of diacylglycerol reveals roles in nuclear envelope assembly & endoplasmic reticulum morphology. *PLoS One* 7, e51150.
- Dong, S., Chen, W., Wang, X., Zhang, S., Xu, K., and Zheng, X. (2017). Flexible ECoG electrode for implantation and neural signal recording applications. *Vacuum* 140, 96–100.
- Dryg, I.D., Ward, M.P., Qing, K.Y., Mei, H., Schaffer, J.E., and Irazoqui, P.P. (2015). Magnetically Inserted Neural Electrodes: Tissue Response and Functional Lifetime. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 23, 562–571.
- Egert, U., Schlosshauer, B., Fennrich, S., Nisch, W., Fejtl, M., Knott, T., Müller, T., and Hämmerle, H. (1998). A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Res. Protoc.* 2, 229–242.
- Eng, L.F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 8, 203–214.
- Ereifej, E.S., Cheng, M.M.-C., Mao, G., and VandeVord, P.J. (2013a). Examining the inflammatory response to nanopatterned polydimethylsiloxane using organotypic brain slice methods. *J. Neurosci. Methods* 217, 17–25.

- Ereifej, E.S., Matthew, H.W., Newaz, G., Mukhopadhyay, A., Auner, G., Salakhutdinov, I., and VandeVord, P.J. (2013b). Nanopatterning effects on astrocyte reactivity. *J. Biomed. Mater. Res. A* *101*, 1743–1757.
- Evarts, E.V. (1968). Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement. *J. Neurophysiol.* *31*, 14–27.
- Fabbro, A., Villari, A., Laishram, J., Scaini, D., Toma, F.M., Turco, A., Prato, M., and Ballerini, L. (2012). Spinal cord explants use carbon nanotube interfaces to enhance neurite outgrowth and to fortify synaptic inputs. *ACS Nano* *6*, 2041–2055.
- Fattahi, P., Yang, G., Kim, G., and Abidian, M.R. (2014). A Review of Organic and Inorganic Biomaterials for Neural Interfaces. *Adv. Mater.* *26*, 1846–1885.
- Feldman, K.E., and Martin, D.C. (2012). Substituted 3,4-propylenedioxythiophene monomers and 3,4-propylenedioxythiophene-based crosslinkers and polymers thereof.
- Felix, S.H., Shah, K.G., Tolosa, V.M., Sheth, H.J., Tooker, A.C., Delima, T.L., Jadhav, S.P., Frank, L.M., and Pannu, S.S. (2013). Insertion of Flexible Neural Probes Using Rigid Stiffeners Attached with Biodissolvable Adhesive. *J. Vis. Exp.*
- Fiáth, R., Raducanu, B.C., Musa, S., Andrei, A., Lopez, C.M., van Hoof, C., Ruther, P., Aarts, A., Horváth, D., and Ulbert, I. (2018). A silicon-based neural probe with densely-packed low-impedance titanium nitride microelectrodes for ultrahigh-resolution in vivo recordings. *Biosens. Bioelectron.* *106*, 86–92.
- Fozdar, D.Y., Lee, J.Y., Schmidt, C.E., and Chen, S. (2010). Hippocampal neurons respond uniquely to topographies of various sizes and shapes. *Biofabrication* *2*, 035005.
- Frampton, J.P., Hynd, M.R., Williams, J.C., Shuler, M.L., and Shain, W. (2007). Three-dimensional hydrogel cultures for modeling changes in tissue impedance around microfabricated neural probes. *J. Neural Eng.* *4*, 399–409.
- Frampton, J.P., Hynd, M.R., Shuler, M.L., and Shain, W. (2010). Effects of glial cells on electrode impedance recorded from neuralprosthetic devices in vitro. *Ann. Biomed. Eng.* *38*, 1031–1047.
- Fromherz, P., Offenhausser, A., Vetter, T., and Weis, J. (1991). A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science* *252*, 1290–1293.
- Gabriel, G., Gómez, R., Bongard, M., Benito, N., Fernández, E., and Villa, R. (2009). Easily made single-walled carbon nanotube surface microelectrodes for neuronal applications. *Biosens. Bioelectron.* *24*, 1942–1948.
- Ganguly, K., and Carmena, J.M. (2009). Emergence of a Stable Cortical Map for Neuroprosthetic Control. *PLOS Biol.* *7*, e1000153.
- Garrett, D.J., Tong, W., Simpson, D.A., and Meffin, H. (2016). Diamond for neural interfacing: A review. *Carbon* *102*, 437–454.
- Ge, D., and Farina, D. (2013). Spike Sorting. In *Introduction to Neural Engineering for Motor Rehabilitation*, (Wiley-Blackwell), pp. 155–172.
- Geddes, L.A., and Roeder, R. (2003). Criteria for the selection of materials for implanted electrodes. *Ann. Biomed. Eng.* *31*, 879–890.

- Genton, C.Y. (2006). L'IMMUNOHISTOCHIMIE Son principe, ses applications et ses limites..pdf. 3, 477–481.
- Georgiev, A., Dimov, D., Spassova, E., Assa, J., Dineff, P., and Danev, G. (2012). Chemical and Physical Properties of Polyimides: Biomedical and Engineering Applications. In High Performance Polymers - Polyimides Based - From Chemistry to Applications, M. Abadie, ed. (InTech), p.
- Ghosh, M. (1996). Polyimides: Fundamentals and Applications (CRC Press).
- Gilletti, A., and Muthuswamy, J. (2006). Brain micromotion around implants in the rodent somatosensory cortex. *J. Neural Eng.* 3, 189–195.
- Godin, D.T., Parker, P.A., and Scott, R.N. (1991). Noise characteristics of stainless-steel surface electrodes. *Med. Biol. Eng. Comput.* 29, 585–590.
- Gottipati, M.K., Kalinina, I., Bekyarova, E., Haddon, R.C., and Parpura, V. (2012). Chemically functionalized water-soluble single-walled carbon nanotubes modulate morpho-functional characteristics of astrocytes. *Nano Lett.* 12, 4742–4747.
- Gray, C.M., Maldonado, P.E., Wilson, M., and McNaughton, B. (1995). Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. *J. Neurosci. Methods* 63, 43–54.
- Green, T.A. (2014). Gold etching for microfabrication. *Gold Bull.* 47, 205–216.
- Green, R.A., Lovell, N.H., Wallace, G.G., and Poole-Warren, L.A. (2008). Conducting polymers for neural interfaces: challenges in developing an effective long-term implant. *Biomaterials* 29, 3393–3399.
- Green, R.A., Hassarati, R.T., Bouchinet, L., Lee, C.S., Cheong, G.L.M., Yu, J.F., Dodds, C.W., Suaning, G.J., Poole-Warren, L.A., and Lovell, N.H. (2012). Substrate dependent stability of conducting polymer coatings on medical electrodes. *Biomaterials* 33, 5875–5886.
- Green, R.A., Matteucci, P.B., Hassarati, R.T., Giraud, B., Dodds, C.W.D., Chen, S., Byrnes-Preston, P.J., Suaning, G.J., Poole-Warren, L.A., and Lovell, N.H. (2013). Performance of conducting polymer electrodes for stimulating neuroprosthetics. *J. Neural Eng.* 10, 016009.
- Grill, W.M. (2008). Signal Considerations for Chronically Implanted Electrodes for Brain Interfacing. In *Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment*, W.M. Reichert, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis), p.
- Grill, W.M., Norman, S.E., and Bellamkonda, R.V. (2009). Implanted neural interfaces: biochallenges and engineered solutions. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 11, 1–24.
- Grundfest, H., Sengstaken, R.W., Oettinger, W.H., and Gurry, R.W. (1950). Stainless Steel Micro-Needle Electrodes Made by Electrolytic Pointing. *Rev. Sci. Instrum.* 21, 360–361.
- Guimard, N.K., Gomez, N., and Schmidt, C.E. (2007). Conducting polymers in biomedical engineering. *Prog. Polym. Sci.* 32, 876–921.
- Halpern, J.M., Cullins, M.J., Chiel, H.J., and Martin, H.B. (2010). Chronic in vivo nerve electrical recordings of *Aplysia californica* using a boron-doped polycrystalline diamond electrode. *Diam. Relat. Mater.* 19, 178–181.

- Hämäläinen, M., Hari, R., Ilmoniemi, R.J., Knuutila, J., and Lounasmaa, O.V. (1993). Magnetoencephalography—theory, instrumentation, and applications to noninvasive studies of the working human brain. *Rev. Mod. Phys.* *65*, 413–497.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *391*, 85–100.
- Hammarin, G., Persson, H., Dabkowska, A.P., and Prinz, C.N. (2014). Enhanced laminin adsorption on nanowires compared to flat surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *122*, 85–89.
- Hara, S.A., Kim, B.J., Kuo, J.T.W., Lee, C.D., Gutierrez, C.A., Hoang, T., Pikov, V., and Meng, E. (2013). Perforated Parylene sheath electrode array for chronic intracortical recording. In 2013 6th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER), (San Diego, CA, USA: IEEE), pp. 645–648.
- Hara, S.A., Kim, B.J., Kuo, J.T.W., and Meng, E. (2015). An Electrochemical Investigation of the Impact of Microfabrication Techniques on Polymer-Based Microelectrode Neural Interfaces. *J. Microelectromechanical Syst.* *24*, 801–809.
- Harris, P.J.F. (2009). *Carbon Nanotube Science: Synthesis, Properties and Applications* (Cambridge University Press).
- Harris, J.P., Hess, A.E., Rowan, S.J., Weder, C., Zorman, C.A., Tyler, D.J., and Capadona, J.R. (2011). *In vivo* deployment of mechanically adaptive nanocomposites for intracortical microelectrodes. *J. Neural Eng.* *8*, 046010.
- Hassler, C., von Metzen, R.P., Ruther, P., and Stieglitz, T. (2010). Characterization of parylene C as an encapsulation material for implanted neural prostheses. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* *9999B*, NA-NA.
- Hayashi, T., Kim, Y.A., Natsuki, T., and Endo, M. (2007). Mechanical Properties of Carbon Nanomaterials. *ChemPhysChem* *8*, 999–1004.
- He, B., Gao, S., Yuan, H., and Wolpaw, J.R. (2013). Brain–Computer Interfaces. In *Neural Engineering*, B. He, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 87–151.
- He, W., McConnell, G., M. Schneider, T., and Bellamkonda, R. (2007). A Novel Anti-inflammatory Surface for Neural Electrodes. *Adv Mater* *19*, 3529–3533.
- Hébert, C., Warnking, J., Depaulis, A., Garçon, L.A., Mermoux, M., Eon, D., Mailley, P., and Omnès, F. (2015). Microfabrication, characterization and *in vivo* MRI compatibility of diamond microelectrodes array for neural interfacing. *Mater. Sci. Eng. C* *46*, 25–31.
- Hébert, C., Cottance, M., Degardin, J., Scorsone, E., Rousseau, L., Lissorgues, G., Bergonzo, P., and Picaud, S. (2016). Monitoring the evolution of boron doped porous diamond electrode on flexible retinal implant by OCT and *in vivo* impedance spectroscopy. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* *69*, 77–84.
- Hébert, C., Masvidal-Codina, E., Suarez-Perez, A., Calia, A.B., Piret, G., Garcia-Cortadella, R., Illa, X., Del Corro Garcia, E., De la Cruz Sanchez, J.M., Casals, D.V., et al. (2018). Flexible Graphene Solution-Gated Field-Effect Transistors: Efficient Transducers for Micro-Electrocorticography. *Adv. Funct. Mater.* *28*, 1703976.

- Heim, M., Rousseau, L., Reculosa, S., Urbanova, V., Mazzocco, C., Joucla, S., Bouffier, L., Vytras, K., Bartlett, P., Kuhn, A., et al. (2012). Combined macro-/mesoporous microelectrode arrays for low-noise extracellular recording of neural networks. *J. Neurophysiol.* *108*, 1793–1803.
- Helmholtz, H. (1853). Ueber einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche. *Ann. Phys. Chem.* *165*, 211–233.
- Henderson, J.M., Pell, M., O’Sullivan, D.J., McCusker, E.A., Fung, V.S.C., Hedges, P., and Halliday, G.M. (2002). Postmortem analysis of bilateral subthalamic electrode implants in Parkinson’s disease: Postmortem Subthalamic Electrode Changes. *Mov. Disord.* *17*, 133–137.
- Herreras, O. (2016). Local Field Potentials: Myths and Misunderstandings. *Front. Neural Circuits* *10*.
- Herwik, S., Kisban, S., Aarts, A.A.A., Seidl, K., Girardeau, G., Benchenane, K., Zugaro, M.B., Wiener, S.I., Paul, O., Neves, H.P., et al. (2009). Fabrication technology for silicon-based microprobe arrays used in acute and sub-chronic neural recording. *J. Micromechanics Microengineering* *19*, 074008.
- Hess, A.E., Capadona, J.R., Shanmuganathan, K., Hsu, L., Rowan, S.J., Weder, C., Tyler, D.J., and Zorman, C.A. (2011). Development of a stimuli-responsive polymer nanocomposite toward biologically optimized, MEMS-based neural probes. *J. Micromechanics Microengineering* *21*, 054009.
- Hochberg, L.R., Serruya, M.D., Friebs, G.M., Mukand, J.A., Saleh, M., Caplan, A.H., Branner, A., Chen, D., Penn, R.D., and Donoghue, J.P. (2006). Neuronal ensemble control of prosthetic devices by a human with tetraplegia. *Nature* *442*, 164–171.
- Hong, G., Fu, T.-M., Zhou, T., Schuhmann, T.G., Huang, J., and Lieber, C.M. (2015). Syringe Injectable Electronics: Precise Targeted Delivery with Quantitative Input/Output Connectivity. *Nano Lett.* *15*, 6979–6984.
- van Hove, R.P., Sierevelt, I.N., van Royen, B.J., and Nolte, P.A. (2015). Titanium-Nitride Coating of Orthopaedic Implants: A Review of the Literature. *BioMed Res. Int.* *2015*, 1–9.
- Howard, M.A., Volkov, I.O., Mirsky, R., Garell, P.C., Noh, M.D., Granner, M., Damasio, H., Steinschneider, M., Reale, R.A., Hind, J.E., et al. (2000). Auditory cortex on the human posterior superior temporal gyrus. *J. Comp. Neurol.* *416*, 79–92.
- Huang, S.-H., Lin, S.-P., and Chen, J.-J.J. (2014). In vitro and in vivo characterization of SU-8 flexible neuroprobe: From mechanical properties to electrophysiological recording. *Sens. Actuators Phys.* *216*, 257–265.
- Hubel, D.H., and Wiesel, T.N. (1959). Receptive fields of single neurones in the cat’s striate cortex. *J. Physiol.* *148*, 574–591.
- Insanally, M., Trumpis, M., Wang, C., Chiang, C.-H., Woods, V., Palopoli-Trojani, K., Bossi, S., Froemke, R.C., and Viventi, J. (2016). A low-cost, multiplexed  $\mu$ ECoG system for high-density recordings in freely-moving rodents. *J. Neural Eng.* *13*, 026030.
- Jackson, N., and Muthuswamy, J. (2009). Flexible Chip-Scale Package and Interconnect for Implantable MEMS Movable Microelectrodes for the Brain. *J. Microelectromechanical Syst.* *18*, 396–404.
- Jain, A., Kim, Y.-T., McKeon, R.J., and Bellamkonda, R.V. (2006). In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury. *Biomaterials* *27*, 497–504.

- Jan, E., Hendricks, J.L., Husaini, V., Richardson-Burns, S.M., Sereno, A., Martin, D.C., and Kotov, N.A. (2009). Layered Carbon Nanotube-Polyelectrolyte Electrodes Outperform Traditional Neural Interface Materials. *Nano Lett.* *9*, 4012–4018.
- Jaroch, D.B., Ward, M.P., Chow, E.Y., Rickus, J.L., and Irazoqui, P.P. (2009). Magnetic insertion system for flexible electrode implantation. *J. Neurosci. Methods* *183*, 213–222.
- Jellema, T., and Weijnen, J.A.W.M. (1991). A slim needle-shaped multiwire microelectrode for intracerebral recording. *J. Neurosci. Methods* *40*, 203–209.
- Jeyachandran, Y.L., Narayandass, S.K., Mangalaraj, D., Areva, S., and Mielczarski, J.A. (2007). Properties of titanium nitride films prepared by direct current magnetron sputtering. *Mater. Sci. Eng. A* *445–446*, 223–236.
- Jiang, L., and Gao, L. (2006). Fabrication and Characterization of Carbon Nanotube-Titanium Nitride Composites with Enhanced Electrical and Electrochemical Properties. *J. Am. Ceram. Soc.* *89*, 156–161.
- Jin, H.-J., Park, J., Karageorgiou, V., Kim, U.-J., Valluzzi, R., Cebe, P., and Kaplan, D.L. (2005). Water-Stable Silk Films with Reduced  $\beta$ -Sheet Content. *Adv. Funct. Mater.* *15*, 1241–1247.
- Johansson, A., Janting, J., Schultz, P., Hoppe, K., Hansen, I.N., and Boisen, A. (2006). SU-8 cantilever chip interconnection. *J. Micromechanics Microengineering* *16*, 314–319.
- Johnson, J.B. (1928). Thermal Agitation of Electricity in Conductors. *Phys. Rev.* *32*, 97–109.
- Johnson, M.D., Langhals, N.B., and Kipke, D.R. (2006). Neural Interface Dynamics Following Insertion of Hydrous Iridium Oxide Microelectrode Arrays. In *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pp. 3178–3181.
- Kang, X., Liu, J., Tian, H., Yang, B., NuLi, Y., and Yang, C. (2016). Sputtered iridium oxide modified flexible parylene microelectrodes array for electrical recording and stimulation of muscles. *Sens. Actuators B Chem.* *225*, 267–278.
- Karumbaiah, L., Saxena, T., Carlson, D., Patil, K., Patkar, R., Gaupp, E.A., Betancur, M., Stanley, G.B., Carin, L., and Bellamkonda, R.V. (2013). Relationship between intracortical electrode design and chronic recording function. *Biomaterials* *34*, 8061–8074.
- Kashani, H., Heydarzadeh Sohi, M., and Kaypour, H. (2000). Microstructural and physical properties of titanium nitride coatings produced by CVD process. *Mater. Sci. Eng. A* *286*, 324–330.
- Kato, Y., Saito, I., Hoshino, T., Suzuki, T., and Mabuchi, K. (2006). Preliminary Study of Multichannel Flexible Neural Probes Coated with Hybrid Biodegradable Polymer. *4*.
- Kato, Y.X., Furukawa, S., Samejima, K., Hironaka, N., and Kashino, M. (2012). Photosensitive-polyimide based method for fabricating various neural electrode architectures. *Front. Neuroengineering* *5*.
- Kennedy, P.R. (1989). The cone electrode: a long-term electrode that records from neurites grown onto its recording surface. *J. Neurosci. Methods* *29*, 181–193.
- Khodagholy, D., Rivnay, J., Sessolo, M., Gurfinkel, M., Leleux, P., Jimison, L.H., Stavriniidou, E., Herve, T., Saur, S., Owens, R.M., et al. (2013). High transconductance organic electrochemical transistors. *Nat. Commun.* *4*.



- Khodagholy, D., Gelinias, J.N., Thesen, T., Doyle, W., Devinsky, O., Malliaras, G.G., and Buzsáki, G. (2015). NeuroGrid: recording action potentials from the surface of the brain. *Nat. Neurosci.* *18*, 310–315.
- Kim, B.J., and Meng, E. (2016). Review of polymer MEMS micromachining. *J. Micromechanics Microengineering* *26*, 013001.
- Kim, S.-C., and Kim, Y.-H. (2013). Review paper: Flip chip bonding with anisotropic conductive film (ACF) and nonconductive adhesive (NCA). *Curr. Appl. Phys.* *13*, S14–S25.
- Kim, D.-H., Wiler, J.A., Anderson, D.J., Kipke, D.R., and Martin, D.C. (2010). Conducting polymers on hydrogel-coated neural electrode provide sensitive neural recordings in auditory cortex. *Acta Biomater.* *6*, 57–62.
- Kim, E.G.R., John, J.K., Tu, H., Zheng, Q., Loeb, J., Zhang, J., and Xu, Y. (2014). A hybrid silicon–parylene neural probe with locally flexible regions. *Sens. Actuators B Chem.* *195*, 416–422.
- Kim, Y., Kim, J.W., Kim, J., and Noh, M. (2017). A novel fabrication method of Parylene-based microelectrodes utilizing inkjet printing. *Sens. Actuators B Chem.* *238*, 862–870.
- Kindlundh, M., Norlin, P., and Hofmann, U.G. (2004). A neural probe process enabling variable electrode configurations. *Sens. Actuators B Chem.* *102*, 51–58.
- Koerbitzer, B., Krauss, P., Nick, C., Yadav, S., Schneider, J.J., and Thielemann, C. (2016). Graphene electrodes for stimulation of neuronal cells. *2D Mater.* *3*, 024004.
- Köhler, P., Wolff, A., Ejserholm, F., Wallman, L., Schouenborg, J., and Linsmeier, C.E. (2015). Influence of Probe Flexibility and Gelatin Embedding on Neuronal Density and Glial Responses to Brain Implants. *PLOS ONE* *10*, e0119340.
- Köllensperger, P.A., Karl, W.J., Ahmad, M.M., Pike, W.T., and Green, M. (2012). Patterning of platinum (Pt) thin films by chemical wet etching in Aqua Regia. *J. Micromechanics Microengineering* *22*, 067001.
- Kozai, T.D.Y., and Kipke, D.R. (2009). Insertion shuttle with carboxyl terminated self-assembled monolayer coatings for implanting flexible polymer neural probes in the brain. *J. Neurosci. Methods* *184*, 199–205.
- Kozai, T.D.Y., Marzullo, T.C., Hooi, F., Langhals, N.B., Majewska, A.K., Brown, E.B., and Kipke, D.R. (2010). Reduction of neurovascular damage resulting from microelectrode insertion into cerebral cortex using in vivo two-photon mapping. *J. Neural Eng.* *7*, 046011.
- Kozai, T.D.Y., Gugel, Z., Li, X., Gilgunn, P.J., Khilwani, R., Ozdoganlar, O.B., Fedder, G.K., Weber, D.J., and Cui, X.T. (2014a). Chronic tissue response to carboxymethyl cellulose based dissolvable insertion needle for ultra-small neural probes. *Biomaterials* *35*, 9255–9268.
- Kozai, T.D.Y., Alba, N.A., Zhang, H., Kotov, N.A., Gaunt, R.A., and Cui, X.T. (2014b). Nanostructured Coatings for Improved Charge Delivery to Neurons. In *Nanotechnology and Neuroscience: Nano-Electronic, Photonic and Mechanical Neuronal Interfacing*, M. De Vittorio, L. Martiradonna, and J. Assad, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 71–134.
- Kozai, T.D.Y., Jaquins-Gerstl, A.S., Vazquez, A.L., Michael, A.C., and Cui, X.T. (2015). Brain Tissue Responses to Neural Implants Impact Signal Sensitivity and Intervention Strategies. *ACS Chem. Neurosci.* *6*, 48–67.

- Kuwahara, H., Mazaki, N., Takahashi, M., Watanabe, T., Yang, X., and Aizawa, T. (2001). Mechanical properties of bulk sintered titanium nitride ceramics. *Mater. Sci. Eng. A* 319–321, 687–691.
- Kuzum, D., Takano, H., Shim, E., Reed, J.C., Juul, H., Richardson, A.G., de Vries, J., Bink, H., Dichter, M.A., Lucas, T.H., et al. (2014). Transparent and flexible low noise graphene electrodes for simultaneous electrophysiology and neuroimaging. *Nat. Commun.* 5.
- Lacour, S.P., Benmerah, S., Tarte, E., FitzGerald, J., Serra, J., McMahon, S., Fawcett, J., Graudejus, O., Yu, Z., and Morrison, B. (2010). Flexible and stretchable micro-electrodes for in vitro and in vivo neural interfaces. *Med. Biol. Eng. Comput.* 48, 945–954.
- Lago, N., Yoshida, K., Koch, K.P., and Navarro, X. (2007). Assessment of Biocompatibility of Chronically Implanted Polyimide and Platinum Intrafascicular Electrodes. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 54, 281–290.
- Lalanne, J.-B., Paul, W., Oliver, D., and Grütter, P.H. (2011). Note: electrochemical etching of sharp iridium tips. *Rev. Sci. Instrum.* 82, 116105.
- Lawand, N.S., French, P.J., Briaire, J.J., and Frijns, J.H.M. (2012). Thin Titanium Nitride Films Deposited using DC Magnetron Sputtering used for Neural Stimulation and Sensing Purposes. *Procedia Eng.* 47, 726–729.
- Leber, M., Bhandari, R., Mize, J., Warren, D.J., Shandhi, M.M.H., Solzbacher, F., and Negi, S. (2017). Long term performance of porous platinum coated neural electrodes. *Biomed. Microdevices* 19.
- Lecomte, A., Castagnola, V., Descamps, E., Dahan, L., Blatché, M.C., Dinis, T.M., Leclerc, E., Egles, C., and Bergaud, C. (2015). Silk and PEG as means to stiffen a parylene probe for insertion in the brain: toward a double time-scale tool for local drug delivery. *J. Micromechanics Microengineering* 25, 125003.
- Lee, J., Ozden, I., Song, Y.-K., and Nurmikko, A.V. (2015). Transparent intracortical microprobe array for simultaneous spatiotemporal optical stimulation and multichannel electrical recording. *Nat. Methods* 12, 1157–1162.
- Leung, B.K., Biran, R., Underwood, C.J., and Tresco, P.A. (2008). Characterization of microglial attachment and cytokine release on biomaterials of differing surface chemistry. *Biomaterials* 29, 3289–3297.
- Lewitus, D., Smith, K.L., Shain, W., and Kohn, J. (2011). Ultrafast resorbing polymers for use as carriers for cortical neural probes. *Acta Biomater.* 7, 2483–2491.
- Li, C., Sauser, F.E., Azizkhan, R., Ahn, C.H., and Papautsky, I. (2004). Polymer flip-chip bonding of pressure sensors on flexible Kapton film for neonatal catheters. In 17th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems. Maastricht MEMS 2004 Technical Digest, pp. 749–752.
- Li, M., Zhou, Q., and Duan, Y.Y. (2015). Nanostructured porous platinum electrodes for the development of low-cost fully implantable cortical electrical stimulator. *Sens. Actuators B Chem.* 221, 179–186.
- Li, S., Ouyang, M., Liu, T., Bai, W., Yi, H., and Tian, X. (2014). Increase of spike–LFP coordination in rat prefrontal cortex during working memory. *Behav. Brain Res.* 261, 297–304.
- Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J., and Schilling, K. (2005). Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J. Neurosci. Res.* 79, 295–302.

- Lind, G., Linsmeier, C.E., Thelin, J., and Schouenborg, J. (2010). Gelatine-embedded electrodes—a novel biocompatible vehicle allowing implantation of highly flexible microelectrodes. *J. Neural Eng.* *7*, 046005.
- Liu, J., Fu, T.-M., Cheng, Z., Hong, G., Zhou, T., Jin, L., Duvvuri, M., Jiang, Z., Kruskal, P., Xie, C., et al. (2015). Syringe-injectable electronics. *Nat. Nanotechnol.* *10*, 629–636.
- Lo, M., Wang, S., Singh, S., Damodaran, V.B., Kaplan, H.M., Kohn, J., Shreiber, D.I., and Zahn, J.D. (2015). Coating flexible probes with an ultra fast degrading polymer to aid in tissue insertion. *Biomed. Microdevices* *17*.
- Loeb, G.E., Bak, M.J., Salcman, M., and Schmidt, E.M. (1977). Parylene as a Chronically Stable, Reproducible Microelectrode Insulator. *IEEE Trans. Biomed. Eng. BME-24*, 121–128.
- Lovat, V., Pantarotto, D., Lagostena, L., Cacciari, B., Grandolfo, M., Righi, M., Spalluto, G., Prato, M., and Ballerini, L. (2005). Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. *Nano Lett.* *5*, 1107–1110.
- Lozano, A.M., Dostrovsky, J., Chen, R., and Ashby, P. (2002). Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption. *Lancet Neurol.* *1*, 225–231.
- Lu, Y., Lyu, H., Richardson, A.G., Lucas, T.H., and Kuzum, D. (2016). Flexible Neural Electrode Array Based-on Porous Graphene for Cortical Microstimulation and Sensing. *Sci. Rep.* *6*.
- Luan, L., Wei, X., Zhao, Z., Siegel, J.J., Potnis, O., Tuppen, C.A., Lin, S., Kazmi, S., Fowler, R.A., Holloway, S., et al. (2017). Ultraflexible nanoelectronic probes form reliable, glial scar-free neural integration. *Sci. Adv.* *3*, e1601966.
- Luidier, T.M., van Dommelen, M.W., Tibboel, D., Meijers, J.H.C., Ten Kate, F.J.W., Trojanowski, J.Q., and Molenaar, J.C. (1992). Differences in phosphorylation state of neurofilament proteins in ganglionic and aganglionic bowel segments of children with Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* *27*, 815–819.
- Lyck, L., Dalmau, I., Chemnitz, J., Finsen, B., and Schröder, H.D. (2008). Immunohistochemical Markers for Quantitative Studies of Neurons and Glia in Human Neocortex. *J. Histochem. Cytochem.* *56*, 201–221.
- Mahadevappa, M., Weiland, J.D., Yanai, D., Fine, I., Greenberg, R.J., and Humayun, M.S. (2005). Perceptual Thresholds and Electrode Impedance in Three Retinal Prosthesis Subjects. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* *13*, 201–206.
- Mailley, S., Hyland, M., Mailley, P., McLaughlin, J., and McAdams, E. (2002). Electrochemical and structural characterizations of electrodeposited iridium oxide thin-film electrodes applied to neurostimulating electrical signal. *Mater. Sci. Eng. C* *21*, 167–175.
- Marin, C. (2010). Biocompatibility of intracortical microelectrodes: current status and future prospects. *Front. Neuroengineering* *3*.
- Marrese, C.A. (1987). Preparation of strongly adherent platinum black coatings. *Anal. Chem.* *59*, 217–218.
- Márton, G., Bakos, I., Fekete, Z., Ulbert, I., and Pongrácz, A. (2014a). Durability of high surface area platinum deposits on microelectrode arrays for acute neural recordings. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* *25*, 931–940.

- Márton, G., Orbán, G., Kiss, M., Pongrácz, A., and Ulbert, I. (2014b). A Novel Polyimide – Platinum – SU-8 Microelectrode Array for Various Electrophysiological Applications. *Procedia Eng.* *87*, 380–383.
- Matarèse, B.F.E., Feyen, P.L.C., Falco, A., Benfenati, F., Lugli, P., and deMello, J.C. (2018). Use of SU8 as a stable and biocompatible adhesion layer for gold bioelectrodes. *Sci. Rep.* *8*.
- Maynard, E.M., Nordhausen, C.T., and Normann, R.A. (1997). The Utah Intracortical Electrode Array: A recording structure for potential brain-computer interfaces. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *102*, 228–239.
- McCarthy, P.T., Otto, K.J., and Rao, M.P. (2011). Robust penetrating microelectrodes for neural interfaces realized by titanium micromachining. *Biomed. Microdevices* *13*, 503–515.
- McClain, M.A., Clements, I.P., Shafer, R.H., Bellamkonda, R.V., LaPlaca, M.C., and Allen, M.G. (2011). Highly-compliant, microcable neuroelectrodes fabricated from thin-film gold and PDMS. *Biomed. Microdevices* *13*, 361–373.
- McConnell, G.C., Schneider, T.M., and Bellamkonda, R.V. (2007). Acute spatiotemporal changes in neuronal density surrounding microelectrode arrays implanted in rat motor cortex. In 2007 3rd International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering, (Kohala Coast, HI: IEEE), pp. 137–140.
- Meijs, S., Fjorback, M., Jensen, C., Sørensen, S., Rechendorff, K., and Rijkhoff, N.J.M. (2015). Electrochemical properties of titanium nitride nerve stimulation electrodes: an in vitro and in vivo study. *Front. Neurosci.* *9*.
- Mercanzini, A., Cheung, K., Buhl, D., Boers, M., Maillard, A., Colin, P., Bensadoun, J.-C., Bertsch, A., and Renaud, P. (2008). Demonstration of cortical recording using novel flexible polymer neural probes. *Sens. Actuators Phys.* *143*, 90–96.
- Merrill, D.R. (2014). Materials considerations of implantable neuroengineering devices for clinical use. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* *18*, 329–336.
- Merrill, D.R., Bikson, M., and Jefferys, J.G.R. (2005). Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *J. Neurosci. Methods* *141*, 171–198.
- Metz, S., Bertsch, A., and Renaud, P. (2005). Partial release and detachment of microfabricated metal and polymer structures by anodic metal dissolution. *J. Microelectromechanical Syst.* *14*, 383–391.
- Meyer, J.-U., Stieglitz, T., Scholz, O., Haberer, W., and Beutel, H. (2001). High density interconnects and flexible hybrid assemblies for active biomedical implants. *IEEE Trans. Adv. Packag.* *24*, 366–374.
- Mihailoff, G.A., and Haines, D.E. (2018). The Cell Biology of Neurons and Glia. In *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*, (Elsevier), pp. 15-33.e1.
- Millett, D. (2001). Hans Berger: From Psychic Energy to the EEG. *Perspect. Biol. Med.* *44*, 522–542.
- Mora Lopez, C., Putzeys, J., Raducanu, B.C., Ballini, M., Wang, S., Andrei, A., Rochus, V., Vandebriel, R., Severi, S., Van Hoof, C., et al. (2017). A Neural Probe With Up to 966 Electrodes and Up to 384 Configurable Channels in 0.13  $\mu\text{m}$  SOI CMOS. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* *11*, 510–522.
- Moshayedi, P., Ng, G., Kwok, J.C.F., Yeo, G.S.H., Bryant, C.E., Fawcett, J.W., Franze, K., and Guck, J. (2014). The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials* *35*, 3919–3925.

- Moss, J. (2004). Electron microscopy of tissue adherent to explanted electrodes in dystonia and Parkinson's disease. *Brain* *127*, 2755–2763.
- Moxon, K.A., Kalkhoran, N.M., Markert, M., Sambito, M.A., McKenzie, J.L., and Webster, J.T. (2004). Nanostructured surface modification of ceramic-based microelectrodes to enhance biocompatibility for a direct brain-machine interface. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *51*, 881–889.
- Muller, L., Felix, S., Shah, K.G., Lee, K., Pannu, S., and Chang, E.F. (2016). Thin-film, high-density micro-electrocorticographic decoding of a human cortical gyrus. In 2016 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), (Orlando, FL, USA: IEEE), pp. 1528–1531.
- Murarka, S.P., Blech, I.A., and Levinstein, H.J. (1976). Thin-film interaction in aluminum and platinum. *J. Appl. Phys.* *47*, 5175–5181.
- Negi, S., Bhandari, R., Rieth, L., Van Wagenen, R., and Solzbacher, F. (2010). Neural electrode degradation from continuous electrical stimulation: Comparison of sputtered and activated iridium oxide. *J. Neurosci. Methods* *186*, 8–17.
- Nemani, K.V., Moodie, K.L., Brennick, J.B., Su, A., and Gimi, B. (2013). In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C* *33*, 4453–4459.
- Nguyen, J.K., Park, D.J., Skousen, J.L., Hess-Dunning, A.E., Tyler, D.J., Rowan, S.J., Weder, C., and Capadona, J.R. (2014). Mechanically-compliant intracortical implants reduce the neuroinflammatory response. *J. Neural Eng.* *11*, 056014.
- Nicolelis, M.A.L., Dimitrov, D., Carmena, J.M., Crist, R., Lehew, G., Kralik, J.D., and Wise, S.P. (2003). Chronic, multisite, multielectrode recordings in macaque monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 11041–11046.
- Norlin, P., Kindlundh, M., Mouroux, A., Yoshida, K., and Hofmann, U.G. (2002). A 32-site neural recording probe fabricated by DRIE of SOI substrates. *J. Micromechanics Microengineering* *12*, 414.
- Normann, R.A. (2007). Technology Insight: future neuroprosthetic therapies for disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurol.* *3*, 444–452.
- Ohara, Y., Noriki, A., Sakuma, K., Lee, K.W., Murugesan, M., Bea, J., Yamada, F., Fukushima, T., Tanaka, T., and Koyanagi, M. (2009). 10  $\mu\text{m}$  fine pitch Cu/Sn micro-bumps for 3-D super-chip stack.
- O'Keefe, J., and Recce, M.L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* *3*, 317–330.
- de la Oliva, N., Mueller, M., Stieglitz, T., Navarro, X., and del Valle, J. (2018). On the use of Parylene C polymer as substrate for peripheral nerve electrodes. *Sci. Rep.* *8*.
- Ong, X.C., Forssell, M., and Fedder, G.K. (2016). Processing of platinum electrodes for parylene-C based neural probes. In 2016 IEEE 29th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), pp. 509–512.
- Ordenez, J.S., Boehler, C., Schuettler, M., and Stieglitz, T. (2012). Improved polyimide thin-film electrodes for neural implants. In 2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, (San Diego, CA: IEEE), pp. 5134–5137.
- O'Reardon, J.P., Cristancho, P., and Peshek, A.D. (2006). Vagus Nerve Stimulation (VNS) and Treatment of Depression: To the Brainstem and Beyond. *Psychiatry Edgmont Pa Townsh.* *3*, 54–63.

- Palanker, D.V., Huie, P., Vankov, A.B., Freyvert, Y., Fishman, H., Marmor, M.F., and Blumenkranz, M.S. (2004). Attracting retinal cells to electrodes for high-resolution stimulation. F. Manns, P.G. Soderberg, and A. Ho, eds. (San Jose, CA), p. 306.
- Palmer, C. (1978). A microwire technique for recording single neurons in unrestrained animals. *Brain Res. Bull.* 3, 285–289.
- Pancrazio, J.J. (2008). Neural interfaces at the nanoscale. *Nanomed.* 3, 823–830.
- Paralakar, K.J., Lawrence, J.K., and Clement, R.S. (2006). Collagenase-aided insertion of intracortical microelectrode arrays: evaluation of insertion force and chronic recording performance. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.* 1, 2958–2961.
- Park, D.-W., Ness, J.P., Brodnick, S.K., Esquibel, C., Novello, J., Atry, F., Baek, D.-H., Kim, H., Bong, J., Swanson, K.I., et al. (2018). Electrical Neural Stimulation and Simultaneous *in Vivo* Monitoring with Transparent Graphene Electrode Arrays Implanted in GCaMP6f Mice. *ACS Nano* 12, 148–157.
- Parthasarathy, R., Yu, C., and Groves, J.T. (2006). Curvature-modulated phase separation in lipid bilayer membranes. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 22, 5095–5099.
- Patan, M., Shah, T., and Sahin, M. (2006). Charge Injection Capacity of TiN Electrodes for an Extended Voltage Range. In 2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, (New York, NY: IEEE), pp. 890–892.
- Perera, W.R., and Mauretti, G.J. (2010). Method for making an insulated microwire.
- Pérez, E., Lichtenstein, M.P., Suñol, C., and Casañ-Pastor, N. (2015). Coatings of nanostructured pristine graphene-IrOx hybrids for neural electrodes: Layered stacking and the role of non-oxygenated graphene. *Mater. Sci. Eng. C* 55, 218–226.
- Perlin, G.E., and Wise, K.D. (2010). An Ultra Compact Integrated Front End for Wireless Neural Recording Microsystems. *J. Microelectromechanical Syst.* 19, 1409–1421.
- Piret, G., and Prinz, C.N. (2016). Could the use of nanowire structures overcome some of the current limitations of brain electrode implants? *Nanomed.* 11, 745–747.
- Piret, G., Perez, M.-T., and Prinz, C.N. (2013). Neurite outgrowth and synaptophysin expression of postnatal CNS neurons on GaP nanowire arrays in long-term retinal cell culture. *Biomaterials* 34, 875–887.
- Piret, G., Hébert, C., Mazellier, J.-P., Rousseau, L., Scorsone, E., Cottance, M., Lissorgues, G., Heuschkel, M.O., Picaud, S., Bergonzo, P., et al. (2015a). 3D-nanostructured boron-doped diamond for microelectrode array neural interfacing. *Biomaterials* 53, 173–183.
- Piret, G., Perez, M.-T., and Prinz, C.N. (2015b). Support of Neuronal Growth Over Glial Growth and Guidance of Optic Nerve Axons by Vertical Nanowire Arrays. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 18944–18948.
- Pistohl, T., Ball, T., Schulze-Bonhage, A., Aertsen, A., and Mehring, C. (2008). Prediction of arm movement trajectories from ECoG-recordings in humans. *J. Neurosci. Methods* 167, 105–114.
- Polikov, V.S., Tresco, P.A., and Reichert, W.M. (2005). Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J. Neurosci. Methods* 148, 1–18.

- Pothof, F., Anees, S., Leupold, J., Bonini, L., Paul, O., Orban, G.A., and Ruther, P. (2014). Fabrication and characterization of a high-resolution neural probe for stereoelectroencephalography and single neuron recording. In 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, (Chicago, IL: IEEE), pp. 5244–5247.
- Pothof, F., Bonini, L., Lanzilotto, M., Livi, A., Fogassi, L., Orban, G.A., Paul, O., and Ruther, P. (2016). Chronic neural probe for simultaneous recording of single-unit, multi-unit, and local field potential activity from multiple brain sites. *J. Neural Eng.* *13*, 046006.
- Pour Aryan, N., Brendler, C., Rieger, V., Schleeauf, S., Heusel, G., and Rothermel, A. (2012). In vitro study of iridium electrodes for neural stimulation. In 2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, (San Diego, CA: IEEE), pp. 819–822.
- Pranti, A.S., Schander, A., Bödecker, A., and Lang, W. (2017). Highly Stable PEDOT:PSS Coating on Gold Microelectrodes with Improved Charge Injection Capacity for Chronic Neural Stimulation. *Proceedings* *1*, 492.
- Prodanov, D., and Delbeke, J. (2016). Mechanical and Biological Interactions of Implants with the Brain and Their Impact on Implant Design. *Front. Neurosci.* *10*.
- Prohaska, O.J., Olcaytug, F., Pfundner, P., and Dragaun, H. (1986). Thin-Film Multiple Electrode Probes: Possibilities and Limitations. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *BME-33*, 223–229.
- Pumera, M., Ambrosi, A., Bonanni, A., Chng, E.L.K., and Poh, H.L. (2010). Graphene for electrochemical sensing and biosensing. *TrAC Trends Anal. Chem.* *29*, 954–965.
- Rakuman, W.F.H., Xiao Chuan Ong, Tetikol, H.S., Khilwani, R., Cui, X.T., Ozdoganlar, O.B., Fedder, G.K., and Gilgunn, P.J. (2013). Ultra-compliant neural probes are subject to fluid forces during dissolution of polymer delivery vehicles. In 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), (Osaka: IEEE), pp. 1550–1553.
- Rennaker, R.L., Street, S., Ruyle, A.M., and Sloan, A.M. (2005). A comparison of chronic multi-channel cortical implantation techniques: manual versus mechanical insertion. *J. Neurosci. Methods* *142*, 169–176.
- Rheinberger, M.B., and Jasper, H.H. (1937). ELECTRICAL ACTIVITY OF THE CEREBRAL CORTEX IN THE UNANESTHETIZED CAT. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* *119*, 186–196.
- Richardson, R.T., Wise, A.K., Thompson, B.C., Flynn, B.O., Atkinson, P.J., Fretwell, N.J., Fallon, J.B., Wallace, G.G., Shepherd, R.K., Clark, G.M., et al. (2009). Polypyrrole-coated electrodes for the delivery of charge and neurotrophins to cochlear neurons. *Biomaterials* *30*, 2614–2624.
- Richter, A., Xie, Y., Schumacher, A., Löffler, S., Kirch, R.D., Al-Hasani, J., Rapoport, D.H., Kruse, C., Moser, A., Tronnier, V., et al. (2013). A simple implantation method for flexible, multisite microelectrodes into rat brains. *Front. Neuroengineering* *6*.
- Roach, P., Farrar, D., and Perry, C.C. (2006). Surface tailoring for controlled protein adsorption: effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 3939–3945.
- Robinson, D.A. (1968). The electrical properties of metal microelectrodes. *Proc. IEEE* *56*, 1065–1071.
- Rocha, P.R.F., Schlett, P., Kintzel, U., Mailänder, V., Vandamme, L.K.J., Zeck, G., Gomes, H.L., Biscarini, F., and de Leeuw, D.M. (2016). Electrochemical noise and impedance of Au electrode/electrolyte interfaces enabling extracellular detection of glioma cell populations. *Sci. Rep.* *6*.

- Rolls, A., Shechter, R., and Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 235–241.
- Rose, T.L., and Robblee, L.S. (1990). Electrical stimulation with Pt electrodes. VIII. Electrochemically safe charge injection limits with 0.2 ms pulses. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *37*, 1118–1120.
- Rousche, P.J., and Normann, R.A. (1992). A method for pneumatically inserting an array of penetrating electrodes into cortical tissue. *Ann. Biomed. Eng.* *20*, 413–422.
- Rousche, P.J., Pellinen, D.S., Pivin, D.P., Williams, J.C., Vetter, R.J., and Kipke, D.R. (2001). Flexible polyimide-based intracortical electrode arrays with bioactive capability. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *48*, 361–371.
- Sait, R.A., and Cross, R.B.M. (2017). Synthesis and characterization of sputtered titanium nitride as a nucleation layer for novel neural electrode coatings. *Appl. Surf. Sci.* *424*, 290–298.
- Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., and Imai, Y. (2001). Iba1 Is an Actin-Cross-Linking Protein in Macrophages/Microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *286*, 292–297.
- Scholvin, J., Kinney, J.P., Bernstein, J.G., Moore-Kochlacs, C., Kopell, N., Fonstad, C.G., and Boyden, E.S. (2016). Close-Packed Silicon Microelectrodes for Scalable Spatially Oversampled Neural Recording. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *63*, 120–130.
- Schuetzler, M., and Stieglitz, T. (2013). Microassembly and micropackaging of implantable systems. In *Implantable Sensor Systems for Medical Applications*, (Elsevier), pp. 108–149.
- Schuetzler, M., Stiess, S., King, B.V., and Suaning, G.J. (2005). Fabrication of implantable microelectrode arrays by laser cutting of silicone rubber and platinum foil. *J. Neural Eng.* *2*, S121-128.
- Schuhmann, T.G., Yao, J., Hong, G., Fu, T.-M., and Lieber, C.M. (2017). Syringe-Injectable Electronics with a Plug-and-Play Input/Output Interface. *Nano Lett.* *17*, 5836–5842.
- Seah, C.-M., Chai, S.-P., and Mohamed, A.R. (2011). Synthesis of aligned carbon nanotubes. *Carbon* *49*, 4613–4635.
- Seker, E., Berdichevsky, Y., Begley, M.R., Reed, M.L., Staley, K.J., and Yarmush, M.L. (2010). The fabrication of low-impedance nanoporous gold multiple-electrode arrays for neural electrophysiology studies. *Nanotechnology* *21*, 125504.
- Seo, D., Carmena, J.M., Rabaey, J.M., Maharbiz, M.M., and Alon, E. (2015). Model validation of untethered, ultrasonic neural dust motes for cortical recording. *J. Neurosci. Methods* *244*, 114–122.
- Seymour, J.P., and Kipke, D.R. (2007). Neural probe design for reduced tissue encapsulation in CNS. *Biomaterials* *28*, 3594–3607.
- Seymour, J.P., Elkasabi, Y., Chen, H., Lahann, J., and Kipke, D.R. (2009). The insulation performance of reactive parylene films in implantable electronic devices. *Biomaterials* *30*, 6158–6167.
- Seymour, J.P., Langhals, N.B., Anderson, D.J., and Kipke, D.R. (2011). Novel multi-sided, microelectrode arrays for implantable neural applications. *Biomed. Microdevices* *13*, 441–451.
- Shah, S., Hines, A., Zhou, D., Greenberg, R.J., Humayun, M.S., and Weiland, J.D. (2007). Electrical properties of retinal-electrode interface. *J. Neural Eng.* *4*, S24-29.



- Shen, W., Karumbaiah, L., Liu, X., Saxena, T., Chen, S., Patkar, R., Bellamkonda, R.V., and Allen, M.G. (2015). Extracellular matrix-based intracortical microelectrodes: Toward a microfabricated neural interface based on natural materials. *Microsyst. Nanoeng.* *1*, 15010.
- Shepherd, R.K., Shivdasani, M.N., Nayagam, D.A.X., Williams, C.E., and Blamey, P.J. (2013). Visual prostheses for the blind. *Trends Biotechnol.* *31*, 562–571.
- Simeral, J.D., Kim, S.-P., Black, M.J., Donoghue, J.P., and Hochberg, L.R. (2011). Neural control of cursor trajectory and click by a human with tetraplegia 1000 days after implant of an intracortical microelectrode array. *J. Neural Eng.* *8*, 025027.
- Skousen, J.L., Merriam, S.M.E., Srivannavit, O., Perlin, G., Wise, K.D., and Tresco, P.A. (2011). Reducing surface area while maintaining implant penetrating profile lowers the brain foreign body response to chronically implanted planar silicon microelectrode arrays. In *Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 167–180.
- Smart, S.K., Cassady, A.I., Lu, G.Q., and Martin, D.J. (2006). The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* *44*, 1034–1047.
- Sohal, H.S., Jackson, A., Jackson, R., Clowry, G.J., Vassilevski, K., O'Neill, A., and Baker, S.N. (2014). The sinusoidal probe: a new approach to improve electrode longevity. *Front. Neuroengineering* *7*.
- Song, Q., Jiang, Z., Li, N., Liu, P., Liu, L., Tang, M., and Cheng, G. (2014). Anti-inflammatory effects of three-dimensional graphene foams cultured with microglial cells. *Biomaterials* *35*, 6930–6940.
- Sorkin, R., Greenbaum, A., David-Pur, M., Anava, S., Ayali, A., Ben-Jacob, E., and Hanein, Y. (2009). Process entanglement as a neuronal anchorage mechanism to rough surfaces. *Nanotechnology* *20*, 015101.
- Specht, C.G., Williams, O.A., Jackman, R.B., and Schoepfer, R. (2004). Ordered growth of neurons on diamond. *Biomaterials* *25*, 4073–4078.
- Sridharan, A., Rajan, S.D., and Muthuswamy, J. (2013). Long-term changes in the material properties of brain tissue at the implant–tissue interface. *J. Neural Eng.* *10*, 066001.
- Suzuki, S.S., and Smith, G.K. (1985). Burst characteristics of hippocampal complex spike cells in the awake rat. *Exp. Neurol.* *89*, 90–95.
- Tang, R., Pei, W., Chen, S., Zhao, H., Chen, Y., Han, Y., Wang, C., and Chen, H. (2014). Fabrication of strongly adherent platinum black coatings on microelectrodes array. *Sci. China Inf. Sci.* *57*, 1–10.
- Thelin, J., Jörntell, H., Psouni, E., Garwicz, M., Schouenborg, J., Danielsen, N., and Linsmeier, C.E. (2011). Implant Size and Fixation Mode Strongly Influence Tissue Reactions in the CNS. *PLoS ONE* *6*, e16267.
- Thomasjr, C., Springer, P., Loeb, G., Berwaldnetter, Y., and Okun, L. (1972). A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp. Cell Res.* *74*, 61–66.
- Thostenson, E.T., Ren, Z., and Chou, T.-W. (2001). Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Compos. Sci. Technol.* *61*, 1899–1912.
- Tien, L.W., Wu, F., Tang-Schomer, M.D., Yoon, E., Omenetto, F.G., and Kaplan, D.L. (2013). Silk as a Multifunctional Biomaterial Substrate for Reduced Glial Scarring around Brain-Penetrating Electrodes. *Adv. Funct. Mater.* *23*, 3185–3193.

- Toda, H., Suzuki, T., Sawahata, H., Majima, K., Kamitani, Y., and Hasegawa, I. (2011). Simultaneous recording of ECoG and intracortical neuronal activity using a flexible multichannel electrode-mesh in visual cortex. *NeuroImage* 54, 203–212.
- Tooker, A., Tolosa, V., Shah, K.G., Sheth, H., Felix, S., Delima, T., and Pannu, S. (2012). Polymer neural interface with dual-sided electrodes for neural stimulation and recording. In 2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, (San Diego, CA: IEEE), pp. 5999–6002.
- Uddin, M.A., Alam, M.O., Chan, Y.C., and Chan, H.P. (2004). Adhesion strength and contact resistance of flip chip on flex packages—effect of curing degree of anisotropic conductive film. *Microelectron. Reliab.* 44, 505–514.
- Ullah, N., and Omanovic, S. (2015). Large charge-storage-capacity iridium/ruthenium oxide coatings as promising material for neural stimulating electrodes. *Mater. Chem. Phys.* 159, 119–127.
- Ulrich, R., Wasef, M., Garrou, P., and Scheck, D. (1999). Thermosonic Gold Wirebonding to Electrolessly-Metallized Copper Bondpads over Benzocyclobutene. 22, 6.
- del Valle, J., de la Oliva, N., Muller, M., Stieglitz, T., and Navarro, X. (2015). Biocompatibility evaluation of parylene C and polyimide as substrates for peripheral nerve interfaces. In 2015 7th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER), (Montpellier, France: IEEE), pp. 442–445.
- Vitale, F., Summerson, S.R., Aazhang, B., Kemere, C., and Pasquali, M. (2015). Neural stimulation and recording with bidirectional, soft carbon nanotube fiber microelectrodes. *ACS Nano* 9, 4465–4474.
- Vitale, F., Vercosa, D.G., Rodriguez, A.V., Pamulapati, S.S., Seibt, F., Lewis, E., Yan, J.S., Badhiwala, K., Adnan, M., Royer-Carfagni, G., et al. (2018). Fluidic Microactuation of Flexible Electrodes for Neural Recording. *Nano Lett.* 18, 326–335.
- Viventi, J., Kim, D.-H., Vigeland, L., Frechette, E.S., Blanco, J.A., Kim, Y.-S., Avrin, A.E., Tiruvadi, V.R., Hwang, S.-W., Vanleer, A.C., et al. (2011). Flexible, foldable, actively multiplexed, high-density electrode array for mapping brain activity in vivo. *Nat. Neurosci.* 14, 1599–1605.
- Wang, B., Petrossians, A., and Weiland, J.D. (2014). Reduction of Edge Effect on Disk Electrodes by Optimized Current Waveform. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 61, 2254–2263.
- Weiland, J.D., Anderson, D.J., and Humayun, M.S. (2002). In vitro electrical properties for iridium oxide versus titanium nitride stimulating electrodes. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 49, 1574–1579.
- Welkenhuysen, M., Andrei, A., Ameye, L., Eberle, W., and Nuttin, B. (2011). Effect of Insertion Speed on Tissue Response and Insertion Mechanics of a Chronically Implanted Silicon-Based Neural Probe. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 58, 3250–3259.
- Wesson Ashford, J., Coburn, K.L., and Fuster, J.M. (1985). The elgiloy microelectrode: Fabrication techniques and characteristics. *J. Neurosci. Methods* 14, 247–252.
- White, R.L., and Gross, T.J. (1974). An Evaluation of the Resistance to Electrolysis of Metals for Use in Biostimulation Microprobes. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* BME-21, 487–490.
- Wilks, S. (2009). Poly(3,4-ethylene dioxythiophene) (PEDOT) as a micro-neural interface material for electrostimulation. *Front. Neuroengineering* 2.
- Williams, D.F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29, 2941–2953.

- Williams, D., and Parsons-Smith, G. (1949). THE SPONTANEOUS ELECTRICAL ACTIVITY OF THE HUMAN THALAMUS. *Brain* 72, 450–482.
- Wilson, B.S., and Dorman, M.F. (2008). Cochlear implants: a remarkable past and a brilliant future. *Hear. Res.* 242, 3–21.
- Wilson, M.A., and McNaughton, B.L. (1993). Dynamics of the Hippocampal Ensemble Code for Space. *Sci. New Ser.* 261, 1055–1058.
- Winslow, B.D., Christensen, M.B., Yang, W.-K., Solzbacher, F., and Tresco, P.A. (2010). A comparison of the tissue response to chronically implanted Parylene-C-coated and uncoated planar silicon microelectrode arrays in rat cortex. *Biomaterials* 31, 9163–9172.
- Wise, K.D., Angell, J.B., and Starr, A. (1970). An Integrated-Circuit Approach to Extracellular Microelectrodes. *IEEE Trans. Biomed. Eng. BME-17*, 238–247.
- Wise, K.D., Sodagar, A.M., Ying Yao, Gulari, M.N., Perlin, G.E., and Najafi, K. (2008). Microelectrodes, Microelectronics, and Implantable Neural Microsystems. *Proc. IEEE* 96, 1184–1202.
- Wu, F., Im, M., and Yoon, E. (2011). A flexible fish-bone-shaped neural probe strengthened by biodegradable silk coating for enhanced biocompatibility. In 2011 16th International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, (Beijing, China: IEEE), pp. 966–969.
- Wu, F., Tien, L., Chen, F., Kaplan, D., Berke, J., and Yoon, E. (2013). A multi-shank silk-backed parylene neural probe for reliable chronic recording. In 2013 Transducers & Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSensors XXVII), (Barcelona, Spain: IEEE), pp. 888–891.
- Wurth, S., Capogrosso, M., Raspopovic, S., Gandar, J., Federici, G., Kinany, N., Cutrone, A., Piersigilli, A., Pavlova, N., Guiet, R., et al. (2017). Long-term usability and bio-integration of polyimide-based intra-neural stimulating electrodes. *Biomaterials* 122, 114–129.
- Xiang, Z., Yen, S.-C., Xue, N., Sun, T., Tsang, W.M., Zhang, S., Liao, L.-D., Thakor, N.V., and Lee, C. (2014). Ultra-thin flexible polyimide neural probe embedded in a dissolvable maltose-coated microneedle. *J. Micromechanics Microengineering* 24, 065015.
- Xiang, Z., Liu, J., and Lee, C. (2016). A flexible three-dimensional electrode mesh: An enabling technology for wireless brain–computer interface prostheses. *Microsyst. Nanoeng.* 2.
- Xie, J., Chen, L., Aatre, K.R., Srivatsan, M., and Varadan, V.K. (2006). Somatosensory neurons grown on functionalized carbon nanotube mats. *Smart Mater. Struct.* 15, N85–N88.
- Yamagiwa, S., Fujishiro, A., Sawahata, H., Numano, R., Ishida, M., and Kawano, T. (2015). Layer-by-layer assembled nanorough iridium-oxide/platinum-black for low-voltage microscale electrode neurostimulation. *Sens. Actuators B Chem.* 206, 205–211.
- Yvert, B., Fischer, C., Bertrand, O., and Pernier, J. (2005). Localization of human supratemporal auditory areas from intracerebral auditory evoked potentials using distributed source models. *NeuroImage* 28, 140–153.
- Zhang, H., Shih, J., Zhu, J., and Kotov, N.A. (2012). Layered Nanocomposites from Gold Nanoparticles for Neural Prosthetic Devices. *Nano Lett.* 12, 3391–3398.
- Zhang, X., Prasad, S., Niyogi, S., Morgan, A., Ozkan, M., and Ozkan, C.S. (2005). Guided neurite growth on patterned carbon nanotubes. *Sens. Actuators B Chem.* 106, 843–850.

(1924). ZUR THEORIE DER ELEKTROLYTISCHEN DOPPELSCHICHT. 9.