

Réalisation d'une culture primaire: culture de cardiomyocytes embryonnaires

BioAnalyses et Contrôles 2ème année

Matériel par binôme :

- 1 œuf de poule embryonnés et incubés depuis 8 jours,
- tampon PBS stérile sans Ca^{2+} , ni Mg^{2+} , pH = 7,65
- solution stérile de Trypsine à 0,1% EDTA 5 mM
- milieu de culture DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal (FCS) et des antibiotiques (pénicilline, streptomycine et amphotérine B),
- 2 boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre.

Premier jour

1. Prélèvement des cœurs

- nettoyer la coquille à l'alcool et sécher l'œuf.
- casser la coquille du côté de la poche à air puis décalotter l'œuf.
- sortir doucement l'embryon, le déposer dans le bac à dissection rempli de tampon PBS
- couper la tête de l'embryon.
- à l'œil : repérer le cœur, ouvrir l'embryon et prélever le cœur.
- placer le cœur dans une boîte de Pétri stérile de 35 mm de Ø contenant environ 2mL de tampon PBS.

2. Préparation de la suspension cellulaire à partir de cœurs

- laver soigneusement les cœurs dans le tampon PBS.
- dans un boîte de Pétri de 35 mm Ø contenant 1 à 2mL d'une solution de trypsine, couper en petits morceaux.
- Transférer la suspension obtenue dans un tube à centrifuger stérile et incubé 10 à 20 min à 37°C en agitant de temps en temps.
- arrêter l'action de la trypsine par 2mL de milieu de culture à 10% de FCS et centrifuger 10 min à 1000 rpm.
- éliminer le surnageant et reprendre les cellules dans 1,5mL de milieu complet.
- répartir la suspension dans deux boîtes de Pétri de 35 mm de Ø et compléter avec du milieu complet qsp 2,5mL.
- incubé 24 heures à 37°C.

Deuxième jour

Observation au microscope inversé

- étude morphologique des cellules.
- mesurer des fréquences de contraction des cardiomyocytes.



