

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494**Renseignements généraux****Description**

Les cellules HaCaT-ras A5 constituent une lignée cellulaire de kératinocytes cutanés humains spontanément immortalisés et non tumorigènes, qui joue un rôle essentiel dans l'étude des interactions au sein du microenvironnement tumoral et de la progression du carcinome cutané. Provenant d'un homme de type caucasien âgé de 62 ans, ces cellules ont subi une sélection clonale et une mutagenèse qui, associées à la régulation autocrine des facteurs de croissance, permettent la formation de tumeurs kystiques bénignes à croissance lente et hautement différenciées chez la souris Balb/c-nu/nu. Cela en fait un modèle précieux pour étudier la dynamique cellulaire et les mécanismes moléculaires de la progression tumorale in vivo.

Les cellules HaCaT-ras A5 sont particulièrement utiles pour élucider les interactions complexes entre les cellules tumorales et les cellules stromales environnantes, notamment les fibroblastes, les cellules immunitaires et les cellules endothéliales. Ces interactions sont médiées par la sécrétion de diverses molécules de signalisation telles que les facteurs de croissance, les cytokines et les protéases, parmi lesquelles l'interleukine-6 (IL-6) joue un rôle central. On sait que l'IL-6 subit une dérégulation dans de nombreux types de cancer, principalement par la surexpression ou l'activation persistante du facteur de transcription STAT3.

Des recherches ont montré que la stimulation des cellules HaCaT-ras A5 par l'IL-6 augmente considérablement leur prolifération par l'intermédiaire de la voie de signalisation JAK/STAT, tandis que les fibroblastes ne sont pas affectés en raison d'une inhibition plus puissante par SOCS3, un régulateur négatif de cette voie. Cette réponse différentielle a été modélisée dans un modèle mathématique décrivant la dynamique de STAT3 et de SOCS3, ce qui permet une compréhension plus approfondie des cascades de signalisation spécifiques aux cellules.

De plus, l'IL-6 affecte non seulement directement la prolifération des cellules HaCaT-ras A5, mais influence également indirectement l'environnement cellulaire par l'activation d'un réseau de facteurs de croissance tels que l'HGF, le KGF, le VEGF et l'IL-8. Une analyse de l'expression génique portant sur plus de 16 000 gènes a révélé que la stimulation par l'IL-6 entraîne une régulation à la hausse de 19 gènes liés à la voie de signalisation de l'interféron, tant dans les cellules HaCaT-ras A5 que dans les fibroblastes, ce qui correspond à l'inhibition de la croissance observée chez ces derniers.

La découverte du rôle crucial de la SerpinB4 dans la prolifération des cellules HaCaT-ras A5, confirmée par des expériences d'inhibition par ARNsi, souligne la régulation complexe exercée par l'IL-6 tant dans les cellules tumorales que dans les cellules stromales. Cette compréhension approfondie des rôles de l'IL-6 renforce le potentiel de développement de stratégies thérapeutiques ciblées visant à moduler les voies de signalisation de l'IL-6 dans le microenvironnement tumoral.

Dans l'ensemble, les cellules HaCaT-ras A5 constituent un modèle solide pour explorer les interactions complexes au sein du microenvironnement tumoral, ouvrant la voie à de nouvelles approches dans la recherche sur le cancer et le développement de traitements.

Organism Humain**Tissue** Peau**Synonyms** Clone A-5 de HaCaT-ras, HaCaT A-5, A-5, A5**Caractéristiques**

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494

Age	62 ans
Gender	Homme
Ethnicity	caucasien
Cell type	Kératinocyte
Growth properties	Adepté

Données réglementaires

Citation	HaCaT-ras A5 (numéro de catalogue Cytion 300494)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_xK16
GMO Status	GMO-S1 : Cette lignée HaCaT-ras A5 contient une construction de l'oncogène c-Ha-ras véhiculée par un plasmide, destinée à la recherche sur la transformation épithéliale. Cette classification ne s'applique qu'en Allemagne et peut varier ailleurs.

Données biomoléculaires

Protein expression	P53 (+), CEA (+),
Tumorigenic	Formation de tumeurs bénignes chez les souris Balb/c-nu/nu.
Karyotype	Aneuploïde (hypotétraploïde)

Manipulation

Culture Medium	DMEM, p/v : 4,5 g/L de glucose, p/v : 4 mM de L-glutamine, p/v : 3,7 g/L de NaHCO ₃ , p/v : 1,0 mM de pyruvate de sodium (référence Cytion 820300a)
Supplements	Ajouter 10 % de FBS au milieu de culture

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494**Dissociation Reagent**

Le mélange 1:1 d'EDTA (solution mère à 0,05 %) et de trypsine (solution mère à 0,1 %) doit être préparé à chaque fois avant de détacher les cellules à l'aide de PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ afin d'obtenir une osmolarité physiologique. Les mélanges prêts à l'emploi de trypsine/EDTA ne sont pas recommandés, car ils peuvent entraîner la formation d'agrégats cellulaires. À titre d'alternative, on peut utiliser TrypLETM Express (Life Technologies) à la place de la trypsine/EDTA. Il convient de suivre le protocole du fabricant.

Subculturing

1. **Éliminer l'ancien milieu** : Retirer l'ancien milieu des flacons.
2. **Laver les cellules** : Ajouter 3 à 5 ml de PBS (sans calcium ni magnésium) dans les flacons T25, ou 5 à 10 ml dans les flacons T75, pour laver les cellules adhérentes.
3. **Ajouter la solution d'EDTA** : Recouvrir complètement la couche cellulaire d'une solution d'EDTA à 0,05 % fraîchement préparée — utiliser 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75.
4. **Incubation** : Incuber les flacons à 37 degrés Celsius pendant 10 minutes.
5. **Ajouter la solution de trypsine/EDTA** : Après l'incubation, ajoutez une solution de trypsine/EDTA fraîchement préparée (0,05 % de trypsine, 0,025 % d'EDTA) dans les flacons, en veillant à ce que les cellules soient entièrement recouvertes — utilisez 1 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75.
6. **Surveiller le détachement** : Observer les cellules, qui devraient se détacher en 1 à 2 minutes.
7. **Neutraliser la trypsine** : Ajouter du milieu de culture cellulaire contenant du FBS pour arrêter l'activité de la trypsine.
8. **Transférer les cellules** : Verser la suspension cellulaire dans de nouveaux flacons préremplis de milieu de culture frais.

Seeding density

1×10^4 cellules/cm²

Fluid renewal

2 fois par semaine

Freeze medium

Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (contenant du sérum fœtal bovin) + 10 % de DMSO pour assurer une viabilité adéquate après décongélation, ou du CM-1 (référence Cytion 800100), qui contient des osmoprotecteurs et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryoconservation.

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494

Thawing and Culturing Cells

1. Assurez-vous que le flacon reste bien congelé à la livraison, car les cellules sont expédiées sur de la glace sèche afin de maintenir des températures optimales pendant le transport.
2. À la réception, conservez immédiatement le cryofiole à une température inférieure à $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour garantir la préservation de l'intégrité cellulaire, ou passez à l'étape 3 si une culture immédiate est nécessaire.
3. Pour une culture immédiate, décongelez rapidement le flacon en l'immergeant dans un bain-marie à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ contenant de l'eau propre et un agent antimicrobien, en agitant doucement pendant 40 à 60 secondes jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit morceau de glace.
4. Effectuez toutes les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire, en désinfectant le cryotube avec de l'éthanol à 70 % avant de l'ouvrir.
5. Ouvrez avec précaution le flacon désinfecté et transférez la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 8 ml de milieu de culture à température ambiante, en mélangeant délicatement.
6. Centrifuger le mélange à $300 \times g$ pendant 3 minutes pour séparer les cellules, puis jeter avec précaution le surnageant contenant le milieu de congélation résiduel.
7. Remettre délicatement le culot cellulaire en suspension dans 10 ml de milieu de culture frais. Pour les cellules adhérentes, répartir la suspension dans deux flacons de culture T25; pour les cultures en suspension, transférer la totalité du milieu dans un seul flacon T25 afin de favoriser une interaction et une croissance cellulaires efficaces.
8. Respectez les protocoles de sous-culture établis pour assurer la croissance continue et le maintien de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % de CO_2 , atmosphère humidifiée.

Shipping Conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées dans de la glace sèche, dans un emballage isotherme validé contenant suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant tout le transport. À la réception, inspectez immédiatement le conteneur et transférez sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Storage Conditions

Pour une conservation à long terme, placez les flacons dans de l'azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre environ -150 et $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'entreposage à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ n'est acceptable qu'à titre d'étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l'azote liquide.

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494

Contrôle de la qualité et analyse moléculaire

Sterility

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes par luminescence.

Afin de s'assurer qu'il n'y a aucune contamination bactérienne, fongique ou par des levures, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.