

Faut-il colorer tout de suite ?

Impact de la conservation des lames sur les colorations histologiques

Aurélie Covinhes

Nîmes – Le 12 Juin 2026



Pourquoi tester l'impact de la conservation des lames sur les colorations histologiques ?

Immunomarquages

Impact du stockage des lames blanches



Clinical and Translational Medicine
a SpringerOpen Journal

Proper paraffin slide storage is crucial for translational research projects involving immunohistochemistry stains

Mary Economou, Liliane Schöni, Caroline Hammer, José A Galván, Dominique-Elisabeth Mueller and Inti Zlobec*

Mécanismes/Problèmes

Durée de stockage
Oxydation (Air)
Hydrolyse (Humidité)
Lumière/Chaleur



Antigénicité

Recommandations

Standardisation des procédures
Coupes fraîches
Stockage à 4°C

Pourquoi tester l'impact de la conservation des lames sur les colorations histologiques ?

Immunomarquages

Impact du stockage des lames blanches



Clinical and Translational Medicine
a SpringerOpen Journal

Proper paraffin slide storage is crucial for translational research projects involving immunohistochemistry stains

Mary Economou, Liliane Schöni, Caroline Hammer, José A Galván, Dominique-Elisabeth Mueller and Inti Zlobec*

Mécanismes/Problèmes

Durée de stockage
Oxydation (Air)
Hydrolyse (Humidité)
Lumière/Chaleur

↓
Antigénicité

Recommandations

Standardisation des procédures
Coupes fraîches
Stockage à 4°C

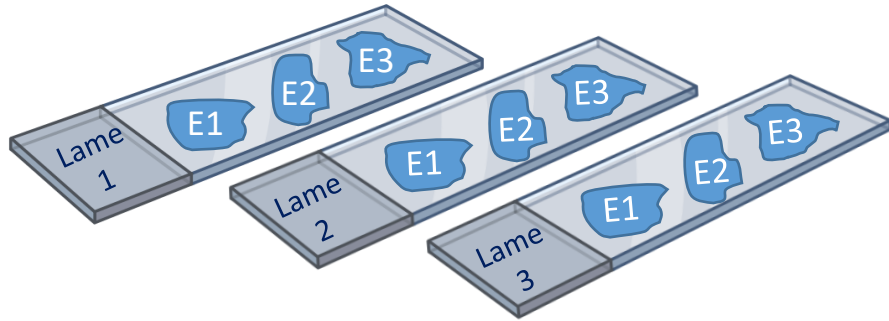
Colorations

- Peu d'études publiées
- Sur la plateforme RHEM :
 - moins strict pour les colorations que pour les immunomarquages
 - problèmes de reproductibilité des lames contrôles des colorations



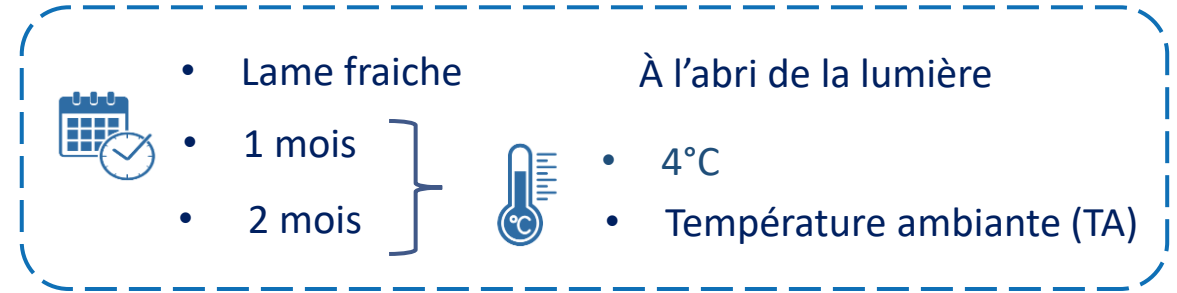
Conservation des lames : même rigueur nécessaire pour les colorations que pour les immunomarquages ?

Préparation des lames



3 lames avec 3 échantillons différents/lames

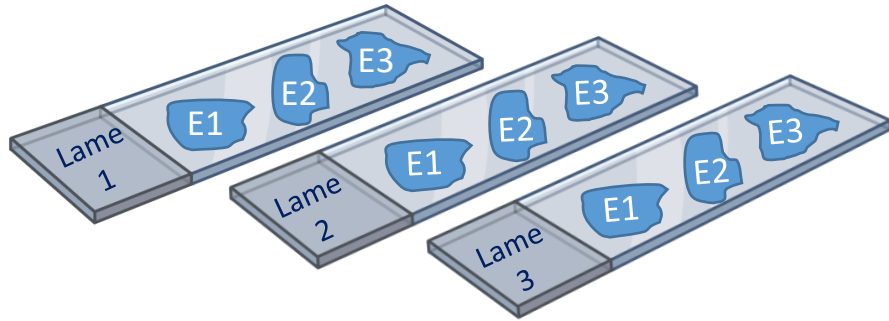
Conditions de conservation



5 conditions expérimentales

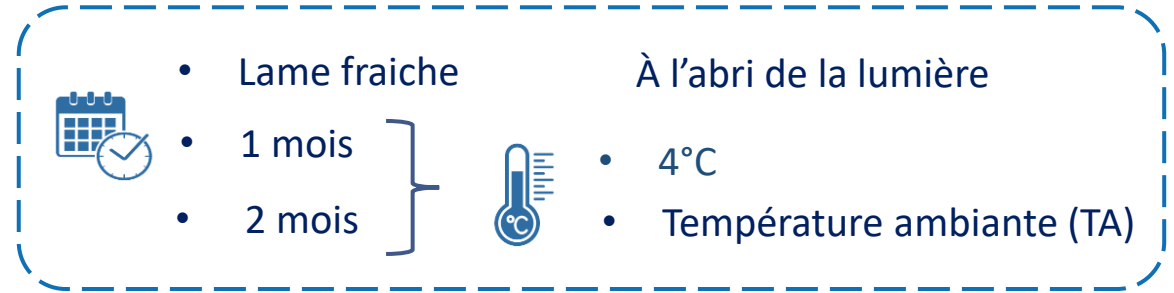
Matériel & Méthodes

Préparation des lames



3 lames avec 3 échantillons différents/lames

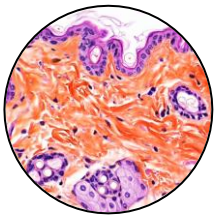
Conditions de conservation



5 conditions expérimentales

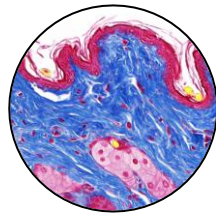
Colorations histologiques

Hématoxyline, Eosine,
Safran (HES)



Morphologie Tissulaire

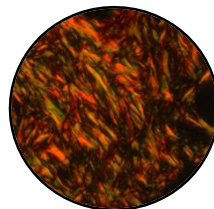
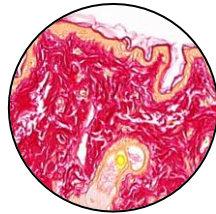
Trichrome de
Masson (TM)



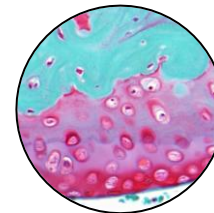
Fibres de collagène

Rouge Sirius (RS)

Lumière polarisée

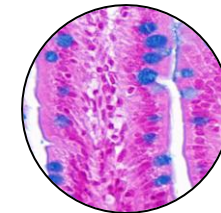


Safranin O
Fast Green (SOFG)



Cartilage articulaire

Bleu Alcian
(BA)



Glycogène, mucines

Acide Périodique
de Schiff (PAS)



Analyse qualitative des colorations

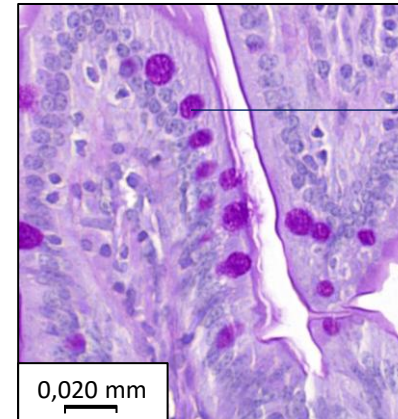
Critères de validation des colorations :



Tinctorialité

PAS

Villosités intestinales



Mucus des cellules épithéliales
caliciformes

Analyse qualitative des colorations

Critères de validation des colorations :

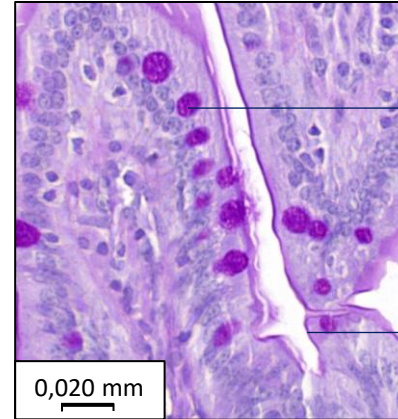


Tinctorialité



Spécificité

PAS



Villosités intestinales

Mucus des cellules épithéliales
caliciformes

Surface apicale des entérocytes

Analyse qualitative des colorations

Critères de validation des colorations :



Tinctorialité

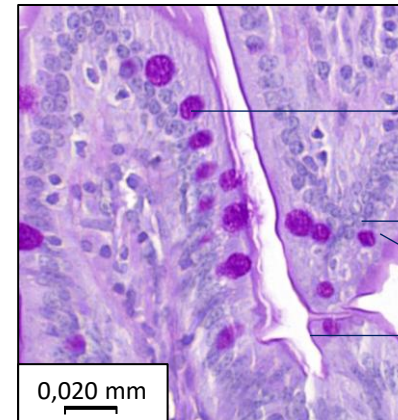


Spécificité



Intensité

PAS



Villosités intestinales

Mucus des cellules épithéliales
caliciformes

Noyaux

Cytoplasme

Surface apicale des entérocytes

Analyse qualitative des colorations

Critères de validation des colorations :



Tinctorialité



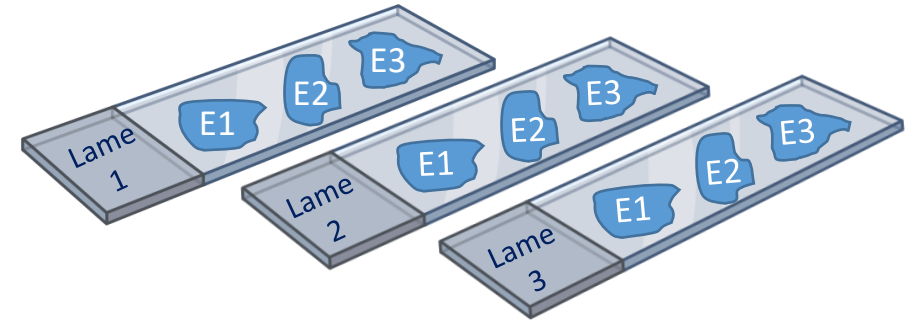
Spécificité



Intensité



Reproductibilité intra et inter-échantillons



Analyse qualitative des colorations

Critères de validation des colorations :



Tinctorialité



Intensité



Spécificité



Reproductibilité intra et inter-échantillons

Analyse quantitative des colorations

Analyse d'images, si différences observées entre les conditions

Scanner MIDI II



Images en fond clair



Logiciels d'analyse d'images

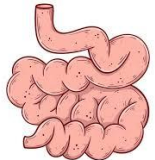


Nikon Eclipse Ci



Images en lumière polarisée (RS)





Intestin grêle de souris



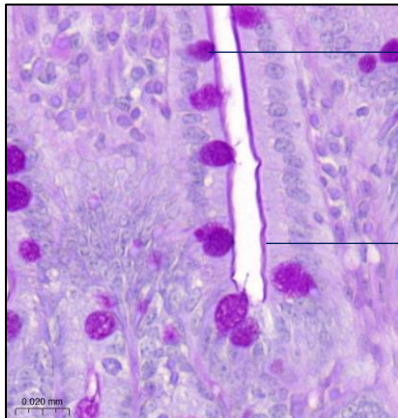
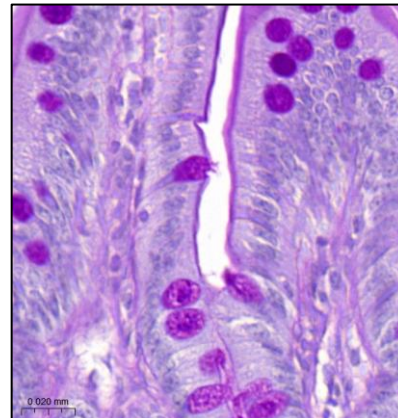
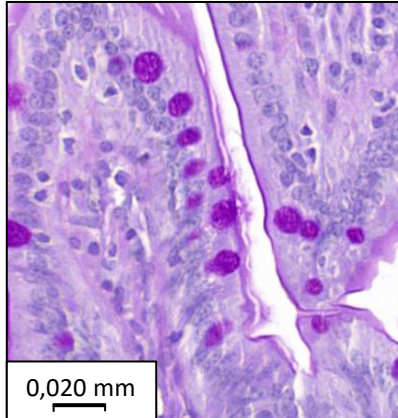
4°C



TA

Lame fraîche

+ 2 mois*



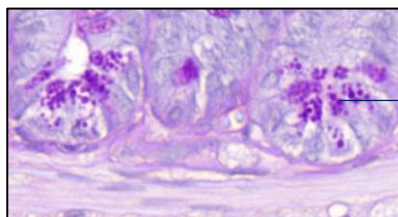
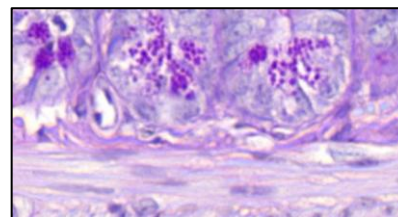
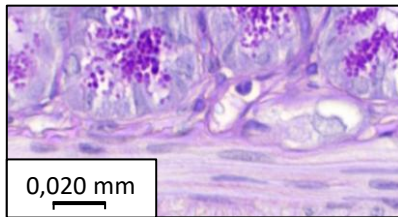
Villosités intestinales

Mucus des cellules épithéliales caliciformes

Surface apicale des entérocytes

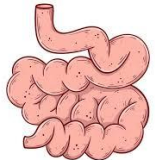
Glandes de Lieberkhün

Cellules de Paneth



Coloration PAS : Résultats identiques entre les conditions expérimentales

* Résultats à 1 mois de conservation identiques



Intestin grêle de souris



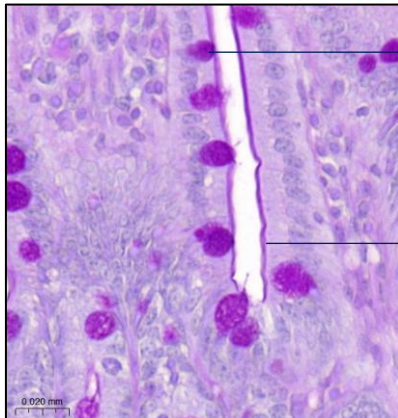
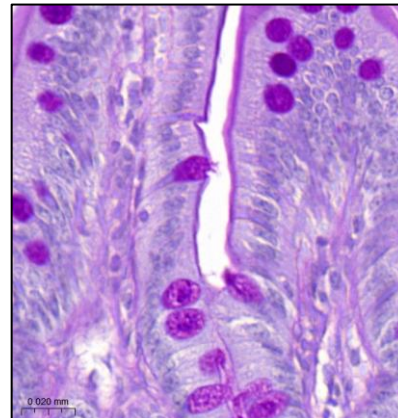
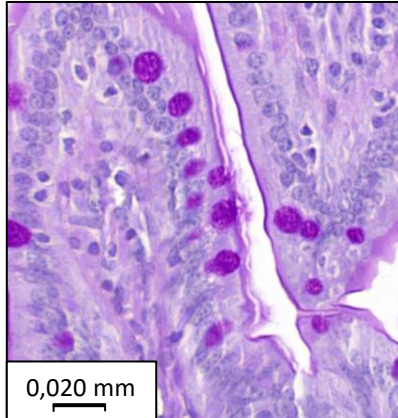
4°C



TA

Lame fraîche

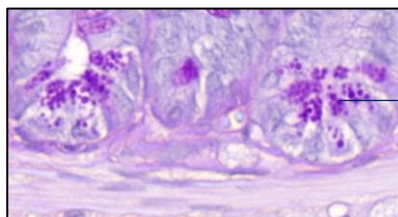
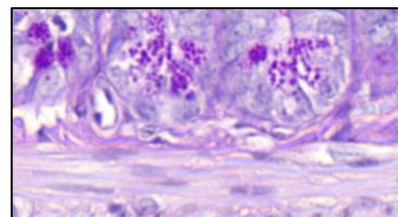
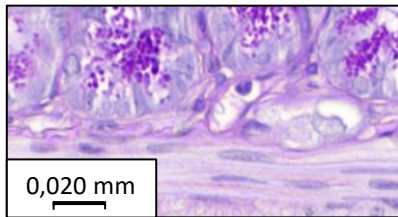
+ 2 mois*



Villosités intestinales

Mucus des cellules épithéliales caliciformes

Surface apicale des entérocytes



Glandes de Lieberkhün

Cellules de Paneth



Coloration PAS : Résultats identiques entre les conditions expérimentales

Colorations HES, RS, BA et SOFG également conformes à 2 mois

* Résultats à 1 mois de conservation identiques



Peau de souris



4°C



TA

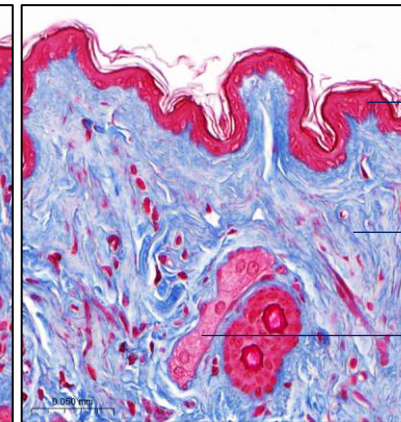
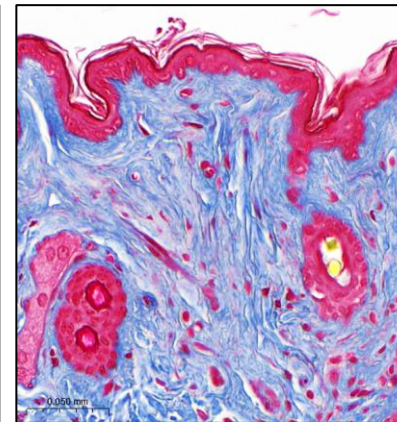
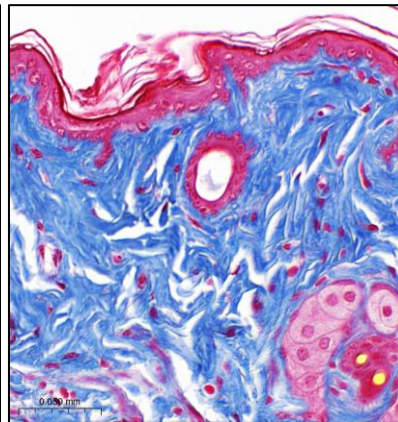
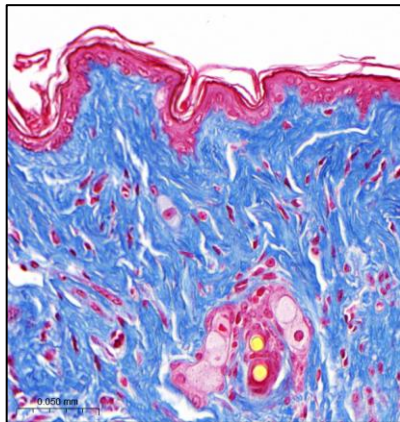
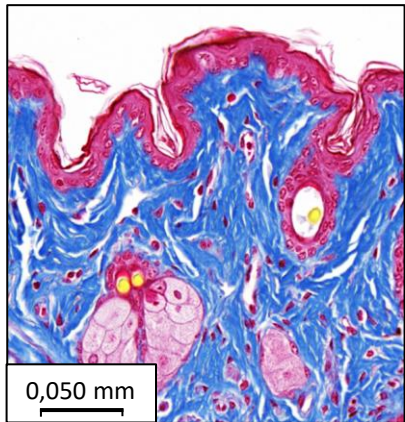
Lame fraîche

+ 1 mois

+ 2 mois

+ 1 mois

+ 2 mois



Epiderme

Fibres de collagène

Follicules pileux
Glandes sébacées



Peau de souris



4°C



TA

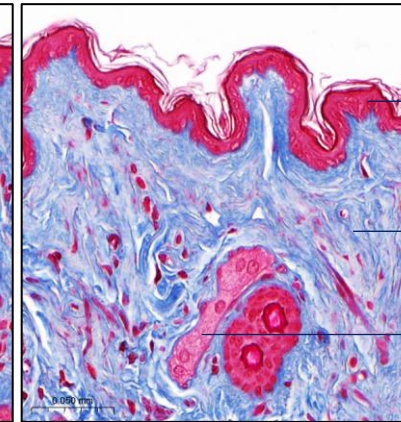
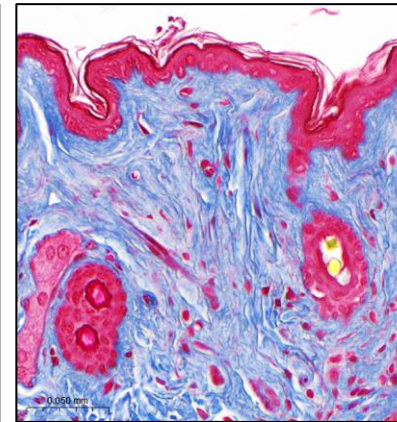
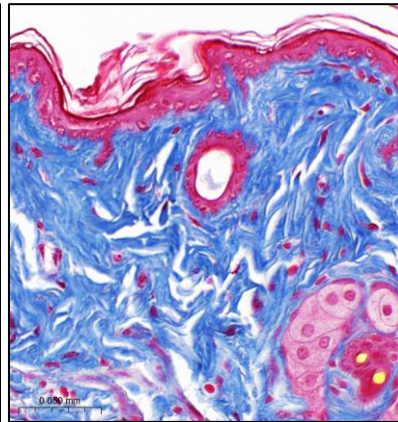
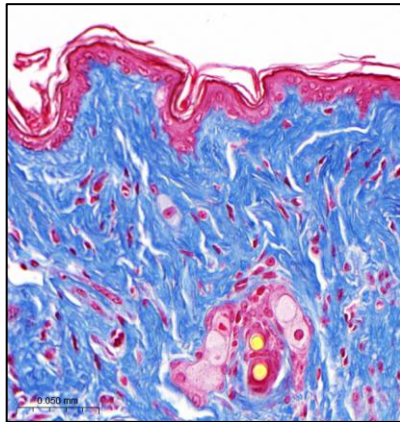
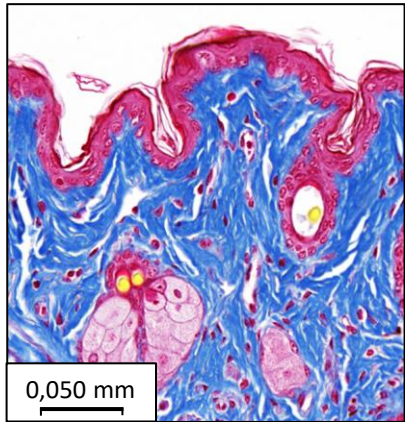
Lame fraîche

+ 1 mois

+ 2 mois

+ 1 mois

+ 2 mois



Epiderme

Fibres de collagène

Follicules pileux
Glandes sébacées

Tinctorialité





Peau de souris



4°C



TA

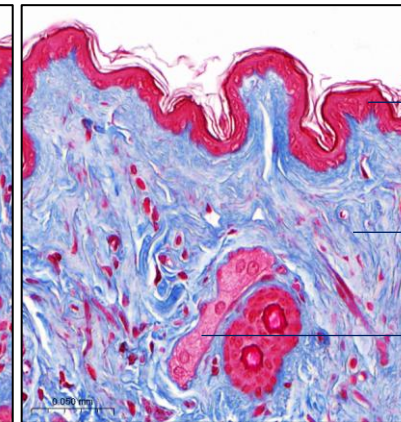
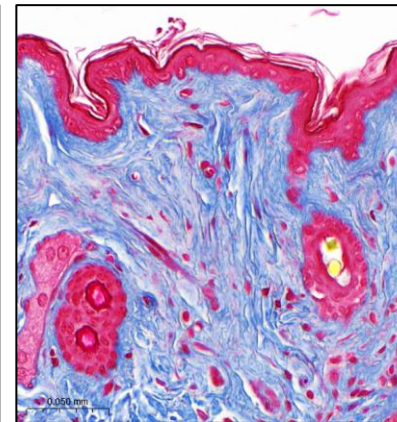
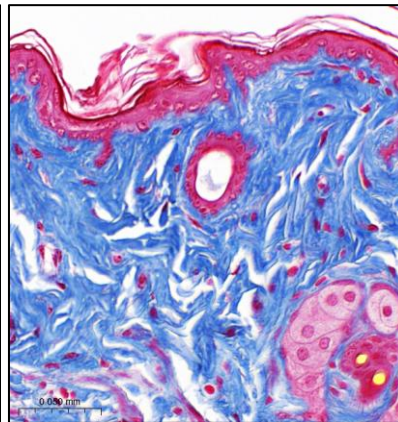
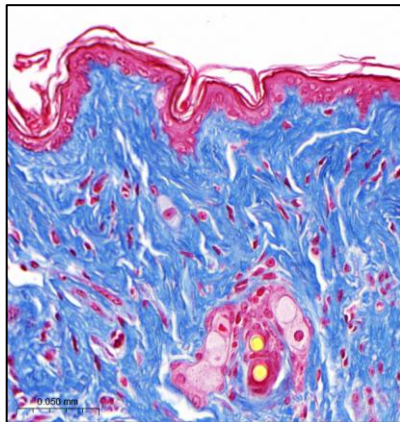
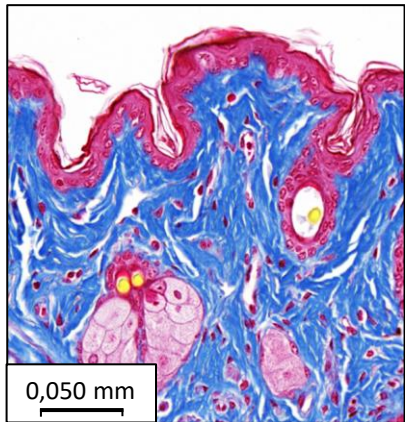
Lame fraîche

+ 1 mois

+ 2 mois

+ 1 mois

+ 2 mois



Epiderme

Fibres de collagène

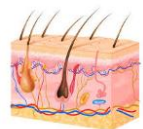
Follicules pileux
Glandes sébacées

Tinctorialité



Spécificité





Peau de souris



4°C



TA

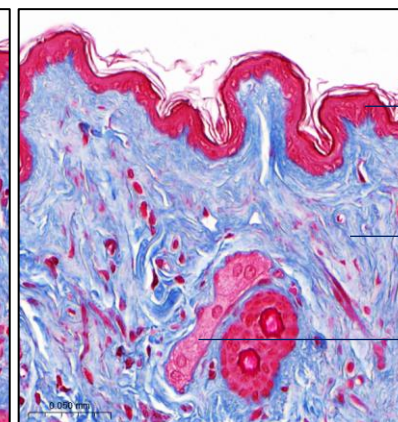
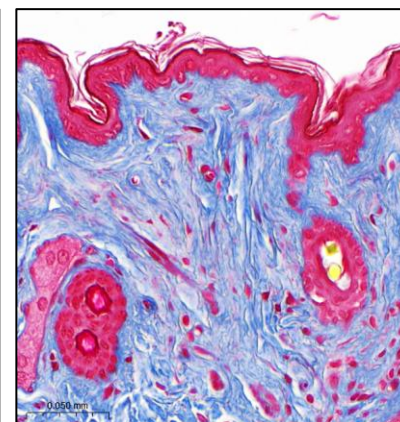
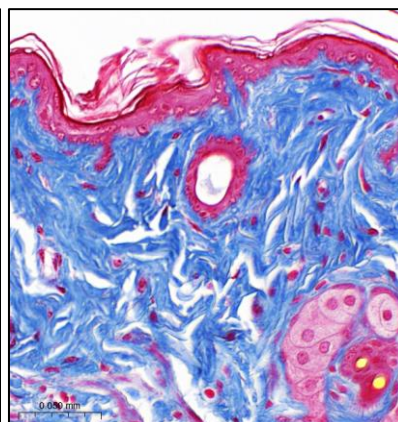
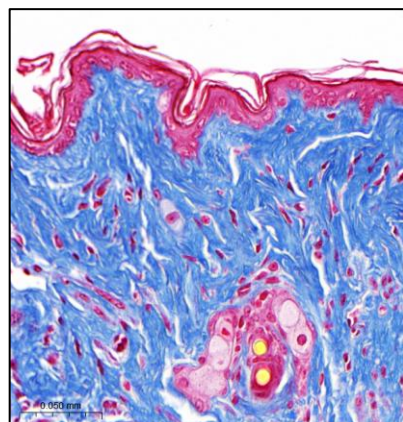
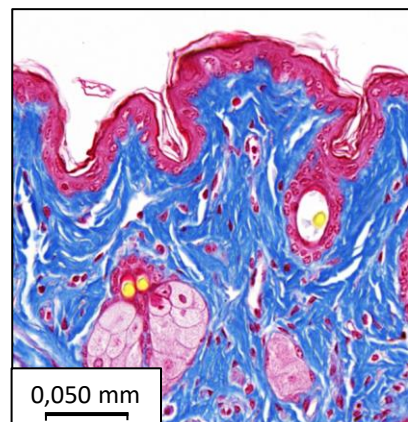
Lame fraîche

+ 1 mois

+ 2 mois

+ 1 mois

+ 2 mois



Epiderme

Fibres de collagène

Follicules pileux
Glandes sébacées

Tinctorialité



Intensité



Spécificité



Différences d'intensité de coloration des fibres de collagène



Peau de souris



4°C



TA

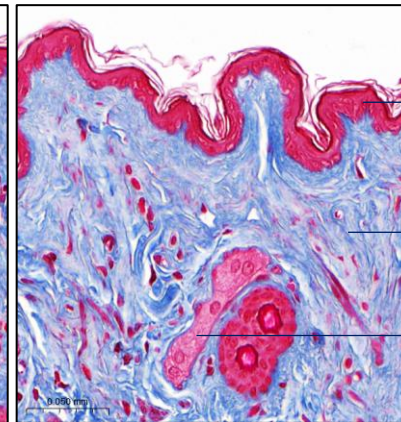
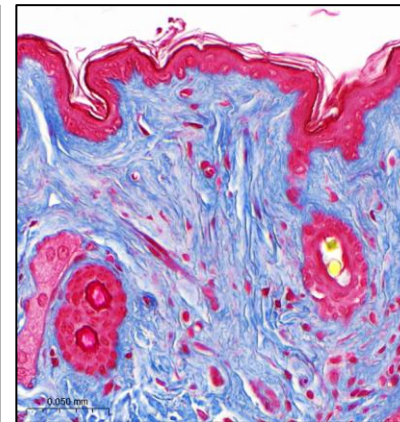
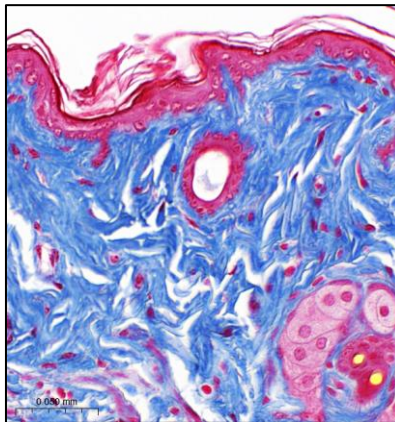
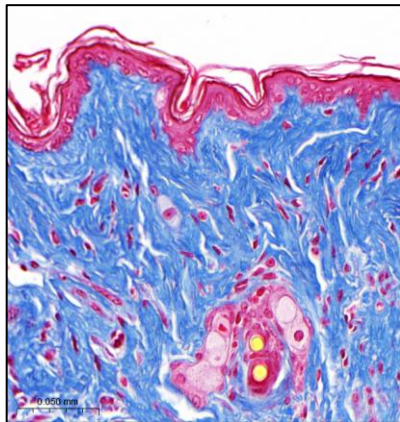
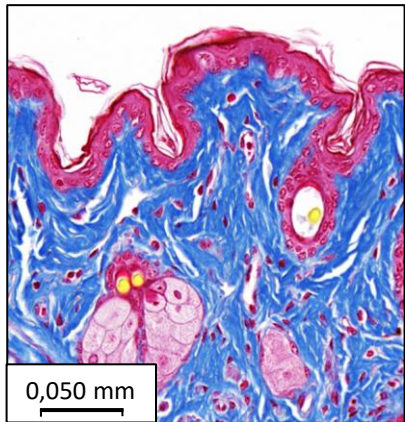
Lame fraîche

+ 1 mois

+ 2 mois

+ 1 mois

+ 2 mois



Epiderme

Fibres de collagène

Follicules pileux
Glandes sébacées

Tinctorialité



Intensité



Spécificité



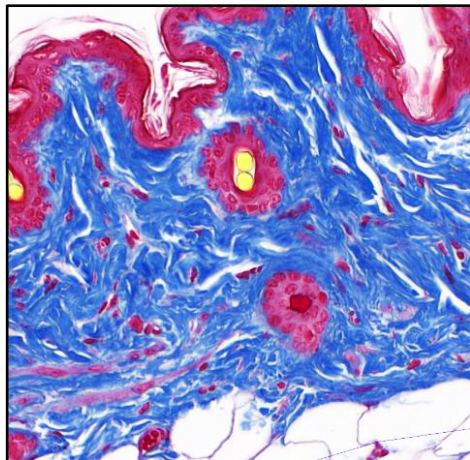
Reproductibilité



Différences d'intensité de coloration des fibres de collagène

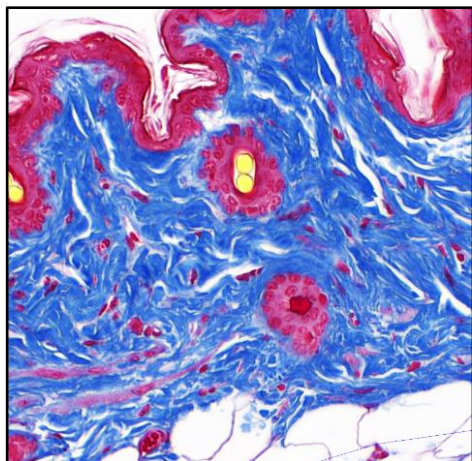
Segmentation par seuillage

Echantillon

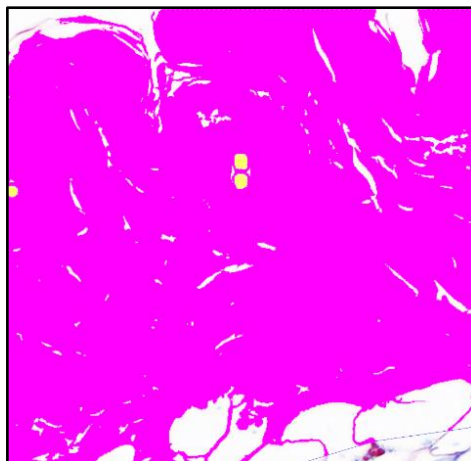


Segmentation par seuillage

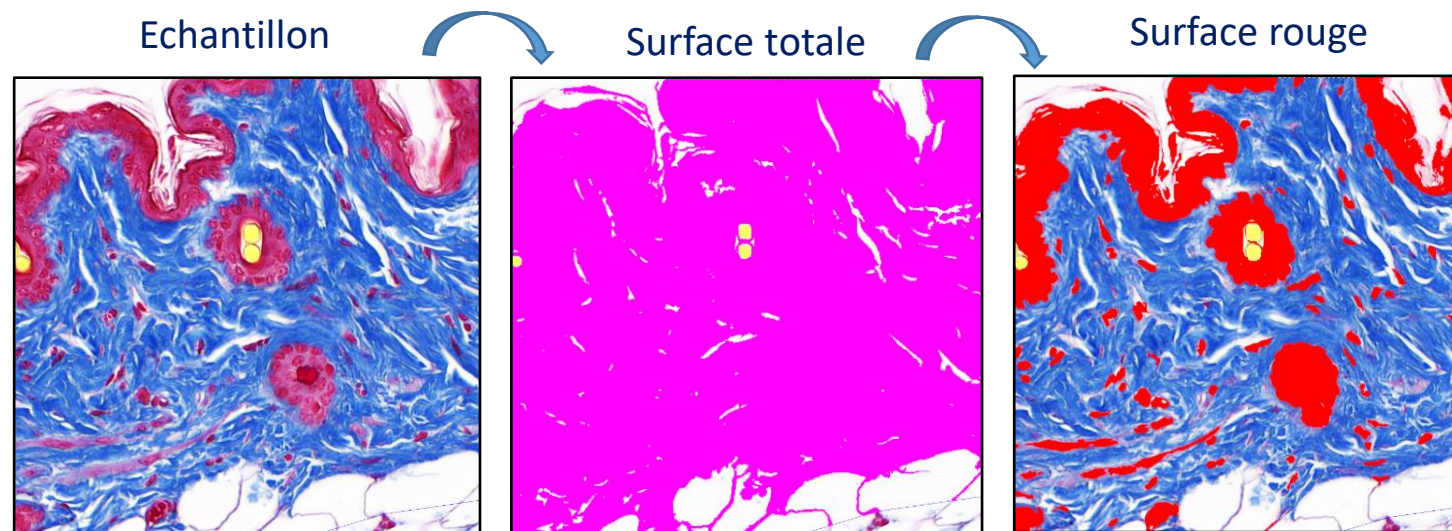
Echantillon



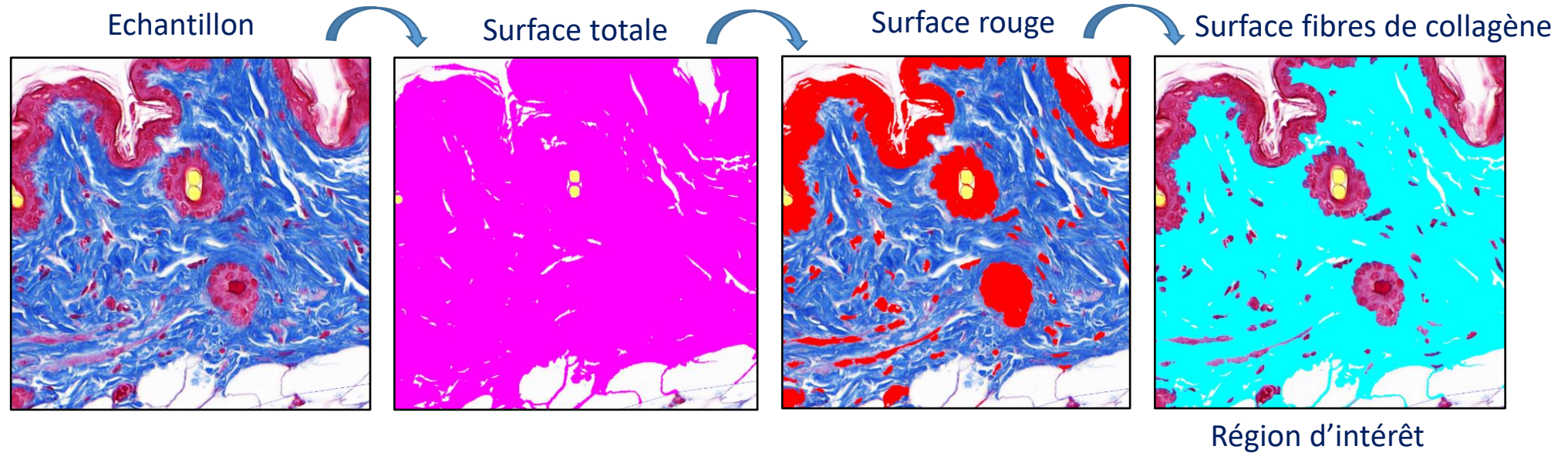
Surface totale



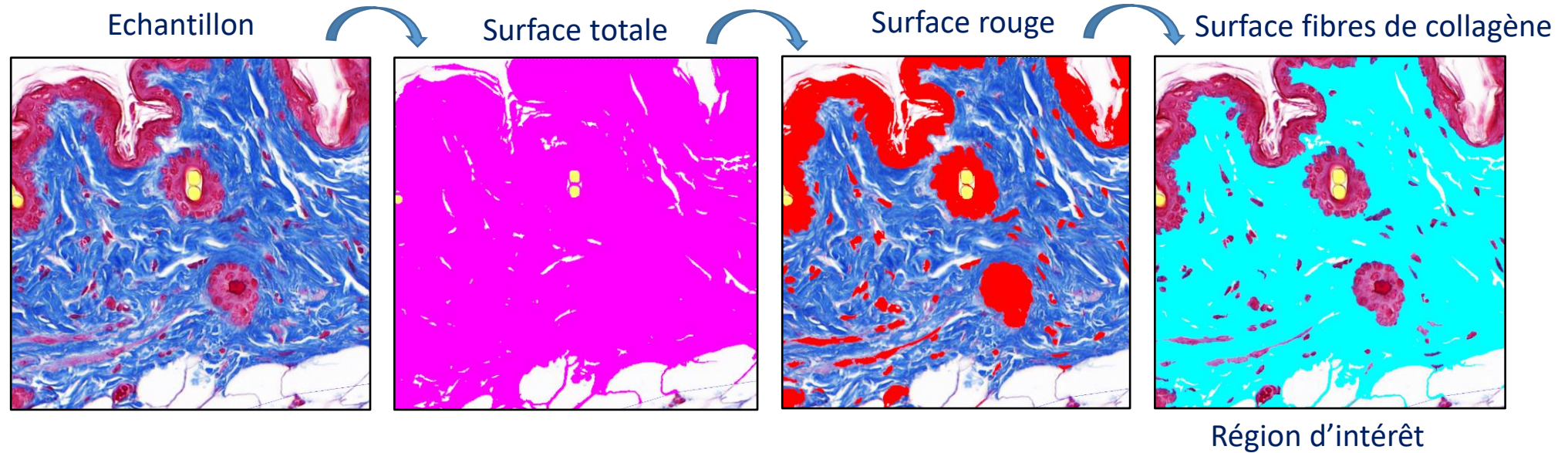
Segmentation par seuillage



Segmentation par seuillage



Segmentation par seuillage

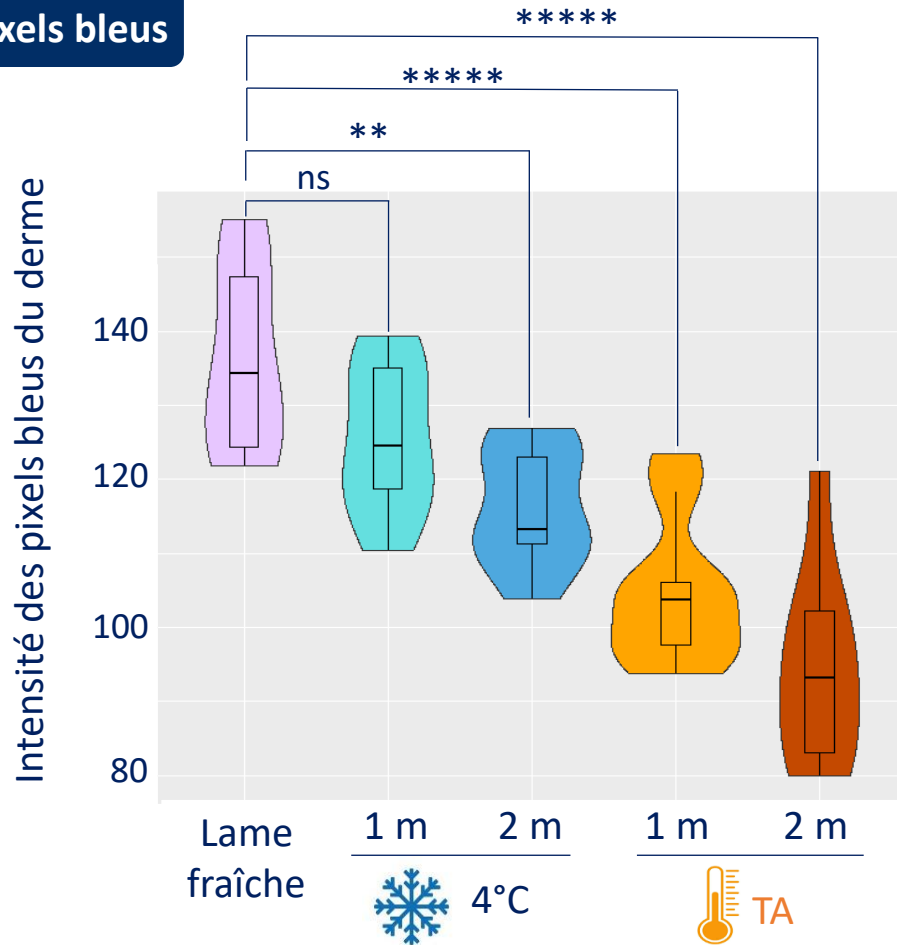


Mesure 1 :
$$\frac{\text{Intensité des pixels bleus (pixel)}}{\text{Surface totale du derme bleu } (\mu\text{m}^2)}$$

Mesure 2 :
$$\frac{\text{Surface occupée par les pixels bleus } (\mu\text{m}^2)}{\text{Surface totale Epiderme+Derme } (\mu\text{m}^2)}$$

Comparaison des lames fraîches par rapport aux conditions de conservation

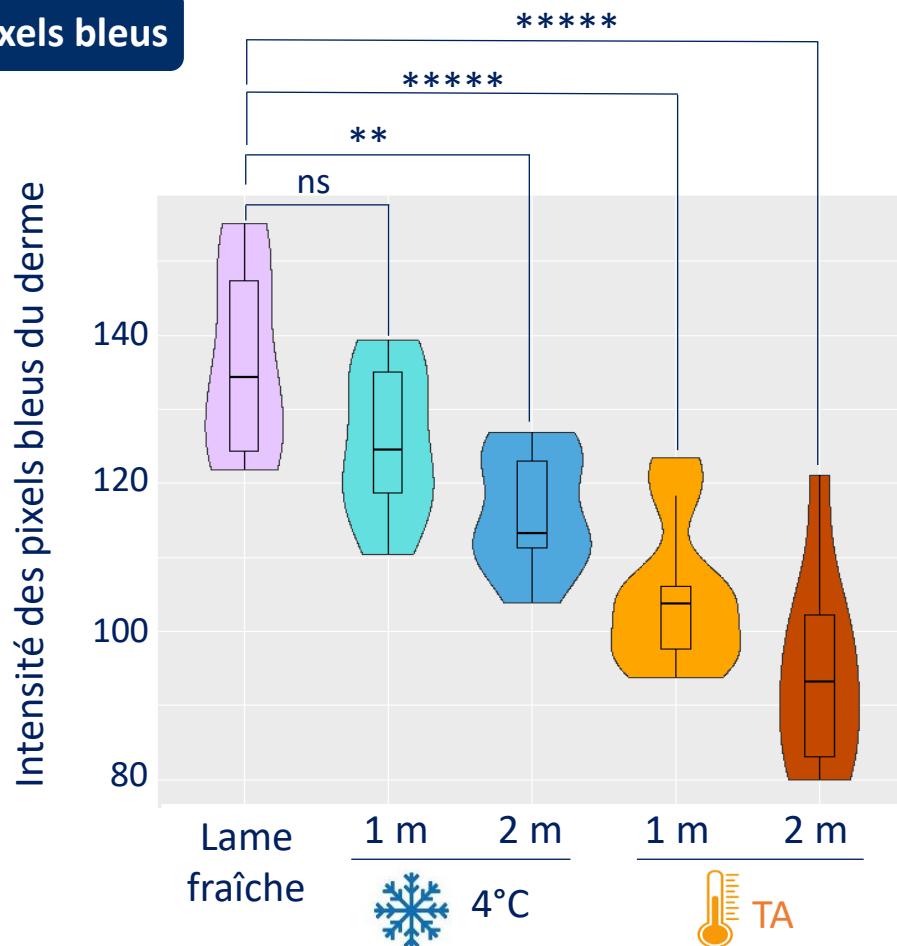
Intensité des pixels bleus



Différences significatives pour les conditions à TA et à 4°C, 2 mois

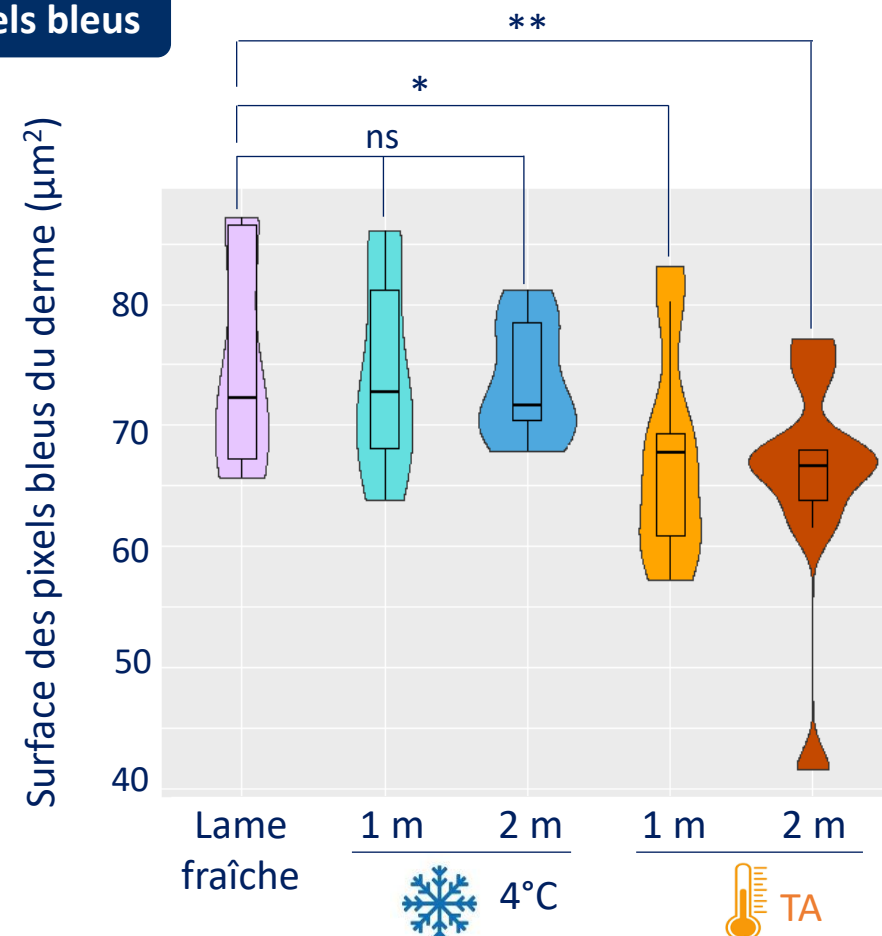
Comparaison des lames fraîches par rapport aux conditions de conservation

Intensité des pixels bleus



Différences significatives pour les conditions à TA et à 4°C, 2 mois

Surface des pixels bleus



Différences significatives pour les conditions à TA



Peau de souris

Fond clair : RAS



Peau de souris



4°C



TA

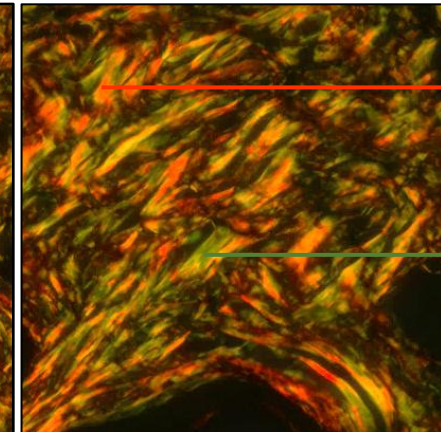
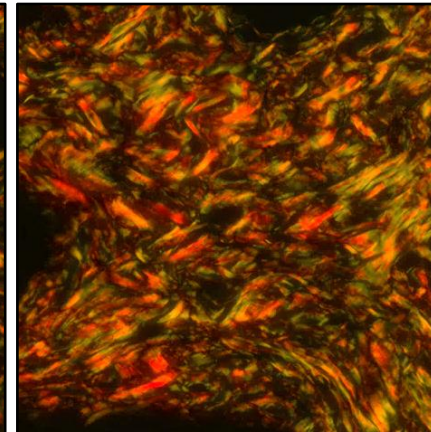
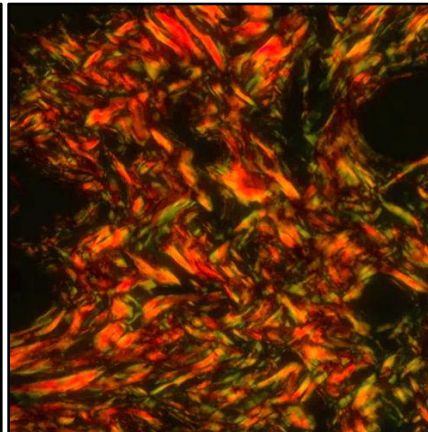
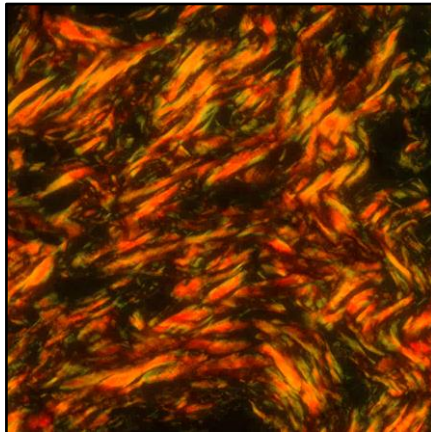
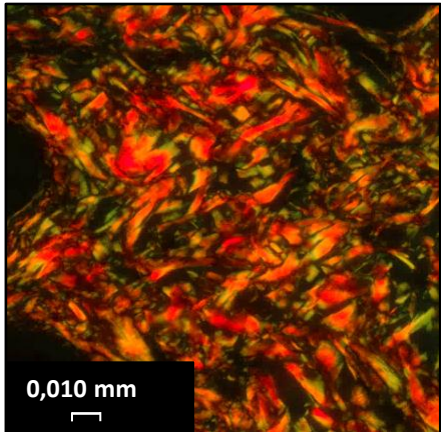
Lame fraîche

+ 1 mois

+ 2 mois

+ 1 mois

+ 2 mois



Fibres épaisses,
matures,
coll. type I

Fibres fines,
immatures,
coll. type III ou
réticuline



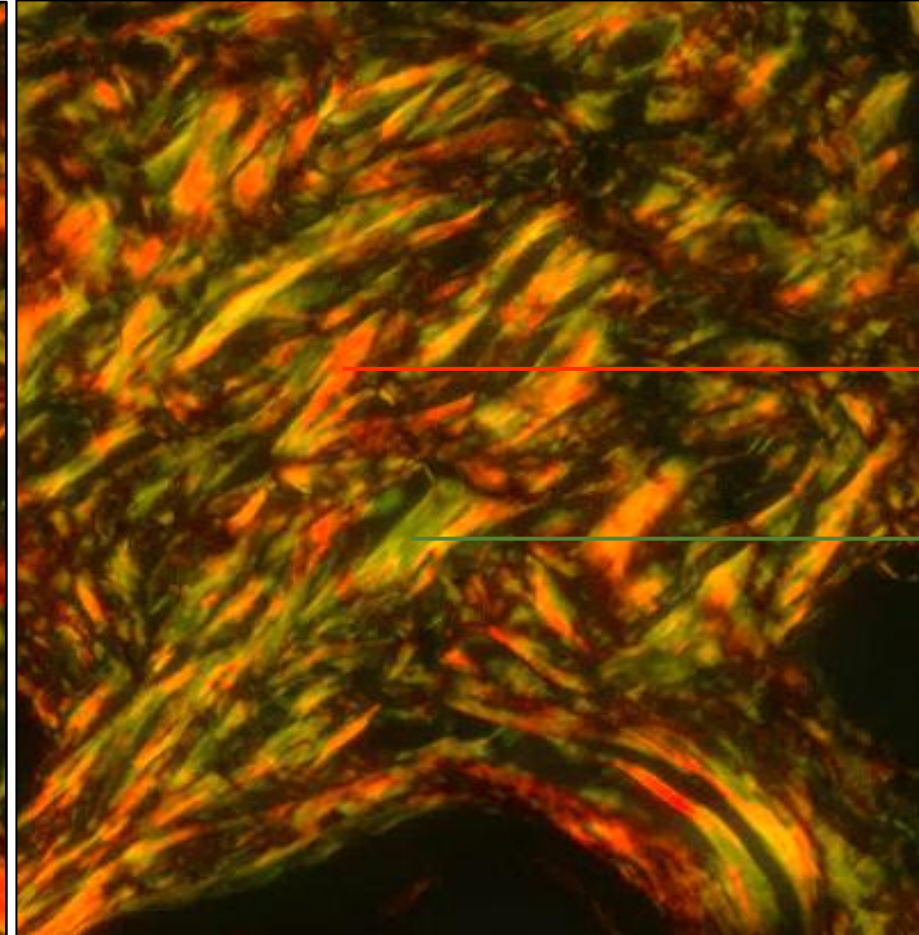
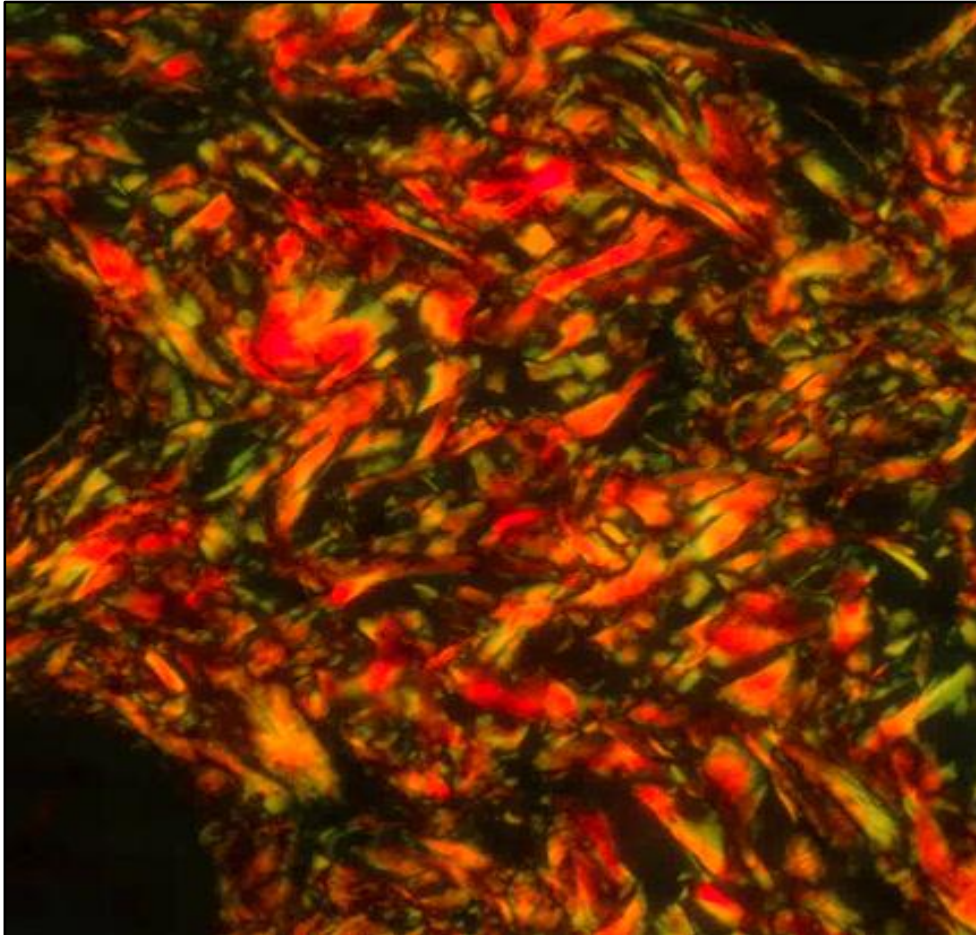
Lumière polarisée : biréfringence impactée ?



Peau de souris

Lame fraîche

+ 2 mois  TA



Fibres épaisses,
matures,
coll. type I

Fibres fines,
immatures,
coll. type III ou
réticuline

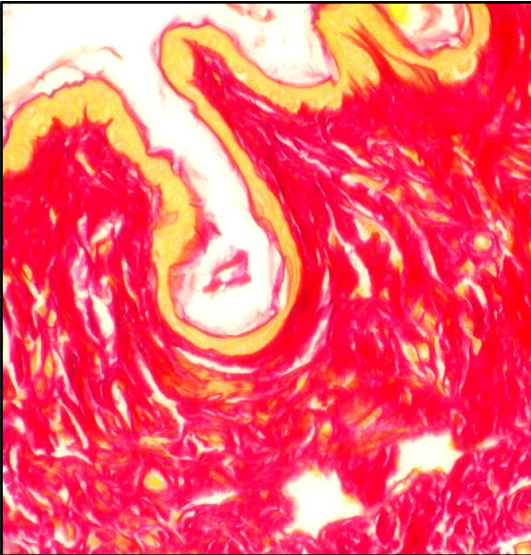


Lumière polarisée : biréfringence impactée ?

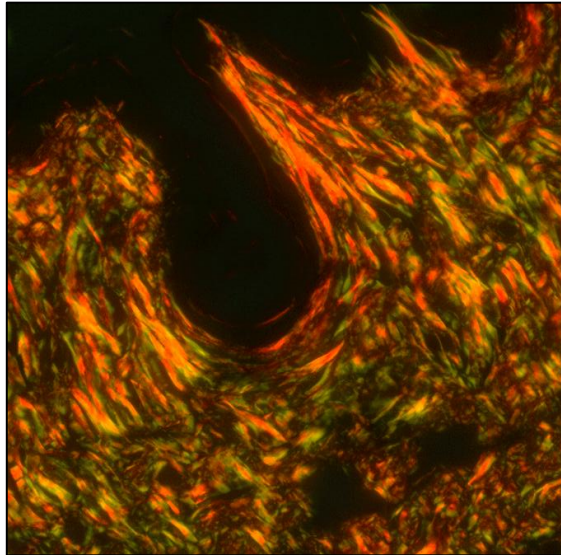


5 champs/échantillon

Fond clair (FC)



Lumière polarisée (LP)



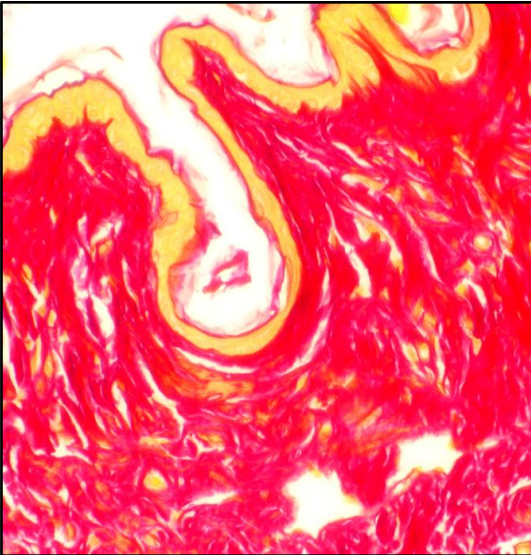
Mesure 1 : $\frac{\text{Surface pixels détectés en LP}}{\text{Surface pixels Rouge en FC}}$



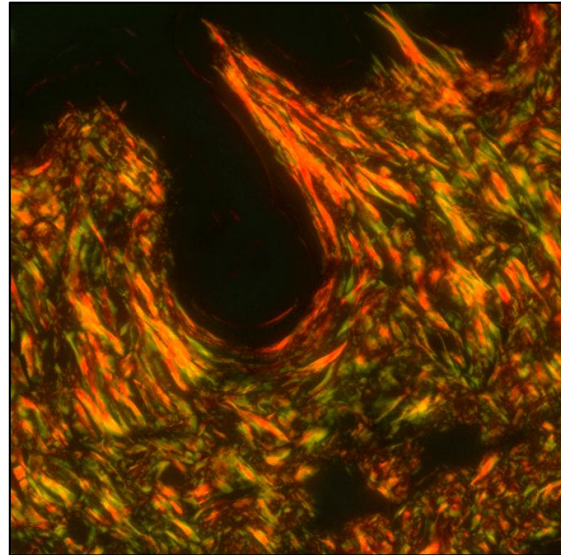
Résultats RS : Analyse quantitative, par analyse d'images

5 champs/échantillon

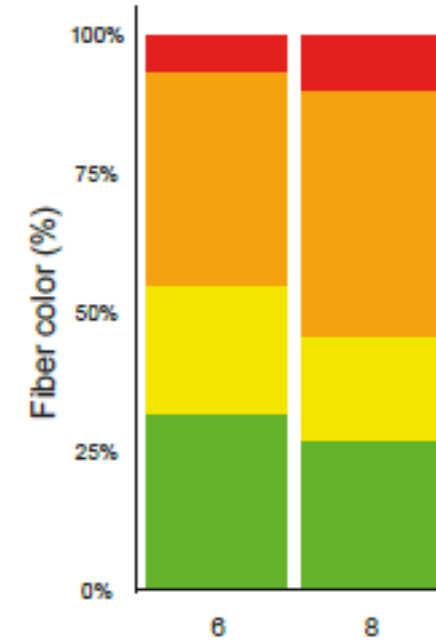
Fond clair (FC)



Lumière polarisée (LP)



Fibres colorées



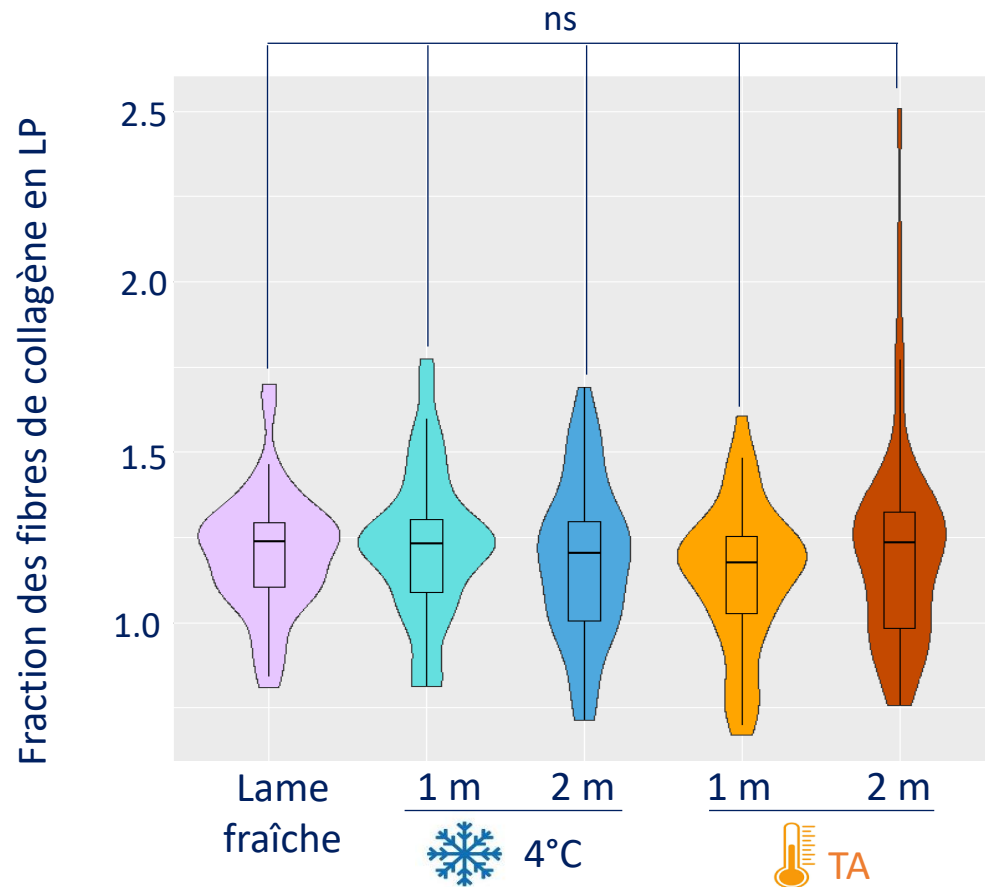
Adapté de Carlos Cuño-Gomiz et al, 2026

Mesure 1 : $\frac{\text{Surface pixels détectés en LP}}{\text{Surface pixels Rouge en FC}}$

Mesure 2 : $\frac{\text{Surface pixels de chaque couleur de fibres}}{\text{Surface pixels totaux}}$



Fraction des fibres de collagène en LP

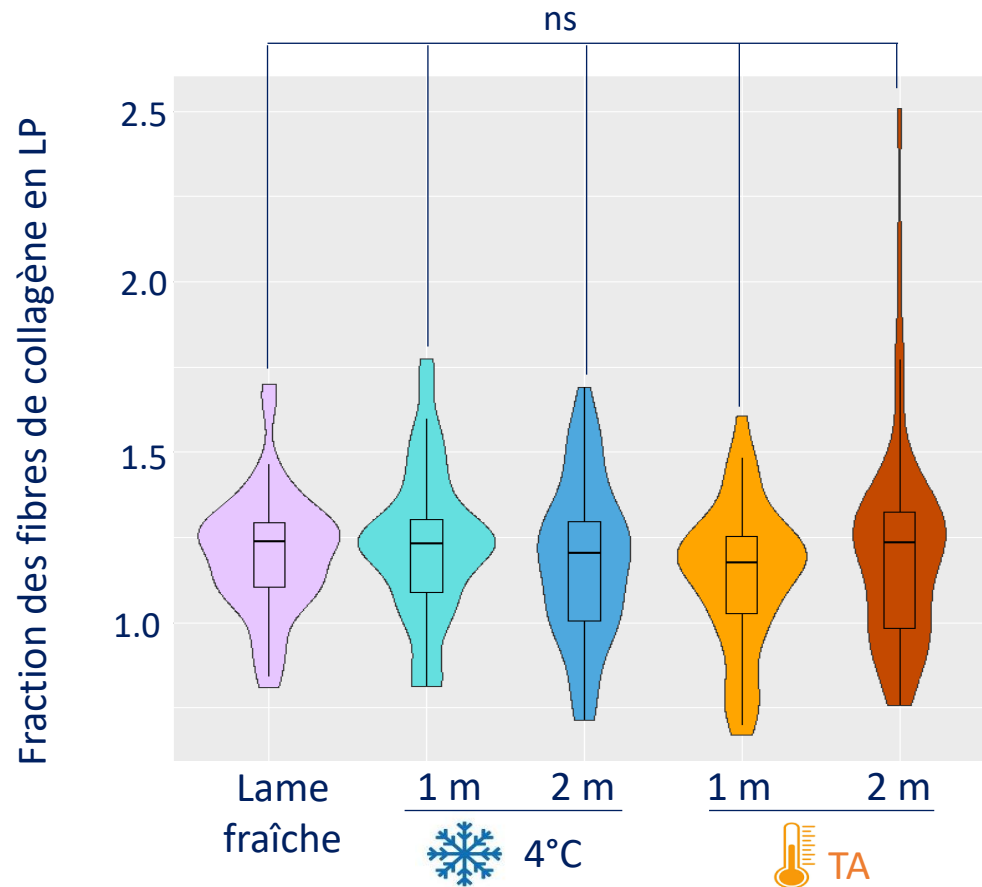


Aucune différence significative



Résultats RS : Analyse quantitative, par analyse d'images

Fraction des fibres de collagène en LP



Aucune différence significative

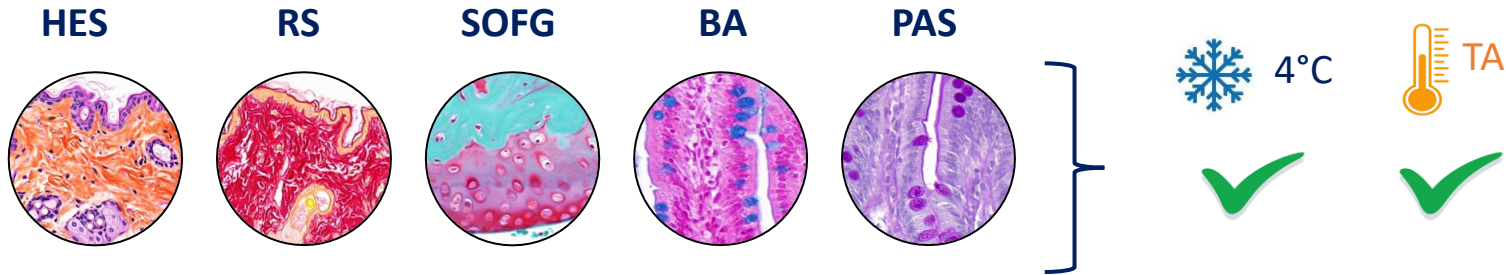
Proportion des fibres de collagène selon leur couleur en LP



Discussions / Conclusions

Synthèse des résultats

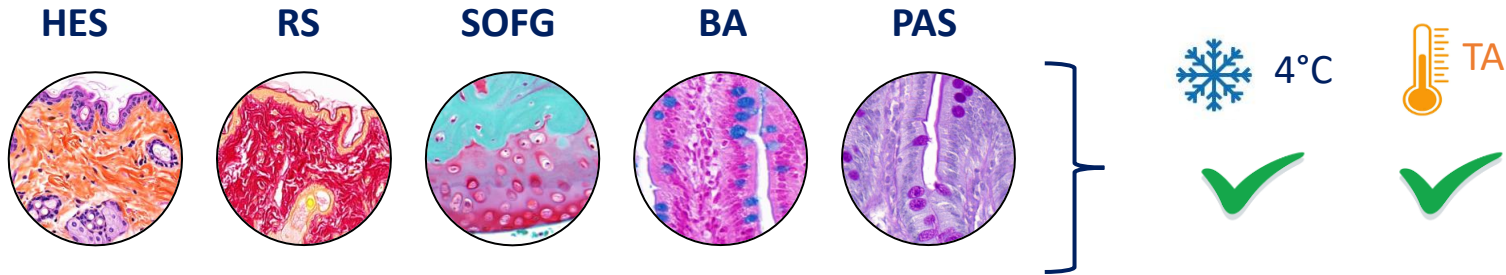
Conservation des lames : peu d'impact sur les colorations



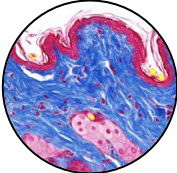
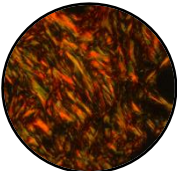
Discussions / Conclusions

Synthèse des résultats

Conservation des lames : peu d'impact sur les colorations



Sauf

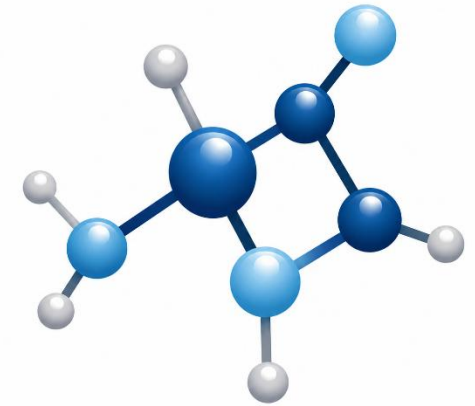
TM		 4°C	 TA	 4°C	 TA
					
Proportion des fibres colorées					
RS		EN COURS D'ANALYSE			
Lumière polarisée					

Que peut-on conclure de ces résultats ?

- Point commun entre Trichrome de Masson et Rouge Sirius : utilisation de l'acide picrique

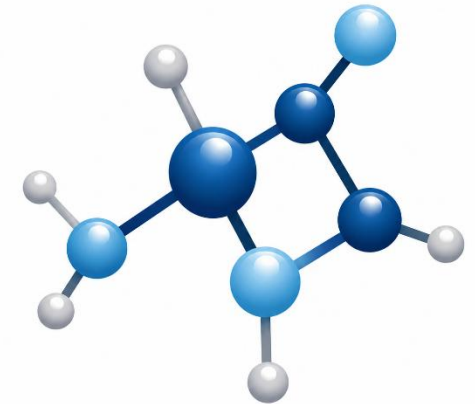
Que peut-on conclure de ces résultats ?

- Point commun entre Trichrome de Masson et Rouge Sirius : utilisation de l'acide picrique
- Oxydation lente des tissus ➡ Altération progressive des protéines et de la matrice extracellulaire :
 - modifications physico-chimiques des protéines :
 - formation de ponts disulfure,
 - oxydation de résidus (lysine, proline, hydroxyproline du collagène),
 - altération des groupements fonctionnels
 - changements de conformation ou d'accessibilité des fibres de collagène



Que peut-on conclure de ces résultats ?

- Point commun entre Trichrome de Masson et Rouge Sirius : utilisation de l'acide picrique
- Oxydation lente des tissus ➡ Altération progressive des protéines et de la matrice extracellulaire :
 - modifications physico-chimiques des protéines :
 - formation de ponts disulfure,
 - oxydation de résidus (lysine, proline, hydroxyproline du collagène),
 - altération des groupements fonctionnels
 - changements de conformation ou d'accessibilité des fibres de collagène
- Acide picrique + oxydation des lames blanches :
 - Diminution de l'affinité différentielle pour certains réactifs du Trichrome de Masson
 - Modification des sites de liaison des colorants du Rouge Sirius ?

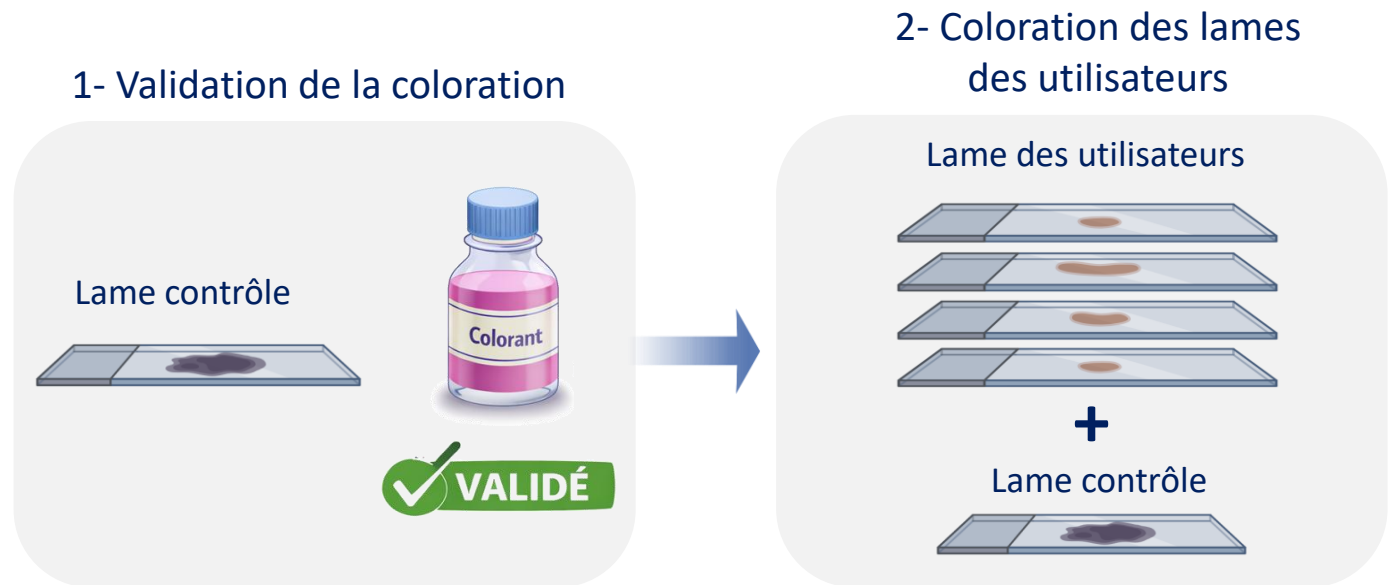


Bonnes pratiques au RHEM

- Conservation de toutes les lames blanches à 4°C
NB : Pour éviter l'oxydation : conservation des lames dans des pochettes contenant un gaz inerte, argon ou azote

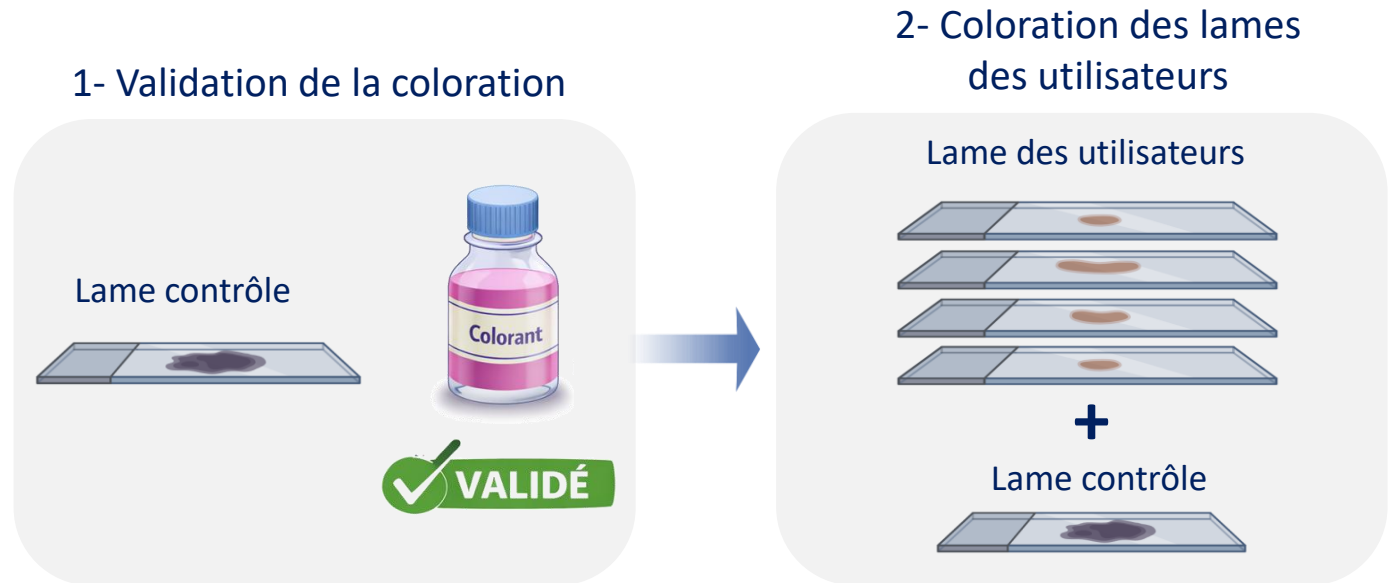
Bonnes pratiques au RHEM

- Conservation de toutes les lames blanches à 4°C
NB : Pour éviter l'oxydation : conservation des lames dans des pochettes contenant un gaz inerte, argon ou azote
- Nécessité/utilité d'avoir une lame contrôle pour valider les colorants



Bonnes pratiques au RHEM

- Conservation de toutes les lames blanches à 4°C
NB : Pour éviter l'oxydation : conservation des lames dans des pochettes contenant un gaz inerte, argon ou azote
- Nécessité/utilité d'avoir une lame contrôle pour valider les colorants
- Rigueur sur la méthodologie et la traçabilité



Remerciements



Florence Bernex

Matthieu Lacroix

Nelly Pirot

Morgane Broyon

Stéphanie Loubet

Jean Yohan Noël



Prisca Boisguérin

QUANTACELL



Gaetan Galisot

Christophe Latrille

Victor Racine

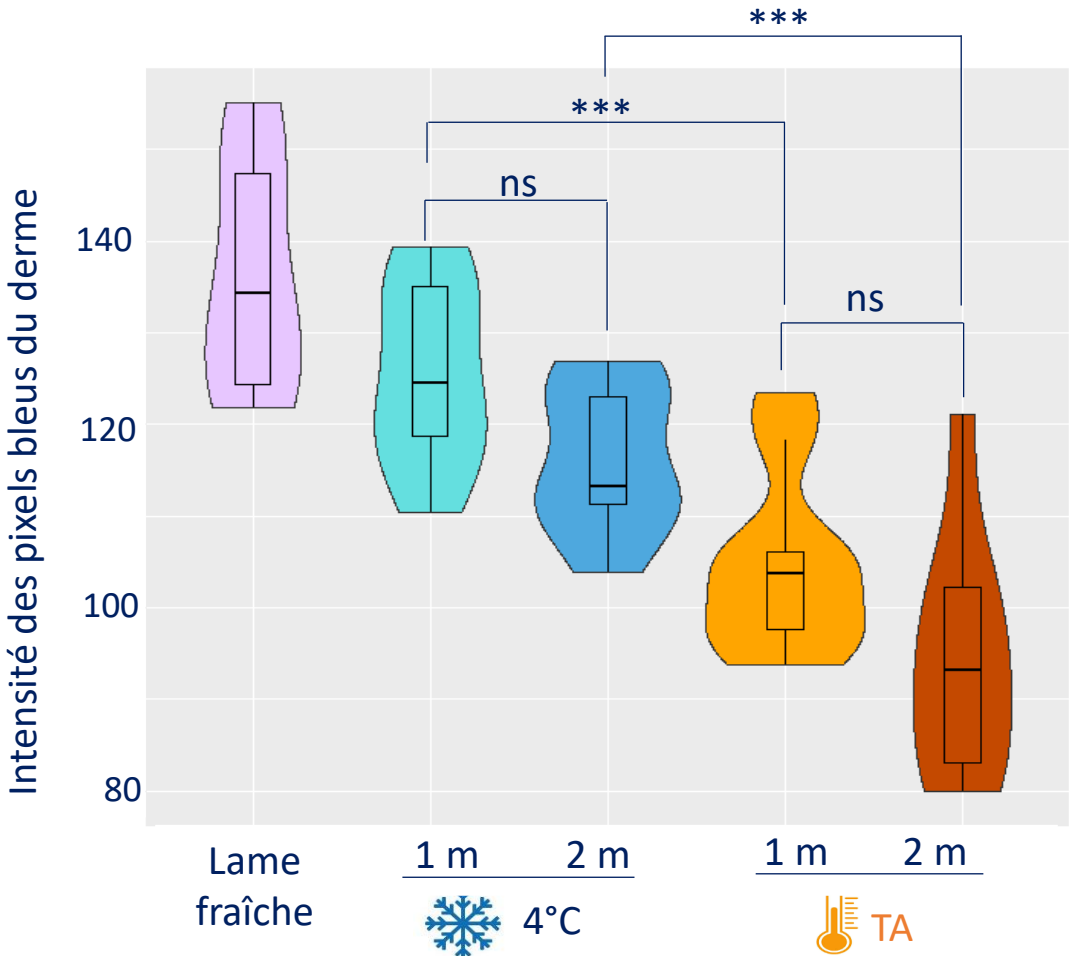
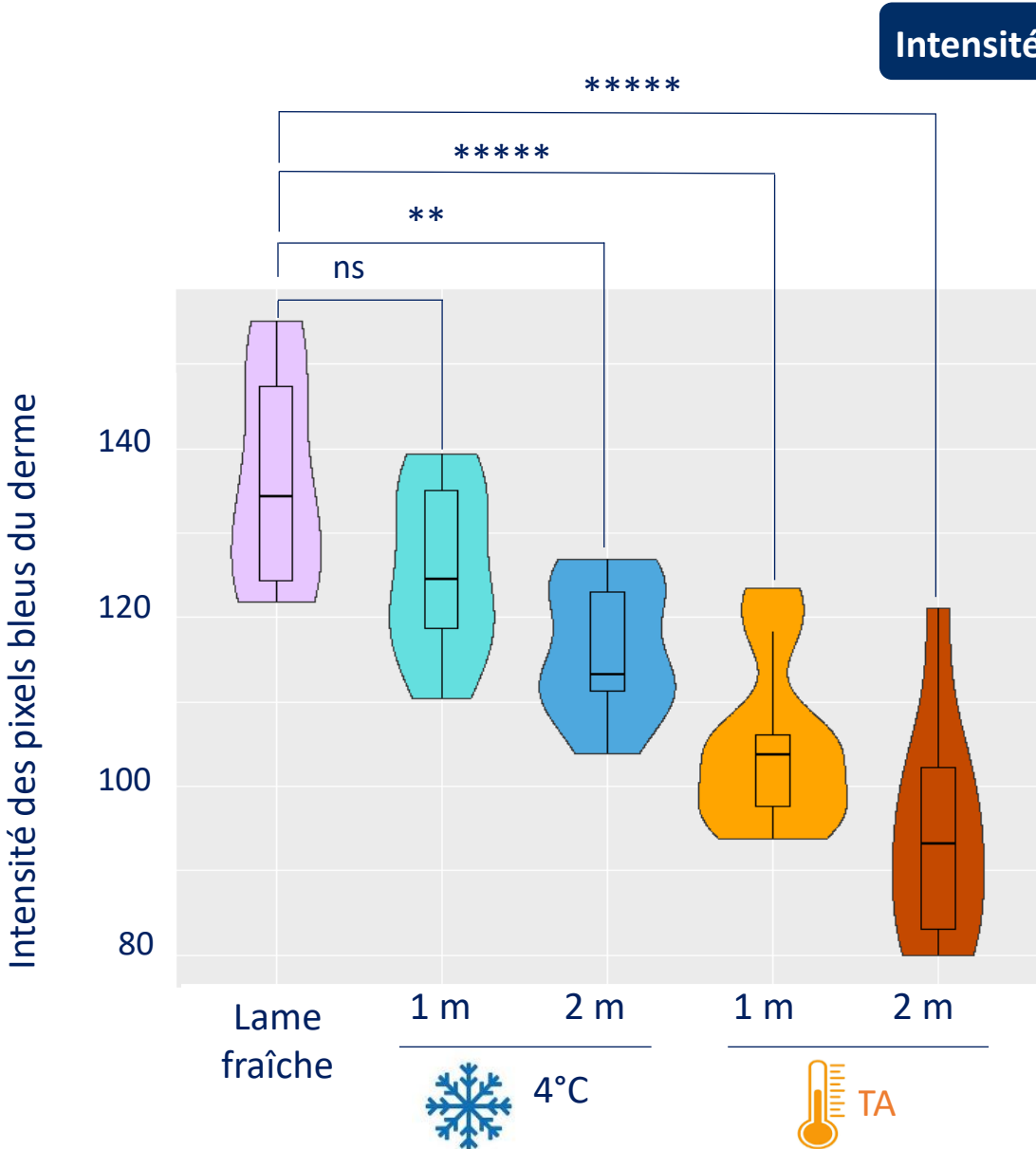


Volker Baecker

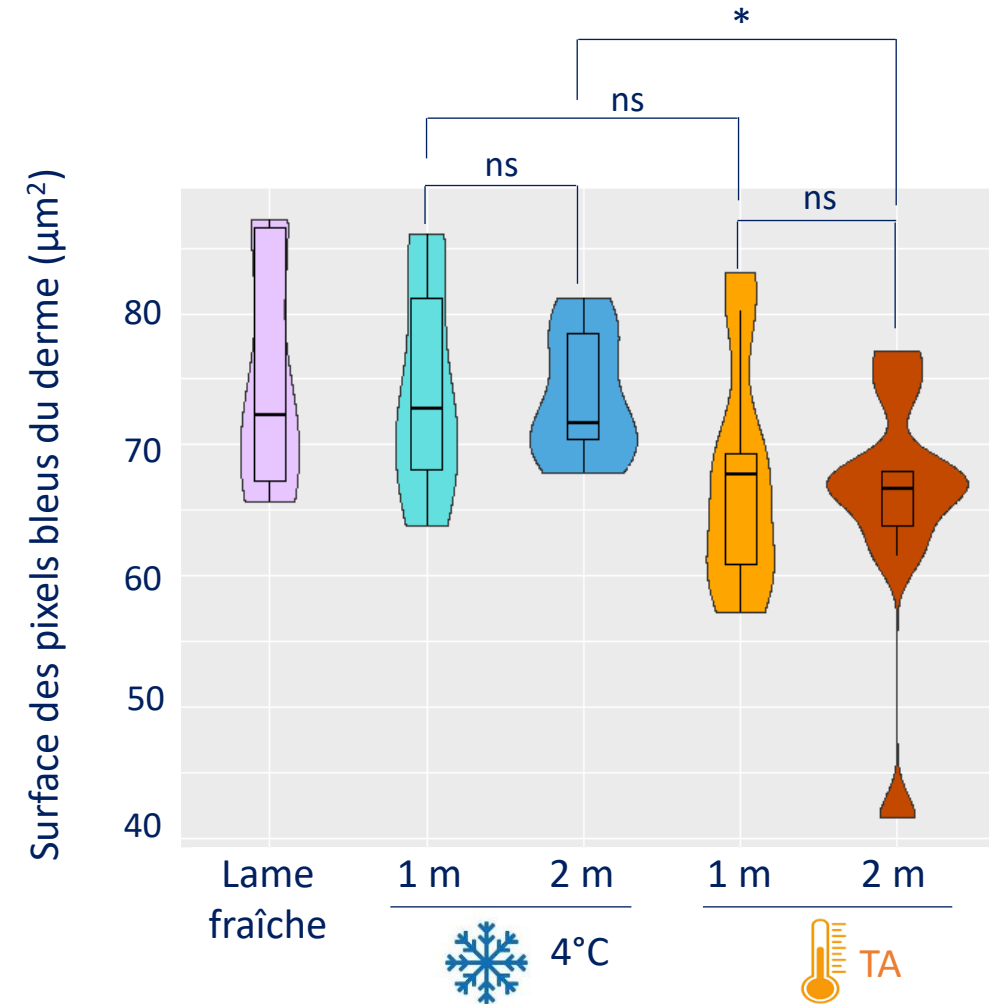
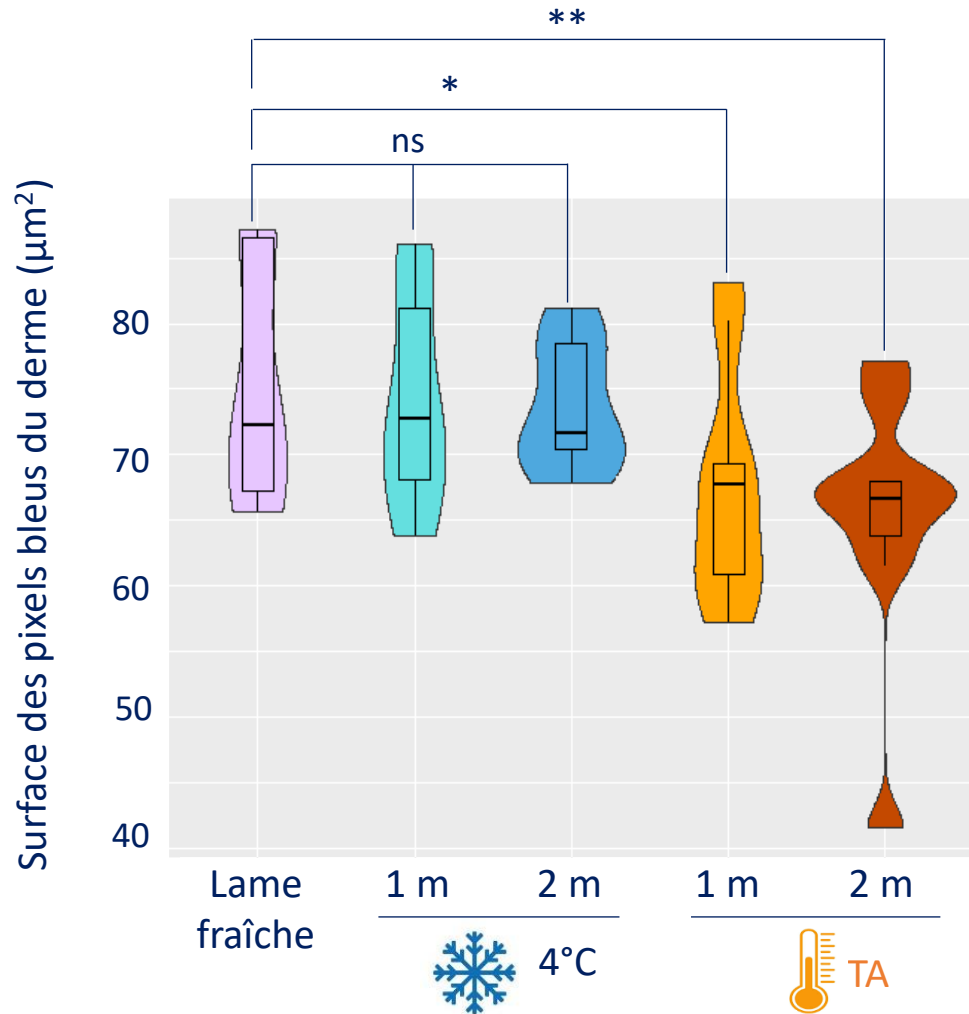


Manuela Pastore

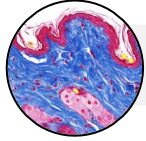




Surface des pixels bleus



Modes opératoires du Trichrome de Masson et du Rouge Sirius

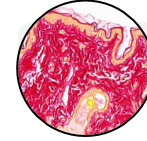


Trichrome de Masson

DEPARAFFINAGE	
Liquide de Bouin*	60 min
Eau courante	10 min
Eau pure	5 min
Ponceau BS 0,9% - Fuchsine acide 0,1%	10 min
Eau pure	3 min
Acides phosphomolybdique 2,5% - phosphotungstic 2,5%	10 min
Bleu de méthyle 2%	2min 30 sec
Eau pure	1 trempage
Eau pure	1 min
Acide acétique 1%*	2 min
DESHYDRATATION	

*Liquide de Bouin

Produit	Volume
Acide picrique saturé 1,3 %	150 mL
Formaldéhyde 37%	50 mL
Acide acétique glacial	10 mL



Rouge Sirius

DEPARAFFINAGE	
Picro Sirius Red 0,1%*	1 h (minimum)
Eau acidifiée	2 trempages
Enlever un maximum de liquide du portoir avec du papier absorbant	
Eau acidifiée	2 trempages
Enlever un maximum de liquide du portoir avec du papier absorbant	
Séchage des coupes ≈ 45 min	
DESHYDRATATION	

*Picro-Sirius Red 0,1%

Produit	Volume/Masse
Acide picrique saturé 1.3%	250 mL
Direct Red 80	0,25 g