Marqueurs de dommages musculaires et adaptations à l'exercice excentrique : microARNs circulants et raideur musculaire mesurée par élastographie

Emeric Chalchat

▶ **To cite this version:**

Emeric Chalchat. Marqueurs de dommages musculaires et adaptations à l'exercice excentrique : microARNs circulants et raideur musculaire mesurée par élastographie. Education. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC021 . tel-03919744

HAL Id: tel-03919744
https://theses.hal.science/tel-03919744

Submitted on 3 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Clermont Auvergne
École doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

MARQUEURS DE DOMMAGES MUSCULAIRES ET ADAPTATIONS A L'EXERCICE EXCENTRIQUE :

microARNs circulants et raideur musculaire mesurée par élastographie

Thèse présentée le 5 juillet 2022 par :
Emeric CHALCHAT

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Clermont Auvergne
Discipline : Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives
Spécialité : Entraînement et Optimisation de la Performance Sportive

Devant le jury composé de :

Léonard FEASSON (PU-PH, Université de Saint-Etienne)	*Rapporteur*
Marc JUBEAU (MCF-HDR, Université de Nantes)	*Rapporteur*
Caroline NICOL (MCF-HDR, Aix-Marseille Université)	*Examinatrice*
Émilie SIMONEAU (PR, Université Polytechnique Hauts-de-France)	*Examinatrice*
Nathalie BOISSEAU (PR, Université Clermont Auvergne)	*Examinatrice (Présidente du jury)*
Vincent MARTIN (PR, Université Clermont Auvergne)	*Directeur de thèse*
Sébastian GARCIA-VICENCIO (Chercheur, Institut de Recherche Biomédicale des Armées)	*Co-encadrant de thèse*
Julien SIRACUSA (Chercheur, Institut de Recherche Biomédicale des Armées)	*Co-encadrant de thèse*

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu **Léonard FEASSON** et **Marc JUBEAU** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Merci également d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse ces trois dernières années. Vos expertises et conseils scientifiques ont été d'une grande aide dans l'élaboration et l'aboutissement de ce travail.

Je remercie également **Caroline NICOL**, **Emilie SIMONEAU** et **Nathalie BOISSEAU** d'avoir accepté d'être examinatrices de ce travail de thèse.

Je remercie **l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA)** de m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse durant ces trois années et le **Laboratoire des *Adaptations Métaboliques à l'Exercice en conditions Physiologiques et Pathologiques* (AME2P)** de m'avoir accompagné dans ma formation ces cinq dernières années.

Je remercie **Sebastián GARCIA VICENCIO**, **Julien SIRACUSA** et **Vincent MARTIN** de m'avoir accompagné dans ma formation scientifique et dans l'aboutissement de ce travail de thèse.

Merci **Julien** et **Sebastián** de la confiance que vous m'avez accordée et pour votre bienveillance. Si j'étais votre premier étudiant en thèse, vous avez su m'encadrer parfaitement. Vos conseils, vos qualités humaines et votre capacité à transmettre ont été un atout pour ma formation. J'ai sincèrement apprécié travailler et passer du temps à vos côtés durant ces trois années.

Merci **Vincent** de m'avoir fait confiance dès mon master 1 et de m'avoir accompagné depuis. Je te remercie pour ton soutien, tes qualités humaines et les précieux conseils que tu as pu me donner durant toutes ces années. Merci pour ta grande disponibilité : même à distance, tu as toujours répondu présent lorsque j'avais besoin de ton expertise.

Je remercie également **Cyprien BOURRILHON**, investigateur principal des expérimentations de ce travail de thèse. Merci de m'avoir donné l'opportunité de participer au projet « LemuR » à Albi qui restera une très bonne expérience d'un point de vue personnel et professionnel.

Je souhaite également remercier **Alexandra MALGOYRE**, **Fabien SAUVET** et **Mounir CHENNAOUI**, mes supérieurs hiérarchiques à l'IRBA. Merci de la confiance que

vous m'avez accordée et d'avoir fait en sorte de me mettre dans les meilleures dispositions possibles pour mener à bien ce projet.

Merci à tous les membres de l'unité ***Physiologie de l'Exercice et des Activités en Conditions Extrêmes*** **(PEACE)** de l'IRBA pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans le déroulement des expérimentations. Je souhaite remercier particulièrement **Benoit** qui, en plus d'avoir prélevé des litres de sang, était toujours disponible avec sa bonne humeur. Merci à **Stéphane**, **Stéphanie** et **Arnaud** pour leur aide dans les analyses biologiques. Merci également à **Philippe**, **Caroline** et **Walid** pour leur soutien technique au cours de certaines expérimentations. Merci également à **Cyprien**, **Alexandra** et **Pierre-Emmanuel** d'avoir assuré la partie médicale. Je remercie également **Keyne** pour son aide, notamment pour les expérimentations à Albi. De plus, je souhaite remercier à nouveau **Julien** et **Sebastián** d'avoir grandement participé aux expérimentations.

Merci **Keyne** pour tes bons conseils et ton aide précieuse pour illustrer les résultats de ce travail de thèse. J'ai sincèrement apprécié travailler avec toi durant ces trois années.

Merci à **Edouard**, **Marvin** et **Roxane** pour leur aide, j'ai été ravi de les encadrer durant leur stage de master.

Merci à ceux qui ont assuré ponctuellement la partie médicale. Merci à l'**Unité Biologie Moléculaire** pour leur aide et la mise à disposition des équipements nécessaires à certaines analyses. Merci à l'**Unité Analyses Biologiques** pour leur aide dans certaines analyses. Merci à **Jean-Luc GENNISSON** pour son aide sur la partie acoustique.

Merci aux **athlètes et aux membres du staff technique de l'équipe de France de 24 h de course à pied** pour leur temps. Merci également au personnel du **Centre Hospitalier d'Albi** pour leur accueil et leur aide dans les analyses biologiques.

Merci à **l'ensemble des volontaires** pour leur participation. En effet, l'ensemble des connaissances scientifiques produites dans ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans participants.

I would like to thank **Kazunori NOSAKA** and **Luis PENAILILLO** for their contribution to the meta-analysis project. Gracias **Luis** por tu invitación a tu universidad, Aprendí mucho trabajando contigo y los miembros de tu laboratorio.

Merci également aux doctorants logeant sur le site de l'IRBA avec qui j'ai pu passer de bons moments, notamment autour des repas du soir et des séances sportives.

Je souhaite également remercier **Enzo** qui m'a encadré pendant mes deux années de master au sein du laboratoire AME2P et avec qui j'ai eu la chance de découvrir le milieu de la recherche. En plus d'avoir beaucoup appris à tes côtés, je garde de très bons souvenirs de cette période.

Je souhaite également remercier tous mes **amis proches**. Même si nous avons eu moins de temps pour nous voir ces trois dernières années, c'est toujours un plaisir de vous retrouver le temps d'un week-end.

Merci à **mes parents** qui m'ont toujours soutenu dans ce que je voulais faire.

Pour terminer, mes derniers remerciements s'adressent à **Laura**. Merci pour ton soutien au cours de ces trois dernières années. J'attends impatiemment le jour où nous serons enfin réunis.

SOMMAIRE

Liste des publications et des communications 8

Abréviations 11

Liste des figures 14

Liste des tableaux 24

Introduction générale 27

Partie 1. Revue de la littérature 31

I. Mode de contraction musculaire « excentrique » 32

II. Dommages musculaires et altérations de la fonction neuromusculaire 38

A. Altérations structurelles 38

B. Les facteurs aggravants 39

1. L'accumulation de calcium intracellulaire 39

2. Réponse inflammatoire et régénération musculaire 39

C. Altérations de la fonction neuromusculaire 40

1. Altérations d'origine centrale 40

2. Altérations d'origine périphérique 41

D. L'effet protecteur ou « *repeated bout effect* » 44

III. Marqueurs indirects de dommages musculaires 47

A. Force maximale volontaire 49

B. Autres marqueurs de dommages musculaires 53

1. Angle optimal 53

2. Taux de développement du moment de force, *Rate of torque development* 53

3. Courbatures, ou « *delayed-onset muscle soreness* » 54

4. Gonflement du muscle, œdème 55

5. Raideur du système musculo-tendineux 56

a. Amplitude de mouvement articulaire, ou « *range of motion* » 56

b. Dynamométrie 57

c. Échographie 57

6. Marqueurs sanguins 58

a. Activité de la créatine kinase 58

b. Concentration de la myoglobine 59

c. Autres marqueurs couramment utilisés 59

C. « Nouveaux » marqueurs 60

1. Raideur musculaire mesurée par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement 61

a. Introduction à l'élastographie 61
b. Applications et contraintes méthodologiques 63
c. Elastographie et exercices excentriques 64
d. Elastographie et exercices fatigants 66
2. MicroARNs 67
a. Introduction aux microARNs 67
b. Les microARNs circulants 69
c. Les microARNs musculaires, ou myomiRs 70
d. MyomiRs circulants comme marqueurs indirects de dommages musculaires 71

IV. Objectifs et hypothèses 74
A. Objectif préliminaire 74
B. Objectifs principaux 75
1. MicroARNs circulants 75
2. Raideur musculaire mesurée par élastographie 75
C. Objectif méthodologique 76

Partie 2. Matériels et méthodes 77

I. Organisation générale des travaux de thèse 78

II. Procédures expérimentales 80
A. Anthropométrie 80
B. Moment de force à l'articulation du genou 80
C. Stimulation électrique du nerf fémoral 81
D. Évaluation globale de la fonction neuromusculaire 82
1. Contraction maximale volontaire des extenseurs du genou 82
2. Hauteur de saut 82
E. Évaluation des composantes de la fonction neuromusculaire 83
1. Paramètres de la composante périphérique 83
2. Paramètres de la composante centrale 84
F. Angle optimal de production du moment de force 85
G. Amplitude de mouvement 85
H. Douleurs musculaires 86
I. Seuil de pression de la douleur, ou « *pain pressure threshold* » (PPT) 87
J. Circonférence de la cuisse 88
K. Architecture musculaire 88
L. Marqueurs sanguins 89
1. Prélèvements 89
2. Analyse de l'activité de la créatine kinase et de la concentration de la Myoglobine 89
3. Analyse des miARNs 89
a. Extraction des ARNs du plasma 90

b. *Reverse transcription*, synthèse des ADN complémentaires 90
c. PCR quantitative en temps réel 91
d. Normalisation des résultats de RT-qPCR 92
M. Elastographie et imagerie ultrarapide 93
1. Acquisition des données 93
2. Analyse des données 94
a. Module de cisaillement musculaire 94
b. Raideur de l'aponévrose 94
N. Indice de protection 95

***Partie 3. Contribution personnelle* 97**

***Sous-partie 1. Évaluation des marqueurs indirects de dommages musculaires les plus utilisés dans la littérature* 98**

I. Étude 1 : Évaluation de la pertinence des marqueurs indirects de dommages musculaires après des exercices excentriques des membres inférieurs : Revue systématique avec méta-analyse 100

A. Résumé 101
B. Problématiques et objectifs 102
C. Procédures expérimentales 103
1. Recherche bibliographique 103
2. Critères de sélection 105
3. Recueil des données et évaluation de la qualité des études 105
4. Standardisation des données (codage) 106
5. Analyses statistiques 106
D. Résultats 108
1. Études incluses : Caractéristiques et classification en clusters 108
2. Cinétique des marqueurs indirects de dommages musculaires 113
a. Marqueurs de la capacité de production de force 113
b. Amplitude du mouvement articulaire 114
c. Douleurs musculaires 114
d. Gonflement du muscle 114
e. Marqueurs sanguins 116
3. Facteurs associés à la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ 118
4. Méta-régression : association entre marqueurs EIMD et la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ 118
a. Associations dans les 6 h suivant l'exercice 118
b. Associations entre 24 et 48 h après l'exercice 119
c. Associations au-delà de 48 h après l'exercice 119
E. Discussion 120
1. Cinétique des marqueurs indirects de dommages musculaires 120

a. Marqueurs de la capacité de production de force 120
b. Douleurs musculaires, amplitude de mouvement, et gonflement du muscle 121
c. Marqueurs sanguins 122
d. Recommandations 124
2. Facteurs affectant la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ 124
3. Marqueurs de dommages musculaires associés avec la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ 125
a. Marqueurs de la capacité de production de force 125
b. Douleurs musculaires, amplitude de mouvement, et gonflement du muscle 126
c. Marqueurs sanguins 127
d. Recommandations 128
4. Limites 128
F. Conclusion 128

Sous-partie 2. Évaluation des microARNs circulants et de la raideur musculaire mesurée par élastographie après des exercices induisant des dommages musculaires 130

Sous-partie 2.1. Évaluation des microARNs circulants après des exercices induisant des dommages musculaires 132

I. Étude 2 : Niveaux circulants des microARNs après un ultra-marathon de 24 heures de course à pied en relation avec les marqueurs de dommages musculaires chez des athlètes élites 134

A. Résumé 135
B. Problématiques et objectifs 136
C. Procédures expérimentales 137
1. Participants 137
2. Protocole 137
3. Analyses statistiques 139
D. Résultats 139
1. Hauteur de saut 139
2. Douleurs musculaires 140
3. Marqueurs sanguins classiques de dommages musculaires 140
4. Niveaux circulants des miARNs 141
5. Corrélations avec la réduction de la hauteur de saut à 24 h 143
E. Discussion 145
1. Modifications des marqueurs classiques de dommages musculaires 145
2. Modifications des niveaux circulants des miARNs 146
3. Intérêt des marqueurs pour prédire la perte prolongée de la fonction musculaire 148
4. Limites 150
F. Conclusion 151

II. Étude 3a : Niveau circulant des microARNs après des dommages musculaires induits par l'exercice et effet protecteur 152

A. Résumé 153

B. Problématiques et objectifs 154

C. Procédures expérimentales 154

1. Participants 154

2. Protocole 155

3. Analyses statistiques 155

D. Résultats 157

1. Valeurs initiales 157

2. Moment de force maximale volontaire 157

3. Niveaux circulants des miARNs 158

4. Activité de la créatine kinase 160

5. Concentration de la myoglobine 160

6. Corrélations entre les modifications des myomiRs et l'indice de protection 160

7. Corrélations entre la CK, la Mb et les miARNs circulants 161

8. Corrélations entre les marqueurs circulants et la réduction prolongée de la FMV 161

E. Discussion 164

1. Niveaux circulants en réponse aux exercices de marche en descente 164

a. Niveaux circulants en réponse au premier exercice de marche en descente 164

b. Comparaison des niveaux circulants entre l'exercice 1 et l'exercice 2 166

2. Association entre les marqueurs de dommages musculaires sanguins et la réduction prolongée du moment de FMV 167

3. Limites 168

F. Conclusion 169

Sous-partie 2.2 Évaluation de la raideur musculaire mesurée par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement après des exercices induisant des dommages musculaires 170

I. Étude 3b : Le module de cisaillement musculaire comme indicateur d'adaptations conférées par l'exercice excentrique 172

A. Résumé 173

B. Problématiques et objectifs 174

C. Procédures expérimentales 175

1. Participants 175

2. Protocole 176

3. Analyses statistiques 176

D. Résultats 178

1. Valeurs initiales 178

2. Fonction neuromusculaire 178
3. Activité de la créatine kinase 181
4. Douleurs musculaires par EVA 181
5. Amplitude de mouvement 181
6. Circonférence de la cuisse 181
7. Seuil de pression de la douleur musculaire 181
8. Épaisseur musculaire 182
9. Angle de pennation 183
10. Module élastique de cisaillement (µ) 183
11. Corrélation entre le µ mesuré 14 jours après l'exercice 1 et l'indice de protection 185
E. Discussion 187
1. Amplitude et cinétique des symptômes classiques de dommages musculaires 187
2. Amplitude et cinétique du µ musculaire 188
3. Augmentation à long terme du µ musculaire, une adaptation « protectrice » 189
4. Différences entre les réponses des muscles RF et VL 190
5. Limites 190
F. Conclusion 191

Sous-partie 3. Effet de l'angle articulaire sur les paramètres de la fonction neuromusculaire après un exercice excentrique 192

I. Étude 3c : Les propriétés contractiles sont moins affectées à grandes qu'à courtes longueurs musculaires après un exercice excentrique 194

A. Résumé 195
B. Problématiques et objectifs 196
C. Procédures expérimentales 198
1. Participants 198
2. Protocole 198
3. Analyses statistiques 199
D. Résultats 199
1. Douleurs musculaires 199
2. Propriétés neuromusculaires 199
a. Moment de force maximale volontaire 200
b. Angle optimal 201
c. Niveau d'activation volontaire 201
d. Secousse musculaire 201
e. Potentialisation (Tw_p/Tw) 201
f. Doublet à 10 Hz 202
g. Doublet à 100 Hz 202
h. Fatigue basse fréquence (Db10/Db100) 202
i. Taux de développement du moment de force 202

3. Module de cisaillement musculaire 204
4. Raideur de l'aponévrose 204
E. Discussion 205
1. Dépendance à la longueur du moment de FMV et des réponses évoquées à haute fréquence 206
2. Dépendance à la longueur des réponses évoquées à basse fréquence 206
a. Effet de la sensibilité au Ca^{2+} 206
b. Effet des propriétés mécaniques de l'ensemble muscle-tendon 207
3. Implications méthodologiques 208
F. Conclusion 209

Partie 4. Discussion générale 211

I. Réponses des marqueurs à l'exercice excentrique 213
A. Marqueurs couramment utilisés 213
B. MicroARNs circulants 217
C. Raideur musculaire mesurée par élastographie 220
D. Approche combinée 222

II. « Nouveaux » marqueurs et « *repeated bout effect* » 223
A. MicroARNs circulants 223
B. Raideur musculaire mesurée par élastographie 224

Partie 5. Conclusion générale 229

Références 232

Annexes 252

I. Protocoles d'analyse biologique 252
A. Annexe 1 : Extraction des ARNs du plasma 252
B. Annexe 2 : *Reverse transcription*, synthèse des ADN complémentaires 254

II. Articles publiés ou en cours de publication 255
A. Annexe 3 : Étude 1 255
B. Annexe 4 : Étude 2 292
C. Annexe 5 : Étude 3a 307
D. Annexe 6 : Étude 3b 329
E. Annexe 7 : Étude 3c 345

Liste des publications et des communications

Liste des publications issues du travail de thèse :

Articles publiés :

ARTICLE | *Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes*. **Chalchat E**, Charlot K, Garcia-Vicencio S, Hertert P, Baugé S, Bourdon S, Bompard J, Farges C, Martin V, Bourrilhon C, Siracusa J. Scand J Med Sci Sports. 2021 Sep;31(9):1782-1795. doi: 10.1111/sms.14000. Epub 2021 Jun 7.

ARTICLE | *Muscle shear elastic modulus provides an indication of the protection conferred by the repeated bout effect.* **Chalchat E**, Siracusa J, Bourrilhon C, Charlot K, Martin V, Garcia-Vicencio S. Front Physiol. 2022. April 29; 13:877485 Doi: 10.3389/fphys.2022.877485.

Articles Soumis :

ARTICLE | *Appropriateness of indirect markers of muscle damage following lower limbs eccentric-biased exercises: A systematic review with meta-analysis.* **Chalchat E**, Gaston AF, Charlot K, Peñailillo L, Valdés O, Tardo-Dino PE, Nosaka K, Martin V, Garcia-Vicencio S, Siracusa J. Soumis dans *PLOS ONE* le 16/03/2022, en révision depuis le 26/04/2022.

ARTICLE | *Contractile properties are less affected at long than short muscle length after eccentric exercise*. **Chalchat E**, Siracusa J, Bourrilhon C, Charlot K, Gennisson J-L, Garcia-Vicencio S, Martin V. Soumis dans l'*European Journal of Applied Physiology* le 21/03/2022.

ARTICLE | *Circulating microRNAs levels after exercise-induced muscle damage and the repeated bout effect.* **Chalchat E**, Martin V, Charlot K, Bourrilhon C, Baugé S, Bourdon S, Gruel A, Lepetit B, Banzet S, Garcia-Vicencio S, Siracusa J. Soumis dans l'*American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* le 29/04/2022.

Liste des communications issues du travail de thèse :

Communications dans un congrès international :

ORAL | *Circulating microRNAs: Biomarkers of muscle damage after a 24-hour ultramarathon run in elite athletes*. **Chalchat E**, Charlot K, Garcia-Vicencio S, Hertert P, Bourdon S, Bauge S, Dechambre J, Farges C, Martin V, Bourrilhon C, Siracusa J. 25th ECSS 2020.

ORAL | *Validity of the indirect biomarkers used in exercise-induced muscle damage: A systematic review with meta-analysis*. **Chalchat E**, Gaston AF, Charlot K, Peñailillo L, Valdés O, Tardo-Dino PE, Nosaka K, Martin V, Garcia-Vicencio S, Siracusa J. ACAPS Montpellier (France) 2021.

ORAL | *The effect of knee joint angle on neuromuscular changes after an exercise-induced muscle damage.* Martin V, **Chalchat E**, Siracusa J, Garcia-Vicencio S. ACAPS Montpellier (France) 2021.

ORAL | *Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes.* Siracusa J, **Chalchat E**, Charlot K, Garcia-Vicencio S, Hertert P, Baugé S, Bourdon S, Bompard J, Farges C, Martin V, Bourrilhon C. ACAPS Montpellier (France) 2021.

Conférences invitées :

ORAL | *Markers of exercise-induced muscle damage.* **Chalchat E.** Séminaire interne Universidad Andrès Bello, Santiago (Chili) 2021.

ORAL | *Markers of exercise-induced muscle damage.* **Chalchat E.** Séminaire interne Laboratoire AME2P, Clermont-Ferrand (France) 2021.

ORAL | *Markers of exercise-induced muscle damage.* **Chalchat E.** Séminaire interne Laboratoire LBEPS, Evry (France) 2021.

Communications aux journées des doctorants :

ORAL | *Lésions musculaires et port de charge: Intérêt prédictif de biomarqueurs innovants pour le suivi de la mise en condition opérationnelle*. Journée des doctorants IRBA, Brétigny-sur-Orge (France) 2020.

ORAL | *microARNs circulants et raideur musculaire mesurée par élastographie comme marqueurs de dommages musculaires*. Journée des doctorants IRBA, Brétigny-sur-Orge (France) 2021.

ORAL | *Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes*. Journée de l'Ecole Doctorale SVAE, Clermont-Ferrand (France) 2021.

ORAL | *Appropriateness of indirect markers of muscle damage following lower limbs eccentric-biased exercises: A systematic review with meta-analysis.* Journée des doctorants IRBA, Brétigny-sur-Orge (France) 2022.

Liste des publications annexes (en parallèle du projet de thèse) :

ARTICLE | *Changes in the viscoelastic properties of the vastus lateralis muscle with fatigue*. **Chalchat E**, Gennisson J-L, Peñailillo L, Oger M, Malgoyre A, Charlot K, Bourrilhon C, Siracusa J, Garcia-Vicencio S. Front Physiol. 2020 April 24;11:307. Doi: 10.3389/fphys.2020.00307.

ARTICLE | *Analysis of food and fluid intake in elite ultra-endurance runners during a 24-h world championship*. Lavoué C, Siracusa J, **Chalchat E**, Bourrilhon C, Charlot K. J Int Sports Nutr. 2020 Jul 11 ;17(1):36. Doi: 10.1186/s12970-020-00364-7.

ARTICLE | *Fluctuations in food and fluid intake during a 24-h world championship: analysis of the deviation from nutritional programs.* Charlot K, Lavoué C, Siracusa J, **Chalchat E**, Hertert P, Bourrilhon C. J Int Sports Nutr. 2022 Mar 30 ;19(1): 92-109. Doi: 10.1080/15502783.2022.2046443.

Liste des communications annexes (en parallèle du projet de thèse) :

ORAL | *Évaluation des propriétés viscoélastiques du muscle vastus lateralis par Supersonic Shear imaging à l'issue d'un exercice fatigant*. **Chalchat E**, Garcia-Vicencio S, Genisson JL, Nordez A, Ogier M, Charlot K, Siracusa J. ACAPS Paris (France) 2019.

ORAL | *Repeated bout effect: Neuromuscular and cardiorespiratory responses during downhill walking in relation to muscle function loss.* Garcia-Vicencio S, **Chalchat E**, Bourrilhon C, Lepetit B, Bourdon S, Dubois R, Subryan M, Charlot K, Siracusa J, Martin V. ACAPS Montpellier (France) 2021.

Abréviations

ADNc : ADN complémentaire

ADP : adénosine diphosphate

ALT : alanine aminotransférase

APS : activité physique et sportive

ARNm : ARN messager

AST : aspartate aminotransférase

ATP : adénosine triphosphate

BMD : dystrophie musculaire de Becker

Ca^{2+} : calcium

CK : créatine kinase

CMJ : saut en contre-mouvement, *counter-movement jump*

CMV : contraction maximale volontaire

Cq : cycle de quantification

Couplage E-C : Couplage excitation-contraction

Db10 : doublet à basse fréquence

Db100 : doublet à haute fréquence

DMD : dystrophie musculaire de Duchenne

DOMS : Douleurs musculaires d'apparition retardée, *Delayed-onset muscle soreness*

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EIMD : Dommages musculaires induits par l'exercice, *Exercise-induced muscle damage*

EMG : électromyographie

EVA : échelle visuelle analogique

FMV : force maximale volontaire

HIGH : forts répondeurs, *high responders*

hsa : *homo sapiens*

hs-cTnT : troponine T cardiaque hautement sensible

IL-6 : interleukine-6

IP : indice de protection

IRM : imagerie par résonance magnétique

K^+ : potassium

LDH : Lactate déshydrogénase

LOW : faibles répondeurs, *low responders*

Mb : myoglobine

MC : masse corporelle

MEP : potentiel évoqué moteur, *motor-evoked potential*

miARNs : microARNs

MOD : répondeurs modérés, *moderate responders*

myomiRs : microARNs spécifiques du tissu musculaire

Na^+ : sodium

NAV : niveau d'activation volontaire

PAP : potentialisation post-activation, *post-activation potentiation*

Pcr : phosphocréatine

PPT : seuil de pression de la douleur, *pain pressure threshold*

Pré-miARNs : miARNs précurseurs

Pri-miARNs : microARNs primaires

RBE : Effet protecteur, *Repeated bout effect*

RF : *Rectus femoris*

RNAse : Ribonucléase

ROM : amplitude de mouvement, *range of motion*

RT : synthèse des ADN complémentaires, *Reverse transcription*

RT-qPCR : *Real-time quantitative polymerase chain reaction*

RTD : taux de développement du moment de force, *rate of torque development*

SMD : différences moyennes standardisées, *standardized mean differences*

SP : période de silence, *silent period*

SST : Tube séparateur de sérum, *Serum separating tube*

T_2 : Temps de relaxation transversale

TMS : stimulation magnétique transcrânienne, *transcranial magnetic stimulation*

μ : module de cisaillement

VEs : vésicules extracellulaires

VL : *vastus lateralis*

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique des principales structures d'un sarcomère (A) et coupe longitudinale d'un muscle montrant les détails d'un sarcomère (B). La barre d'échelle correspond à 500 nm. Figure adaptée de Luther (2009). 32

Figure 2. Relation force-vitesse pour différents niveaux d'activation. La courbe d'activation maximale (supérieure) montre que la force maximale volontaire est supérieure pour les contractions excentriques par rapport aux autres types de contraction. Les deux cercles blancs montrent que les contractions excentriques nécessitent une moindre activation par rapport aux contractions concentriques pour produire une force donnée (à vitesse équivalente). Figure adaptée de Reeves et coll. (2009)..... 34

Figure 3. Relation force-longueur d'un sarcomère (en haut) et représentation du sarcomère dans différentes configurations de longueur (en bas). Les configurations sont numérotées de 1 à 5 sur la relation-force. La ligne hachurée représente la force passive. Figure adaptée de Rassier et coll. (1999)..... 37

Figure 4. Coupe longitudinale du muscle vastus lateralis avant (A) et un jour après (B) un exercice de course en descente. L'image A montre des sarcomères sains, tandis que l'image B montre des sarcomères lésés avec une perturbation de l'alignement des stries Z (dommages musculaires). Images issues de Féasson et coll. (2002). 38

Figure 5. Représentation schématique des différents sites et processus permettant la production de la force et de la puissance musculaire et pouvant être impliqués dans l'altération de la fonction neuromusculaire. Figure adaptée de Hunter (2018)..... 43

Figure 6. Récupération de la capacité de production de force de sujets ayant effectué des exercices excentriques. Les dommages musculaires sont considérés comme « faibles », « modérés », et « sévères » lorsque la diminution de la capacité de production de force au-delà de 24 h est d'environ 5, 20 et 35 %, respectivement. À noter que la capacité de production de force est récupérée dans les 48 h lorsque les dommages musculaires sont « faibles », entre 48 et 168 h lorsqu'ils sont « modérés » et au-delà de 168 h lorsqu'ils sont « sévères ». Figure adaptée de (Paulsen et coll., 2012)..... 48

Figure 7. **Modification de la force maximale volontaire (FMV) des extenseurs du genou avant (PRE), immédiatement après (POST), et 1, 24, 48, 72, 96 h après (1 H, 24 H, 48 H, 72 H, 96 H) des contractions maximales volontaires concentriques (à gauche) et excentriques (à droite).** La perte de force mesurée immédiatement après la fin de l'exercice et similaire pour les deux conditions, mais la récupération est bien plus longue

après les contractions excentriques, connues pour induire des dommages musculaires. FMV : force maximale volontaire. Figure adaptée de Souron et coll. (2018). 50

Figure 8. Classification des faibles répondeurs (LR), répondeurs modérés (MR) et forts répondeurs (HR), basé sur la plus grande perte de force maximale volontaire (FMV) mesurée au-delà de 24 h après un exercice induisant des dommages musculaires (A). La valeur est présentée en pourcentage la valeur initiale (%pre). Les figures B-E représentent les changements les plus importants (valeur pic) par rapport à la valeur initiale de la douleur musculaire **(B)**, de la créatine kinase (CK) **(C)**, de l'amplitude de mouvement (ROM) **(D)**, et de la circonférence du membre lésé **(E)**. Figure adaptée de Damas et coll. (2016). 51

Figure 9. Modifications par rapport à la valeur initiale de la force maximale volontaire (FMV) (A), de la douleur musculaire (B), de l'activité de la créatine kinase (CK) (C), de l'amplitude de mouvement (ROM) (D), et de la circonférence du membre lésé (E) jusqu'à 5 jours après un exercice induisant des dommages. Les modifications sont représentées (moyenne ± ET) pour les faibles répondeurs (LR), répondeurs modérés (MR) et forts répondeurs (HR) et pour l'ensemble de l'échantillon. %pre : pourcentage de la valeur initiale. Figure adaptée de Damas et coll. (2016)..... 51

Figure 10. Valeurs de l'activité de la créatine kinase (A), de la douleur musculaire (B), et de la force maximale volontaire (C) avant et jusqu'à 5 jours après un exercice induisant des dommages musculaires pour les faibles répondeurs (LR) (n = 31), répondeurs modérés (MR) (n = 50), et forts répondeurs (HR) (n = 28). La classification concernant les répondeurs était basée sur le pic de créatine kinase (LR :< 500 U/L ; MR : entre 500 et 2000 U/L ; HR : > 2000 U/L). Figure adaptée de Clarkson et coll. (1992). 52

Figure 11. Représentation de l'acquisition d'une image par élastographie par onde de cisaillement. (A) La sonde émet des faisceaux ultrasonores (« pushs ») focalisés en regard du muscle qui se propagent en ondes de cisaillements. Une séquence d'imagerie ultrasonore ultrarapide permet de suivre la propagation de l'onde de cisaillement. (B) L'image de gauche représente un « push » quelques instants (0.25ms) après son émission, avant qu'il se propage perpendiculairement. L'image de droite représente les vitesses de propagation sur la zone d'intérêt. 62

Figure 12. Corrélation entre l'augmentation du module de cisaillement mesurée 30 min après l'exercice et la diminution du moment de force maximal volontaire (FMV) mesuré 48 h après l'exercice. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la valeur

initiale (%PRE). EG : extenseurs du genou ; FC : Fléchisseurs du coude. Adaptée de Lacourpaille et coll. (2017). 65
Figure 13. Voie de synthèse classique des microARNs. Adaptée de Winter et coll. (2009) 69
Figure 14. Exports des miARNs dans le milieu extracellulaire (Baulande et coll., 2014). 70
Figure 15. Comparaison des niveaux sériques de miR-1, miR-133, miR-206 chez des sujets sains, et des patients atteints de dystrophies musculaires de Becker (BMD) ou de Duchenne (DMD). Adaptée de Cacchiarelli et coll. (2011)..... 71
Figure 16. Comparaison des niveaux plasmatiques de miR-1, miR-133a, miR-133b et miR-208b avant (PRE), après (POST) et 2, 6, 24, 48, 72 h (2 h, 6 h, 48 h, 72 h) après un exercice concentrique (blanc) et un exercice excentrique (noir). Adaptée de Banzet et coll. (2013). 72
Figure 17. Design expérimental de l'étude 3. Les participants ont effectué deux exercices de marche en descente séparés par 14 jours sur un tapis roulant pendant 45 min (pente : -25 % ; vitesse : 4,5 km/h) en portant une charge équivalente à 30 % de la masse corporelle (MC). Différentes mesures ont été effectuées avant (PRE), après (POST) et 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h (7 jours) après ces deux exercices. 79
Figure 18. Position d'un sujet lors de l'évaluation de la fonction neuromusculaire. L'angle de hanche est fixé à 70° (0° étant la position allongée). A noter que la sonde échographique est positionnée sur le muscle rectus femoris à l'aide du dispositif USONO (Eindhoven, Pays-Bas)..... 80
Figure 19. Représentation schématique de la configuration permettant de délivrer des stimulations électriques au niveau du nerf fémoral 81
Figure 20. Représentation d'une courbe de recrutement d'un individu. La réponse mécanique correspond à la valeur pic de la secousse musculaire évoquée par une stimulation simple au repos. L'intensité optimale (I_{opt}) correspond à l'intensité à laquelle la réponse mécanique atteint sa valeur maximale et commence à plafonner. 82
Figure 21. Représentation schématique de l'évaluation de la hauteur de saut à l'aide des cellules photoélectriques Optojump (Microgate, Bolzano, Italie)...... 83
Figure 22. Exemple d'une secousse musculaire (à gauche), et de doublets à basse (au milieu) et haute (à droite) fréquences. Les flèches représentent les instants auxquels les stimulations électriques ont été délivrées au niveau du nerf fémoral..... 84
Figure 23. Représentation de la technique de secousse surimposée lors d'une contraction maximale volontaire d'un individu. Les secousses surimposées ($Db100_{sur}$) et

potentialisée ($Db100_{pot}$) sont évoquées respectivement lorsque la force maximale volontaire est atteinte et lorsque le muscle est relâché (3 secondes après la fin de la contraction volontaire). 85

Figure 24. Représentation schématique de l'évaluation de l'amplitude de mouvement articulaire. 86

Figure 25. Échelle visuelle analogique permettant de quantifier la douleur. L'échelle comporte un côté où le participant cote la douleur (en haut) et un côté où l'investigateur relève la valeur de cette douleur en millimètres (en bas). 87

Figure 26. Représentation schématique de l'algomètre (NOD, OT Bioelettronica,, Turin, Italie) positionné au niveau du muscle rectus femoris de la cuisse droite. 87

Figure 27. Représentation schématique de l'évaluation de la circonférence de la cuisse 88

Figure 28. Schéma de la synthèse des ADNc avec le kit miRCURY LN RT (Qiagen, Courtaboeuf, France). (A) Une queue poly-A est ajoutée à l'extrémité 3' du miARN mature ; (B) l'ADNc est ensuite synthétisé avec une amorce poly-T possédant un ancrage dégénéré à son extrémité 3' et un tag universel à son extrémité 5'. Figure adaptée de la documentation du fabricant. 90

Figure 29. Schéma de l'amplification des ADNc avec le kit miRCURY LN RT (Qiagen, Courtaboeuf, France). (A) Une amorce sens se fixe à l'extrémité 3' de l'ADNc et l'amorce antisens se fixe à la fois sur le tag universel, la queue poly-T et l'extrémité 5' de l'ADNc ; (B) La détection de l'amplification est ensuite réalisée grâce à la détection du SYBR green, qui émet une fluorescence lorsqu'il est contenu dans un ADN double brin. Figure adaptée de la documentation du fabricant. 92

Figure 30. Organigramme représentant le processus de sélection des études de la recherche initiale jusqu'à l'inclusion. 104

Figure 31. Récapitulatif des groupes expérimentaux inclus dans les différents clusters : (a) LOW, (b) MODERATE, et (C) HIGH. Qa : évaluation de la qualité de l'étude ; Sed : Sédentaires ; Act : Actifs ; Entr : Entrainés ; ? : inconnu ; EXCiso : exercice excentrique sur un dynamomètre isocinétique ; Plio : exercice pliométrique ; Musc : exercice de résistance ou excentrique ; Desc : marche ou course en descente ; Prol : exercice prolongé ; ES : séance d'électrostimulation ; CK : créatine kinase ; DOMS : douleurs musculaires ; Mb : myoglobine ; ROM : amplitude de mouvement ; HdS : hauteur de saut ;Tw : amplitude des réponses évoquées ; PPT : seuil de pression de la douleur ; NAV : niveau d'activation volontaire ; LDH : lactate déshydrogénase ; RTD : taux de développement du

moment de force ; Circ : circonférence du membre ; IL-6 : interleukine-6 ; T_2 :temps de relaxation transversale. Les données sont exprimées par la différence moyenne standardisée (SMD) ± l'erreur-type. La SMD affichée correspond à la diminution de force maximale volontaire la plus importante observée entre 24 et 48 h. 110

Figure 32. Cinétiques du moment de force maximale volontaire (FMV), de la hauteur de saut, de l'amplitude de mouvement (ROM), des douleurs musculaires (DOMS) actives et passives, du seuil de pression de la douleur (PPT), de la circonférence du membre, de l'amplitude de la réponse évoquée (Tw), du taux de développement du moment de force (RTD), du niveau d'activation volontaire (NAV), de l'activité de la créatine kinase (CK), de la concentration en myoglobine (Mb), de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH) et du temps de relaxation transversale (T_2). Les données sont exprimées par la différence moyenne standardisée (SMD) ± l'erreur-type. Les couleurs grises, oranges et rouges correspondent à des effets faibles (< |0.50|), modérés (|0.50| to |0.80|) et larges (> |0.80|), respectivement. *, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. 112

Figure 33. Cinétique du moment de force maximale volontaire (FMV ; a-b), de l'amplitude de la réponse évoquée (Tw ; c-d), de la hauteur de saut (e-f) et de l'amplitude de mouvement (ROM ; g-h) après l'exercice. La différence moyenne standardisée (SMD) et l'erreur-type sont représentées pour toutes les études incluses (a, c, e, g) et pour les trois clusters représentants trois niveaux de perte prolongée de FMV. *, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. 115

Figure 34. Cinétiques des douleurs musculaires (DOMS) actives (a-b) et passives (c-d), le l'activité de la créatine kinsase (e-f), et de la concentration de la myoglobine (g-h). La différence moyenne standardisée (SMD) et l'erreur-type sont représentées pour toutes les études incluses (a, c, e, g) et pour les trois clusters représentant trois niveaux de perte prolongée de FMV. *, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. 117

Figure 35. Design expérimental de l'étude 1 avec vue aérienne du parcours (boucle) de la course. La vue aérienne a été extraite de ®Google Maps. 138

Figure 36. Modifications de la hauteur du saut (a) et des douleurs musculaires du quadriceps (b) après la course d'ultra-marathon de 24 h. Les valeurs de hauteur de saut et de douleurs musculaires sont exprimées en pourcentage de la valeur initiale (PRE) et en mm (sur une échelle de 0 à 100 mm), respectivement. Les données sont exprimées par l'écart interquartile (25ème et 75ème percentiles ; rectangle gris), la médiane (barre blanche horizontale), le minimum-maximum (moustaches) et les valeurs individuelles (points). * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001. 140

Figure 37. Modifications de l'activité de la créatine kinase (a) et de la concentration de myoglobine (b). Les données sont exprimées par l'écart interquartile (25ème et 75ème percentiles ; rectangle gris), la médiane (barre blanche horizontale), le minimum-maximum (moustaches) et les valeurs individuelles (points). * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001..... 141

Figure 38. Modifications des niveaux plasmatiques de miARNs après la course d'ultra-marathon de 24 h pour l'homo sapiens (hsa)-miR-1-3p (a), hsa-miR-133a-3p (b), hsa-miR-133b (c), hsa-miR-206 (d), hsa-miR-208a-3p (e), hsa-miR-208b-3p (f), hsa-miR-378a-3p (g) et hsa-miR-499a- 5p (h). Les données sont exprimées par l'écart interquartile (25ème et 75ème percentiles ; rectangle gris), la médiane (barre blanche horizontale), le minimum-maximum (moustaches) et les valeurs individuelles (points). UA : unité arbitraire (abondance relative). * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001. 142

Figure 39. Corrélations entre la réduction de la hauteur du saut mesurée 24 h après la fin de la course et les niveaux plasmatiques d'homo sapiens (hsa)-miR-1-3p (a), hsa-miR-133a-3p (b), hsa-miR-133b (c), hsa-miR-206 (d), hsa- miR-208a-3p (e), hsa-miR-208b-3p (f), hsa-miR-378a-3p (g), hsa-miR-499a-5p (h), créatine kinase (i), et myoglobine (j). UA : unité arbitraire (abondance relative). Les valeurs du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) et de p sont affichées pour chaque corrélation..... 144

Figure 40. Cinétique du moment de force maximale volontaire (FMV) avant (PRE), après (POST), 24 h et 48 h après l'exercice 1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). *** : différent de PRE à p < 0,001 ; $$$: différent entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,001. 157

Figure 41. Cinétique de (a) home sapiens (hsa)- miR-1-3p, (b) hsa-miR-133a-3p, (c) hsa-miR-133b, (d) hsa-miR-206, (e) hsa-miR-208a-3p, (f) hsa-miR-208b-3p, (g) hsa-miR-378a-3p, (h) hsa-miR-499a-5p avant (PRE), après (POST) et 2 h, 6 h, 24 h et 48 h après l'exercice (1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). UA : unité arbitraire (abondance relative). *, **, *** : significativement différent de la valeur PRE à p < 0,05, p < 0,01 et p

< 0,001, respectivement. $: Significativement différent entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,05. 159

Figure 42. Cinétique (a) de l'activité de la créatine kinase et (b) de la concentration de la myoglobine avant (PRE), après (POST) et 2 h, 6 h, 24 h et 48 h après l'exercice (1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). *, **, *** : significativement différent de la valeur PRE à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. $$ et $$$: Significativement différent entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. 160

Figure 43. Corrélations entre la plus grande réduction du moment de force maximale volontaire (FMV) mesurée au-delà de 24 h après les exercices et l'activité de la créatine kinase mesurée immédiatement après (POST ; a), 2 h (c), et 6 h (e) après l'exercice, et la concentration de la myoglobine mesurée immédiatement après (POST ; a), 2 h (c), et 6 h (e) après l'exercice. Les valeurs de p et du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) sont affichées pour chaque corrélation. 162

Figure 44. Corrélations entre la plus grande réduction du moment de force maximale volontaire (FMV) mesurée au-delà de 24 h après les exercices et les niveaux plasmatiques des miARNs mesurés 6 h après l'exercice. Les corrélations sont représentées pour homo sapiens (hsa)-miR-1-3p, (b) hsa-miR-133a-3p, (c) hsa-miR-133b, et (d) hsa-miR-206. UA : unité arbitraire (abondance relative). Les valeurs de p et du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) sont affichées pour chaque corrélation. 163

Figure 45. Cinétique du moment de force maximale volontaire (FMV) (a), du taux de développement du moment de force (RTD) (b), de l'amplitude de la secousse musculaire (Twitch) (c), de l'amplitude du doublet à 10 Hz (Db10) (d) et à 100 Hz (Db100) (e) du rapport entre le doublet à 10 Hz et le doublet à 100 Hz (Db10/Db100) après l'exercice 1 (rouge) et 2 (bleu). *, ** et *** correspondent à une différence significative par rapport à la valeur PRE à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. $, $$ et $$$ correspondent à une différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. 180

Figure 46. Cinétique de l'activité de la créatine kinase (a), des douleurs musculaires (b), de l'amplitude de mouvement (ROM) (c), de la circonférence de la cuisse (d) et du seuil de pression de la douleur (PPT) pour le rectus femoris (RF) (e) et le vastus lateralis (VL) (f) pour les exercices 1 (rouge) et 2 (bleu). *, ** et *** correspondent à une différence significative par rapport à la valeur PRE à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001,

respectivement. $, $$ et $$$ correspondent à une différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. 182

Figure 47. Cinétique de l'épaisseur musculaire du rectus femoris (RF) (a) et du vastus lateralis (VL) (b) et de l'angle de pennation du RF (c) et du VL (c) après l'exercice 1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). *, ** et *** correspondent à une différence significative par rapport à la valeur PRE à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. $$: différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,01. 183

Figure 48. Cinétique du module de cisaillement du rectus femoris (RF) (A) et du vastus lateralis (VL) (B) pour les exercices 1 (rouge) et 2 (bleu), et les valeurs initiales (PRE) absolues du module de cisaillement des muscles RF et VL (pente) pour l'exercice 1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). *, ** et *** correspondent à une différence significative par rapport à la valeur PRE à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. $$$: différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,001, £££ : différence significative par rapport à la valeur du RF à p < 0,001. 184

Figure 49. (a) Corrélation entre les modifications (Δ) du module élastique de cisaillement (μ) du muscle rectus femoris (RF) mesuré 14 jours après le premier exercice (i.e., modifications entre les valeurs PRE de l'exercice 1 et de l'exercice 2) et l'indice de protection (IP) pour l'amplitude des altérations (orange) et pour le taux de récupération à 7 jours (vert) du μ du RF. (b) Corrélation entre les Δ du μ du muscle vastus lateralis (VL) mesurés 14 jours après le premier exercice et l'IP pour l'amplitude des altérations (orange) et pour le taux de récupération (vert) du μ du VL. (c) Corrélation entre les Δ du μ du RF mesurés 14 jours après le premier exercice et l'IP pour l'amplitude des altérations (orange) et pour le taux de récupération à 7 jours (vert) de l'amplitude du doublet à 10 Hz (Db10). (d) Corrélation entre les Δ du μ du RF mesurés 14 jours après le premier exercice et l'IP pour l'amplitude des altérations (orange) et pour le taux récupération à 7 jours (vert) du taux de développement du moment de force (RTD). 186

Figure 50. Cinétique (a) du moment de force maximal volontaire (FMV), et (b) du niveau d'activation volontaire (NAV) avant (PRE), immédiatement après (POST), et 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h après l'exercice à 40° (courte), 90° (neutre), 120° (grande) de flexion de genou (0° = extension complète). *, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement. 200

Figure 51. Cinétique de l'angle optimal de production de force maximale volontaire avant (PRE), immédiatement après (POST), et 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h après l'exercice (0° = extension complète). 201

Figure 52. Cinétique (a) de la secousse musculaire potentialisée (Tw_P), (b) de la potentialisation (Tw_P/Tw), (c) du doublet à 10 Hz (db10), (d) du doublet à 100 Hz (db100), (e) du rapport entre le doublet à 10 Hz et le doublet à 100 Hz (Db10/Db100), et (f) du taux de développement du moment de force (RTD) avant (PRE), immédiatement après (POST), et 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h après l'exercice (0° = extension complète). *, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. £, ££, £££ : différence significative entre 40° et 90° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. $, $$, $$$: différence significative entre 40° et 120° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. #, ##, ### : différence significative entre 90° et 120° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. 203

Figure 53. Cinétique du module de cisaillement (μ) du rectus femoris (VL) (a) et du vastus lateralis (VL) (b) et de la raideur aponévrotique du RF (c) et du VL (d) avant (PRE), immédiatement après (POST), et 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h après l'exercice (0° = extension complète). *, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. £, ££, £££ : différence significative entre 40° et 90° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. $, $$, $$$: différence significative entre 40° et 120° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. #, ##, ### : différence significative entre 90° et 120° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. 205

Figure 54. Activation des muscles (A) rectus fermoris (RF) et (B) vastus lateralis (VL) au cours des exercices 1 (orange) et 2 (bleu). Les valeurs sont exprimées par la valeur RMS (root mean square) calculée sur le début de la phase d'appui (0-35 % du pas total), en fonction du temps d'exercice (100% = arrêt de l'exercice). Les zones de couleur représentent les écart-types et la zone grise correspond au croisement des deux zones de couleur. *, **, et *** : différent de PRE à $p < 0,05$, $p < 0.01$, et $p < 0,001$, respectivement ; $$$: différent entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à $p < 0,001$. 226

Figure 55. Représentation de l'activation des muscles rectus femoris (RF) et vastus lateralis (VL) au cours d'un pas (0% = début de la phase d'appuis) en fonction du

temps (100% = arrêt de l'exercice). L'activation est représentée pour l'exercice 1 (A : RF ; B : VL) et l'exercice 2 (C : RF ; D : VL). 227

Liste des tableaux

Tableau 1. Organisation générale des études expérimentales. FMV : force maximale volontaire ; T_2 : temps de relaxation transversale ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; CK : créatine kinase ; Mb : myoglobine ; LDH : Lactate déshydrogénase ; MC : masse corporelle..... 78

Tableau 2. Caractéristiques des clusters LOW, MODERATE (MOD) et HIGH. La distribution du statut d'entrainement (a), de la modalité de l'exercice (b) et du type d'exercice (c) est affichée pour chaque cluster. Les données sont exprimées en pourcentage de la totalité des participants (%). EXCiso : exercice excentrique sur un dynamomètre isocinétique ; Plio : exercice pliométrique ; Musc : exercice de résistance ou excentriques ; Desc : marche ou course en descente ; Prol : exercice prolongé ; ES : séance d'électrostimulation ; Les valeurs attendues correspondent à proportion de chaque caractéristique dans l'ensemble de l'échantillon (3 clusters réunis). Toute association significative entre les clusters et les caractéristiques sont affichées (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$)..... 118

Tableau 3. Coefficients de détermination (r^2) et valeur p des méta-régressions entre la réduction prolongée du moment de force maximale volontaire et les modifications de la hauteur de saut (HdS), de l'amplitude de mouvement (ROM), de la douleur musculaire (DOMS) active et passive, du seuil de pression de la douleur (PPT), de la circonférence du membre, de l'amplitude de la réponse évoquée (Tw), du taux de développement du moment de force (RTD), du niveau d'activation volontaire (NAV), de la créatine kinase (CK), de la myoglobine (Mb), de l'interleukine-6 (IL-6) et du temps de relaxation transversale (T_2) Les résultats avec une valeur de $p < 0,05$ étaient considérés comme significatifs et sont affichés en gras..... 119

Tableau 4. Valeurs absolues avant (PRE) l'exercice 1 et l'exercice 2. FMV : force maximale volontaire ; hsa : homo sapiens ; UA : unité arbitraire (abondance relative)..... 157

Tableau 5. (a) Corrélations entre l'amplitude maximale de modifications (Valeur Pic) des niveaux plasmatiques des miARNs après l'exercice 1 et l'indice de protection du moment de force maximale volontaire (FMV). (b) Corrélations entre la différence observée entre PRE 1 et PRE 2 (PRE 1 vs PRE 2) et l'indice de protection du moment de FMV. UA : unité arbitraire (abondance relative). Les valeurs de p et du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) sont affichées pour chaque corrélation. 161

Tableau 6. Corrélations entre la plus grande réduction du moment de force maximale volontaire (FMV) mesurée au-delà de 24 h après les exercices et les niveaux circulants d'homo sapiens (hsa)- miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378-3p, hsa-miR-499a-5p, de l'activité de la créatine kinase et de la concentration de la myoglobine. Les valeurs de p et du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) sont affichées pour chaque corrélation. Les résultats avec une valeur de $p < 0,05$ étaient considérés comme significatifs et sont affichés en gras. 163

Tableau 7. Valeurs initiales (PRE) absolues de l'exercice 1 et de l'exercice 2 pour tous les paramètres. FMV : force maximale volontaire ; NAV : niveau d'activation volontaire ; RTD : taux de développement du moment de force ; Tw_p : amplitude de la secousse musculaire potentialisée ; Db10 : amplitude du doublet à 10 Hz ; Db100 : amplitude du doublet à 100 Hz ; Db10/Db100 : rapport entre le doublet à 10 Hz et le doublet à 100 Hz ; PPT : seuil de pression de la douleur ; RF : rectus femoris ; VL : vastus lateralis ; ROM : amplitude de mouvement ; μ : module élastique de cisaillement. Les résultats avec une valeur de $p < 0,05$ étaient considérés comme significatifs et sont affichés en gras. 178

Tableau 8. Valeurs initiales (PRE) absolues des propriétés neuromusculaires à 40° (courte), 90° (neutre), et 120° (grande) de flexion de genou (0° = extension complète). FMV : force maximale volontaire ; Tw_p : secousse musculaire potentialisée ; Db10 : doublet à 10 Hz ; Db100 : doublet à 100 Hz ; Db10/Db100 : rapport entre le doublet à 10 Hz et le doublet à 100 Hz ; RTD : taux de développement de force ; μ : module de cisaillement ; RF : rectus femoris ; VL : vastus lateralis ; apo. : aponévrotique. *, **, *** ; significativement différent de 40° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. $, $$, $$$: significativement différent de 90° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. 200

Introduction générale

La pratique régulière d'une activité physique et sportive (APS) est une priorité de santé publique puisqu'elle contribue à prévenir de nombreuses maladies (*e.g.*, maladies cardiovasculaires, diabète de type 2, cancers, etc.) (Warburton et coll., 2006). Cependant, les APS peuvent induire de la fatigue et/ou des douleurs (Gandevia, 2001), et être responsable d'accidents (*e.g.*, traumatiques, cardio-vasculaires) (Gray & Finch, 2015; Ziaeian & Fonarow, 2016). La survenue de ces « effets indésirables » est dépendante de nombreux facteurs comme l'âge, le sexe, et les modalités de la pratique physique/sportive.

Par exemple, la pratique d'un exercice inhabituel, prolongé et/ou intense peut induire des dommages musculaires aussi bien chez les sportifs occasionnels que chez des individus pratiquant régulièrement de l'activité physique comme les sportifs de haut niveau ou les militaires, mais le risque de survenue est bien plus important pour les sédentaires que pour les sujets entrainés pour un exercice similaire (Vincent & Vincent, 1997). Pour autant, les militaires et les sportifs de haut niveau peuvent souffrir de dommages musculaires du fait de leurs charges d'entrainement importantes ou leurs pratiques spécifiques. Durant sa carrière, le militaire est confronté au port de charges lors de situations opérationnelles (Beekley et coll., 2007). Or, il est connu que le port d'une charge associé à un exercice prolongé (*e.g.* marche) peut induire de la fatigue et des dommages musculaires (Blacker et coll., 2013; Blacker et coll., 2010). Le sportif de haut niveau est amené, en compétition, à réaliser des exercices pouvant être intenses et/ou prolongés selon sa pratique. Par exemple, pendant un match de football, un joueur est notamment amené à répéter des sprints, des sauts et des changements de directions à haute intensité, pouvant conduire à des dommages musculaires.

Les dommages musculaires peuvent induire différents risques selon la population concernée et les modalités de pratique associées. Une étude de cas rapporte par exemple qu'un homme de 37 ans physiquement actif mais n'ayant pas l'habitude d'effectuer des exercices intenses a été hospitalisé après la réalisation d'un grand nombre de pompes (*i.e.*, 100 répétitions) et de différents exercices avec charge additionnelle (*i.e.*, 150 répétitions) (Honda et coll., 2017). Des cas similaires ont également été observés au sein de l'armée française, avec l'hospitalisation de plusieurs militaires en début de carrière après la réalisation de plusieurs répétitions de squats, de pompes et d'autres exercices de musculation (rapports CESPA). Ces hospitalisations s'expliquent par une accumulation massive de protéines sarcoplasmiques dans la circulation sanguine, notamment la myoglobine, pouvant induire une insuffisance rénale aiguë (Furman, 2015). Cette dysfonction rénale peut dans certains cas induire une

hyperkaliémie et engendrer des troubles du rythme cardiaque et présente donc un risque vital pour le patient. Mis à part quelques pratiquants d'ultra-endurance (Rojas-Valverde et coll., 2020), ces complications concernent généralement les individus ayant une pratique occasionnelle de l'APS. Cependant les dommages musculaires se traduisent également par une atteinte de la fonction neuromusculaire qui peut durer des jours. Cette atteinte peut donc compromettre la performance opérationnelle des militaires étant amenés à répéter les efforts pendant plusieurs jours consécutifs, mettant en péril la réussite de leur mission. De la même manière, il est courant de constater que des sportifs de haut niveau doivent enchainer plusieurs matchs/épreuves ou entrainements dans une courte période sans récupération suffisante, limitant ainsi leurs performances. Enfin, les dommages musculaires peuvent augmenter les risques de blessures lorsqu'un exercice est réalisé alors que la récupération n'est pas complète (Cheung et coll., 2003). Par exemple, Dupont et coll. (2010) ont montré que le taux de blessure des footballeurs professionnels était plus élevé pour ceux jouant deux matchs par semaine par rapport à ceux qui en jouaient un seul.

Afin de limiter les risques de blessures et de garantir la performance et/ou la santé des sportifs et des militaires, il semble nécessaire de disposer de marqueurs permettant de prendre une décision quant aux modalités de prise en charge, de récupération et de gestion des charges d'entrainement après un exercice ayant induit des dommages musculaires. La plupart des études utilisent plusieurs marqueurs pour représenter l'amplitude des dommages musculaires (Warren et coll., 1999). En effet, les différents symptômes associés aux dommages musculaires sont utilisés comme marqueurs aussi bien dans le contexte clinique qu'en recherche. Parmi ces symptômes, nous pouvons notamment citer la diminution de la capacité de production de force, l'augmentation de la raideur musculaire, la diminution de l'amplitude de mouvement, le développement de courbatures, le gonflement des muscles lésés ainsi que de l'élévation du niveau de certaines protéines musculaires dans le sang (*e.g.*, activité de la créatine kinase). La multiplicité de mesures peut notamment s'expliquer par la complexité de l'étiologie des dommages musculaires. Chaque marqueur peut représenter un ou plusieurs processus physiologiques, se traduisant par des cinétiques d'apparition et de récupération variées (Clarkson et coll., 1992). De plus, une variabilité interindividuelle importante et mal comprise (Damas et coll., 2016) peut rendre difficile la prise de décision après un exercice ayant induit des dommages musculaires.

Actuellement, la diminution de la capacité de production de force ou de puissance musculaire est considérée comme le marqueur le plus valide car elle peut être mesurée de manière reproductible et est représentative du groupe musculaire testé (Warren et coll., 1999). Cependant, les diminutions de force/puissance observées dans les premières heures suivant l'exercice ne représentent pas uniquement les altérations dues aux dommages musculaires mais sont le reflet d'une combinaison de fatigue métabolique et de dommages musculaires (Paulsen et coll., 2012; Warren et coll., 1999). Il est donc généralement admis que la diminution de force/puissance musculaire observée à partir et au-delà de 24 h après l'arrêt de l'exercice permet d'évaluer l'effet des dommages musculaires uniquement (Paulsen et coll., 2012; Warren et coll., 1999). Cependant, le délai de 24 h semble être trop long pour adapter correctement les stratégies de récupération et les charges de travail lorsque les volumes d'entrainement sont élevés et/ou les efforts intenses/prolongés sont rapprochés (*i.e.*, militaire ou sportif de haut niveau). Des marqueurs permettant (1) d'évaluer rapidement l'état des muscles avec une bonne sensibilité/spécificité et (2) de prédire la perte de force/puissance à 24 h semblent donc nécessaires afin d'adapter au mieux les stratégies de récupération et de gestion des charges d'entrainement. Les marqueurs actuels ne semblent pas correspondre à ces critères car ils souffrent d'une grande variabilité et sont peu associés à la performance (*i.e.*, force/puissance) (Damas et coll., 2016). Une meilleure compréhension des réponses des marqueurs aux dommages musculaires et la détermination de nouveaux marqueurs pourraient contribuer à une meilleure prise en charge des dommages musculaires.

Ce travail de thèse s'attachera (1) à améliorer la caractérisation des cinétiques d'apparition et de récupération des marqueurs de dommages musculaires les plus utilisés dans la littérature et (2) à évaluer l'intérêt de « nouveaux » marqueurs pour caractériser l'état du muscle. Un travail de méta-analyse regroupant un grand nombre d'études permettra de caractériser les cinétiques des marqueurs les plus utilisés en lien avec l'altération prolongée (> 24 h) de la fonction musculaire. Une approche de laboratoire utilisant un modèle de marche en descente avec port de charge et un modèle de terrain d'ultra-endurance permettront d'évaluer l'intérêt de « nouveaux » marqueurs prometteurs : (1) la raideur musculaire mesurée par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement et (2) les microARNs musculaires circulants.

Partie 1. Revue de la littérature

I. Mode de contraction musculaire « excentrique »

La force musculaire est produite via l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine des sarcomères (*i.e.*, unité fonctionnelle des fibres musculaires ; **Figure 1**) au cours de différents modes de contraction musculaire. Lorsque les forces externe et interne (*i.e.*, forces musculaires) sont équivalentes, la longueur de l'unité muscle-tendon n'est pas modifiée, aucun mouvement n'est créé et la contraction est dite « isométrique ». Lorsque la force externe est inférieure à la force interne, la longueur de l'unité muscle-tendon diminue, un mouvement est ainsi créé et la contraction est dite « concentrique ». Enfin, lorsque la force externe est supérieure à la force interne, la longueur de l'unité muscle-tendon augmente et la contraction est dite « excentrique ».

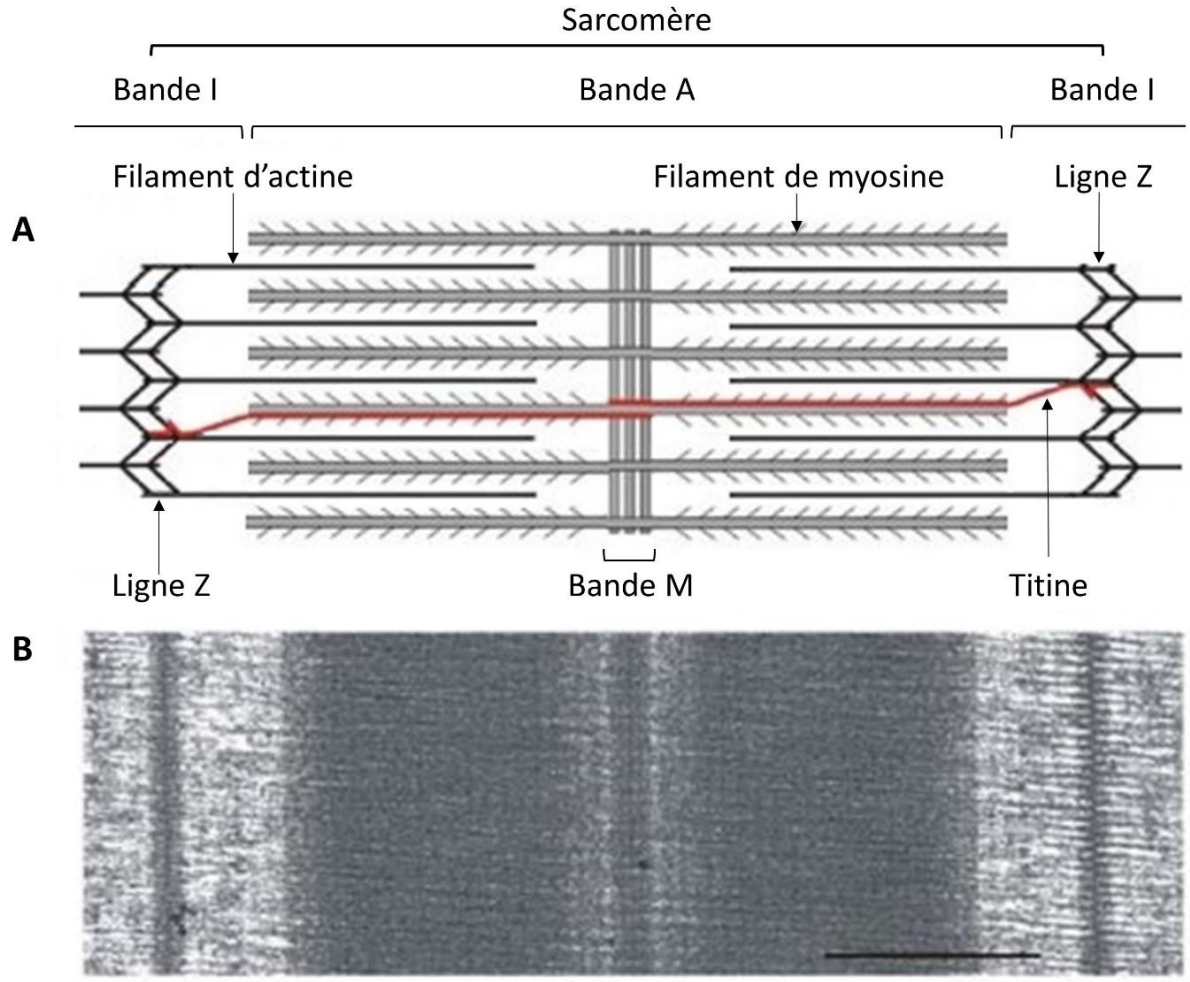


Figure 1. Représentation schématique des principales structures d'un sarcomère (A) et coupe longitudinale d'un muscle montrant les détails d'un sarcomère (B). La barre d'échelle correspond à 500 nm. *Figure adaptée de Luther (2009).*

Le régime de contraction excentrique permet de produire plus de force que les autres régimes de contraction et se caractérise par un meilleur rendement énergétique lors d'exercices sous-maximaux (Guilhem et coll., 2010) (**Figure 2**). Ce meilleur rendement s'explique notamment par une augmentation de la force produite par chaque pont actine-myosine (Sugi & Tsuchiya, 1981). En effet, les contractions excentriques sont capables d'absorber l'énergie mécanique appliquée par la force externe via l'étirement des composantes élastiques du système musculo-tendineux, et produisent par conséquent un travail négatif (Katz, 1939). D'un point de vue fonctionnel, l'énergie absorbée peut aider à freiner le mouvement lors d'exercices nécessitant de lutter contre l'effet de la gravité (*e.g.*, marche en descente) (LaStayo et coll., 2003). L'énergie absorbée peut également être restituée au cours de cycles étirement-raccourcissement (*e.g.* locomotion), améliorant le rendement de l'exercice (LaStayo et coll., 2003). Les contractions excentriques se caractérisent donc par une moindre consommation d'oxygène pour un niveau de force similaire produit de manière concentrique (Abbott et coll., 1952). La moindre utilisation de l'ATP pour un niveau de force similaire peut s'expliquer par la force passive produite par les structures élastiques du muscle (*e.g.* tendon, aponévroses, titine) et par le détachement forcé des ponts actine-myosine lors de l'étirement de l'unité muscle-tendon (Goldspink, 1977). Herzog et coll. (2016) ont également suggéré que la titine, une protéine élastique assurant la liaison entre la bande Z du sarcomère et la ligne M, pouvait avoir un rôle actif dans la production de force accrue des contractions excentriques. En effet, au cours de l'étirement actif, la titine pourrait se lier à des ions calcium afin de s'attacher au filament d'actine, augmentant ainsi sa raideur et permettant d'accroître la force produite au cours des contractions excentriques (Herzog et coll., 2016).

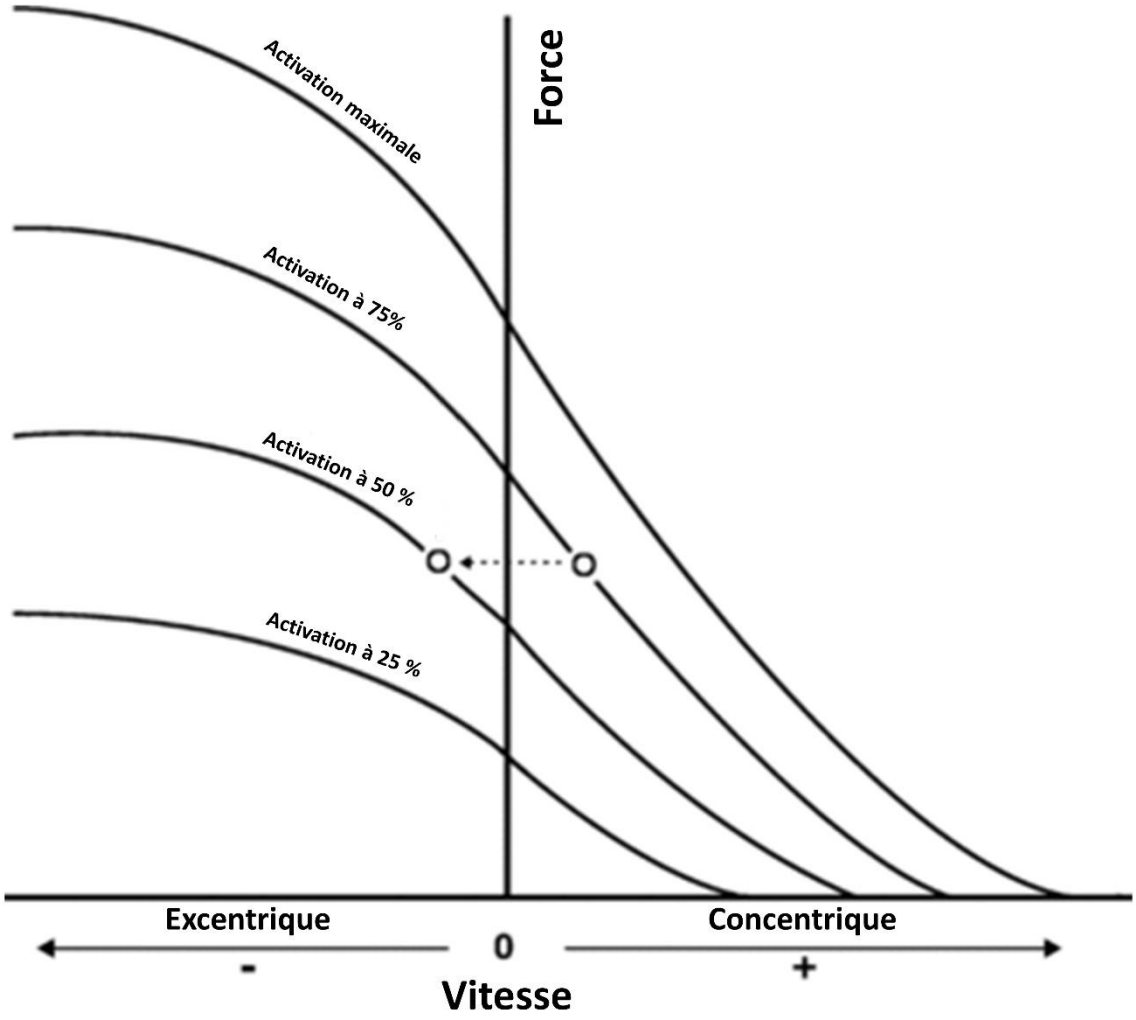


Figure 2. Relation force-vitesse pour différents niveaux d'activation*. La courbe d'activation maximale (supérieure) montre que la force maximale volontaire est supérieure pour les contractions excentriques par rapport aux autres types de contraction. Les deux cercles blancs montrent que les contractions excentriques nécessitent une moindre activation par rapport aux contractions concentriques pour produire une force donnée (à vitesse équivalente). Figure adaptée de Reeves et coll. (2009).*

Si les contractions excentriques sont caractérisées par des spécificités au niveau mécanique, elles se distinguent également par des stratégies d'activation différentes par rapport aux autres modes de contraction (Enoka, 1996). Au cours de contractions maximales volontaires, le niveau d'activation peut être réduit lorsque la force est produite de manière excentrique par rapport aux contractions concentriques ou isométriques (Babault et coll., 2001; Beltman et coll., 2004), suggérant que le système nerveux central adopte des stratégies d'activation spécifiques au cours des contractions excentriques. Cette différence d'activation est également observée par électromyographie (EMG) puisque plusieurs études ont montré une activité musculaire inférieure lors de contractions excentriques en comparaison de contraction concentriques (Aagaard et coll., 2000; Westing et coll., 1991). Cependant, la différence dans la stratégie d'activation entre les régimes de contraction peut disparaitre lorsqu'une pré-activation

est réalisée (Linnamo et coll., 2003). Pour autant, plusieurs études (Duclay et coll., 2011; Duclay et coll., 2014; Sekiguchi et coll., 2001) ont montré une moindre taille des potentiels évoqués moteurs (MEP, pour « *motor-evoked potentials* ») en réponse à des stimulations magnétiques transcrâniennes lors de contractions excentriques comparées à des contractions concentriques, suggérant une modulation spécifique de l'excitabilité cortico-spinale en excentrique. L'utilisation du MEP cervico-médullaire (CMEP, pour « *cervicomedullary MEP* »), obtenu à partir d'une stimulation électrique de la moelle épinière au niveau cervical, a permis de mettre en évidence des mécanismes spinaux d'inhibition en condition excentrique (Gruber et coll., 2009). Le rapport entre le MEP et le CMEP (MEP/CMEP ratio), considéré comme un indicateur de l'excitabilité corticale (Taylor & Gandevia, 2004), a permis de suggérer une plus grande excitabilité corticale lors de contractions excentriques (Gruber et coll., 2009). Ces résultats corroborent ceux de la période de silence (SP, pour « *silent period* ») suivant le MEP puisqu'il a été rapporté que la SP était inférieure lors de contractions excentriques comparées à des contractions isométriques ou concentriques (Duclay et coll., 2011; Duclay et coll., 2014), ce qui suggère une inhibition intra-corticale moins importante en excentrique. Le moindre niveau d'activation observé lors des contractions excentriques serait donc principalement expliqué par des mécanismes inhibiteurs intervenant au niveau spinal. En effet, l'amplitude du réflexe H a été rapportée comme étant inférieure lors de contractions excentriques en comparaison de contractions concentriques pour des niveaux de force ou d'activation similaire (Duclay & Martin, 2005; Duclay et coll., 2014; Nordlund et coll., 2002). Ce réflexe, apparaissant en réponse à une stimulation électrique sous-maximale du nerf moteur, reflète l'activation des motoneurones α via les afférences Ia provenant des fuseaux neuromusculaires, et est généralement utilisé comme un indicateur de l'excitabilité spinale.

Si les exercices excentriques présentent des avantages fonctionnels, ce type de contraction est souvent à l'origine de dommages musculaires, appelés « *exercise-induced muscle damage* » dans la littérature internationale (Paulsen et coll., 2012). Ces dommages musculaires apparaissent du fait des hauts niveaux de force produits par un nombre restreint d'unités motrices, et de l'étirement du muscle important survenant au cours de contractions excentriques (Katz, 1939; Lieber & Fridén, 1999). Pour autant, les dommages musculaires peuvent aussi survenir après la réalisation d'exercices inhabituels, prolongés et/ou intenses (Paulsen et coll., 2012). Morgan (1990) a proposé une théorie (« *popping sarcomere hypothesis* ») permettant d'expliquer pourquoi les dommages musculaires peuvent survenir au cours de l'étirement actif. Cette théorie suggère que la variation de longueur des sarcomères au

cours l'étirement n'est pas uniforme au sein d'une myofibrille dans la phase descendante de la relation force-longueur (*i.e.*, pour des longueurs supérieures à la longueur optimale ; **Figure 3**). Cette non-uniformité permettrait aux sarcomères les plus courts de produire plus de force grâce à un plus grand recouvrement au niveau des filaments d'actine-myosine (*i.e.*, un plus grand nombre de ponts d'union). De plus, les sarcomères sur-étirés pourraient produire une force passive par l'augmentation de la raideur des structures élastiques du muscle (*e.g.*, titine). Dans cette situation, la force produite par sarcomère est insuffisante par rapport à la force externe, ce qui peut conduire à des dommages structurels. Ces dommages musculaires sont diffus et étendus à l'échelle microscopique, et se caractérisent par une perturbation de l'ultrastructure des fibres musculaires et/ou de la matrice extracellulaire (Paulsen et coll., 2012). Ces microlésions sont associées au développement de différents symptômes comme la diminution de la capacité de production de force, l'apparition de courbatures, l'augmentation de la raideur musculaire, le gonflement du muscle (i,e., œdème) et l'augmentation des protéines musculaires dans la circulation sanguine (Warren et coll., 1999).

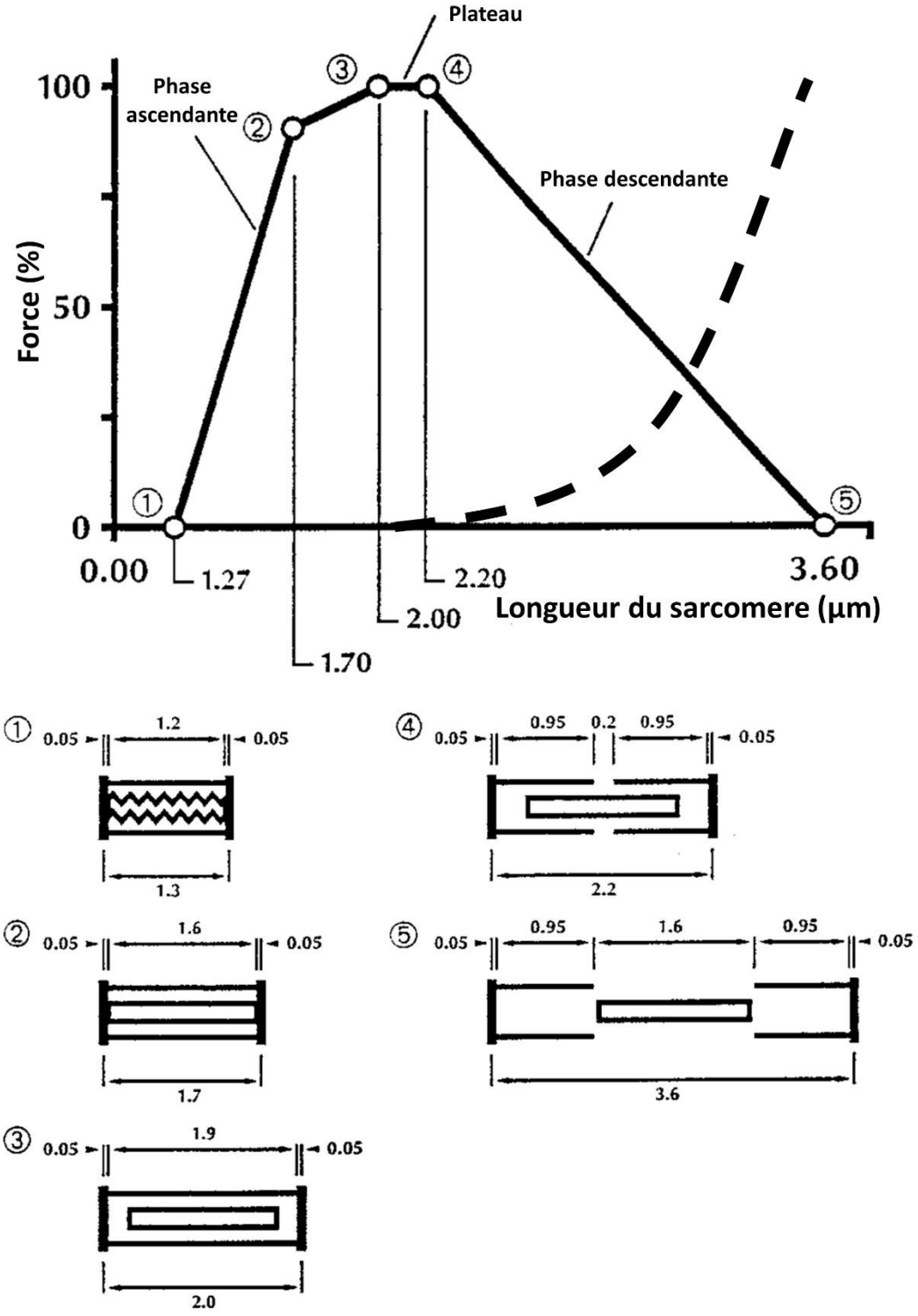


Figure 3. Relation force-longueur d'un sarcomère *(en haut) et représentation du sarcomère dans différentes configurations de longueur (en bas). Les configurations sont numérotées de 1 à 5 sur la relation-force. La ligne hachurée représente la force passive. Figure adaptée de Rassier et coll. (1999)*

Synthèse :

Lors des contractions excentriques, les structures élastiques du système musculo-tendineux sont capables d'absorber l'énergie mécanique générée par la force externe, permettant ainsi une augmentation de la force produite par pont actine-myosine. Cette augmentation se traduit par une capacité de production de force plus importante et une moindre demande énergétique lors d'exercices excentriques en comparaison d'exercices isométriques ou concentriques de même intensité. Par ailleurs, les stratégies d'activation nerveuses semblent différentes pour les contractions excentriques par rapport aux autres modes de contraction. Si l'excitabilité corticale semble être augmentée pour les contractions excentriques, des mécanismes inhibiteurs au niveau spinal semblent substantiellement impacter le niveau d'activation lors de ce type de contractions. Enfin, si les contractions excentriques présentent certains avantages fonctionnels, elles sont susceptibles d'induire des dommages musculaires.

II. Dommages musculaires et altérations de la fonction neuromusculaire

A. Altérations structurelles

L'analyse de biopsies du muscle au microscope électronique a permis d'observer des désorganisations myofibrillaires importantes, en raison notamment d'altérations des lignes Z et des bandes A (Féasson et coll., 2002; Friden et coll., 1983; Fridén et coll., 1981; Newham et coll., 1983) (**Figure 4**).

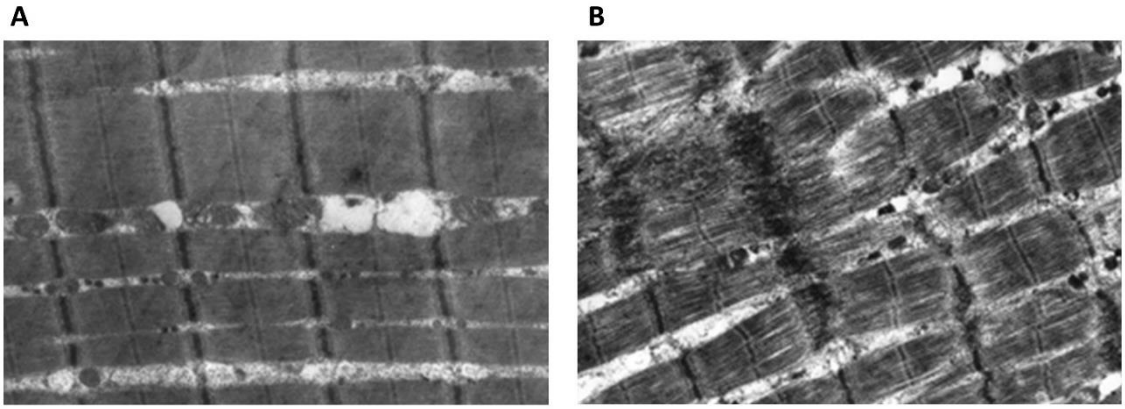


Figure 4. Coupe longitudinale du muscle vastus lateralis avant (A) et un jour après (B) un exercice de course en descente. *L'image A montre des sarcomères sains, tandis que l'image B montre des sarcomères lésés avec une perturbation de l'alignement des stries Z (dommages musculaires). Images issues de Féasson et coll. (2002).*

Les dommages musculaires peuvent intervenir au niveau du sarcomère (*e.g.*, actine, myosine, titine) (Friden et coll., 1983; Newham et coll., 1983), du cytosquelette (*e.g.* desmine,

dystrophine) (Komulainen et coll., 1998; Lieber et coll., 1996) ou des éléments membranaires (*e.g.*, sarcolemme, réticulum sarcoplasmique, tubule T) (McNeil & Khakee, 1992; Takekura et coll., 2001). Bien que représentant directement l'état du muscle, l'analyse de biopsie est invasive et ne représente pas l'état global du muscle (Paulsen et coll., 2012; Warren et coll., 1999). Par conséquent, la mesure de marqueurs indirects (*i.e.*, non ou faiblement invasifs) permettant d'estimer l'amplitude des dommages musculaires est généralement utilisée dans les milieux cliniques/sportifs pour adapter les stratégies de récupération et optimiser les programmes d'entrainement. Parmi ces marqueurs, nous pouvons notamment citer la diminution de la capacité de production de force, l'augmentation de la raideur musculaire, la diminution de l'amplitude de mouvement, le développement de courbatures, le gonflement des muscles lésés ainsi que de l'élévation du niveau de certaines protéines musculaires dans le sang (*e.g.*, activité de la créatine kinase) (Warren et coll., 1999).

Les mécanismes associés à la survenue des dommages musculaires ont été étudiés depuis des décennies mais ne sont pas encore totalement compris. Cependant, les dommages musculaires sont généralement définis par deux phases (Morgan & Allen, 1999) : la phase initiale due au stress mécanique, et la phase secondaire liée à des facteurs aggravants comme la perte de l'homéostasie du calcium ou l'inflammation.

B. Les facteurs aggravants

1. L'accumulation de calcium intracellulaire

Suite à des dommages initiaux, une augmentation de la concentration calcique dans la cellule musculaire est généralement responsable de l'aggravation des dommages musculaires (Armstrong, 1990). En effet, les ions calcium (Ca^{2+}), issus notamment du réticulum sarcoplasmique peuvent être libérés dans le cytosol des myocytes lors de la rupture des éléments membranaires. L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} pourrait activer des familles de protéines possédant une activité de protéolyse comme les calpaïnes ou des phospholipases (*e.g.*, phospholipase A_2) (Gissel, 2005; Lieber et coll., 1996; Raastad et coll., 2010), détériorant ainsi les éléments structurels et membranaires de la fibre musculaire. Le retour à une homéostasie calcique au niveau intracellulaire peut prendre plusieurs jours, ce qui peut donc aggraver les dommages musculaires et conduire à la nécrose des myocytes durant cette période (Paulsen et coll., 2012).

2. Réponse inflammatoire et régénération musculaire

Un phénomène inflammatoire est initié en réponse aux dommages musculaires. Le muscle lésé sécrète des cytokines pro-inflammatoires (*e.g.*, interleukine 1β, *tumor necrosis factor* α) initiant la dégradation du tissu musculaire endommagé (Peake et coll., 2005). Cette libération permet de stimuler l'apparition de molécules d'adhésion sur l'endothélium au niveau des tissus lésés et de libérer des chimiokines et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Paulsen et coll., 2012). Ces médiateurs chimiques permettent d'attirer les neutrophiles puis les monocytes vers les cellules endommagées afin d'y exercer leurs activités phagocytaires. D'autres médiateurs de l'inflammation comme l'histamine et des prostaglandines sont également libérés. Ces molécules induisent une vasodilatation et permettent d'augmenter la perméabilité des capillaires, favorisant l'arrivée des cellules phagocytaires vers le muscle lésé. Ces dernières se différencient en macrophages pro-inflammatoires qui permettent de phagocyter les fibres musculaires endommagées et de favoriser la prolifération des cellules satellites. Enfin, les cellules satellites, des cellules quiescentes localisées au niveau de la lame basale, s'activent, prolifèrent, et migrent jusqu'aux sites lésés afin de se différencier et de fusionner avec les fibres musculaires endommagées. Comme la phagocytose engendrée par les macrophages et les monocytes au niveau du site inflammatoire n'est pas parfaitement sélective, certaines cellules musculaires saines peuvent être détruites. La réaction inflammatoire peut donc provoquer des dommages supplémentaires.

C. Altérations de la fonction neuromusculaire

L'altération de la fonction neuromusculaire peut avoir différentes origines que l'on classifie généralement en origine centrale (ou nerveuse) et périphérique (ou musculaire) (**Figure 5**).

1. Altérations d'origine centrale

Les altérations d'origine centrale (*i.e.*, nerveuse) de la fonction neuromusculaire font référence à celles situées en amont de la jonction neuromusculaire et correspondent à une incapacité ou difficulté à exciter les motoneurones. Des altérations d'origine nerveuse sont souvent observées après des exercices prolongés, bien que l'amplitude et l'origine de ces altérations puissent différer selon la tâche effectuée (Carroll et coll., 2017). Ces altérations sont généralement observées dans les premières heures après l'exercice mais peuvent être réduites au-delà d'un jour après des exercices induisant des dommages musculaires (*e.g.* exercice excentrique, cycle étirement-raccourcissement) (Avela et coll., 1999; Carroll et coll., 2017; Dousset et coll., 2007; Nicol et coll., 1996). En réponse à des exercices excentriques, plusieurs

études (Goodall et coll., 2017; Prasartwuth et coll., 2006; Prasartwuth et coll., 2005) ont montré une diminution du niveau d'activation volontaire mesuré par stimulation électrique du nerf périphérique et par stimulation magnétique transcrânienne (TMS pour *transcranial magnetic stimulation*). Parmi ces études, celle de Goodall et coll. (2017) a montré que les niveaux d'activation mesurés par stimulation du nerf périphérique et par TMS étaient diminués pendant plusieurs jours après des contractions excentriques des fléchisseurs du coude. Ces résultats suggèrent que les altérations centrales survenant après l'exercice excentrique peuvent être induites par des inhibitions au niveau spinal et supra-spinal. Par ailleurs, Goodall et coll. (2017) n'ont pas trouvé d'altération de la période de silence et du ratio MEP/Mmax, suggérant que la diminution du niveau d'activation n'est pas associée à une inhibition intracorticale ou à une modulation de l'excitabilité corticale. Si l'origine du déficit d'activation survenant au cours des jours suivant un exercice excentrique n'est pas totalement connue, certains auteurs ont suggéré que les afférences III et IV pourraient participer à la diminution du niveau d'activation après un exercice induisant des dommages musculaires (Prasartwuth et coll., 2005). En effet, les afférences III et IV (**Figure 5**), sensibles à la douleur et aux médiateurs de l'inflammation, pourraient induire des modulations au niveau spinal et/ou supra-spinal et diminuer le niveau d'activation (Decherchi & Dousset, 2003; Mense, 1981). Lorsqu'elles sont stimulées ces afférences inhibent l'activité des motoneurones α à différents niveaux puisqu'elles peuvent induire : (1) une inhibition directe du pool de motoneurones α (B. R. Bigland-Ritchie et coll., 1986) ; (2) une inhibition présynaptique des afférences Ia ayant une action facilitatrice sur les motoneurones α (Duchateau & Hainaut, 1993) ; (3) une inhibition du cortex moteur (Gandevia, 2001).

2. Altérations d'origine périphérique

Les altérations d'origine périphérique (*i.e.*, musculaire) de la fonction neuromusculaire font référence à celles situées en aval de la jonction neuromusculaire et correspondent à une incapacité à transmettre le signal nerveux au niveau musculaire et/ou à une incapacité du muscle à répondre au signal nerveux. Ces altérations sont généralement observées dans les premières heures après l'exercice mais différents paramètres de la fonction musculaire peuvent être réduits au-delà d'un jour après la réalisation d'exercices excentriques (Carroll et coll., 2017). Après un exercice fatigant (*i.e.*, sans dommages musculaires), les propriétés contractiles, la transmission neuromusculaire et/ou l'excitabilité du sarcolemme peuvent être diminués (*i.e.*, diminution de l'onde M) (Allen et coll., 2008). Une activation répétée/prolongée des muscles pourrait induire

une augmentation de la concentration en potassium (K^+) extracellulaire et en sodium (Na^+) intracellulaire (Clausen, 2003). L'augmentation du K^+ extracellulaire induit une hyperpolarisation de la membrane qui altère l'excitabilité du sarcolemme, réduit l'amplitude des potentiels d'action musculaires et ralentit leur propagation le long du sarcolemme et/ou des tubules T (Hicks & McComas, 1989). De plus, l'accumulation de certains métabolites après un exercice fatigant peut induire une altération du couplage excitation-contraction (E-C) (Allen et coll., 2008). En effet, il a été montré que les phosphates inorganiques issus de l'hydrolyse de l'ATP et de la phosphocréatine après des exercices fatigants pouvaient se lier au calcium dans le réticulum sarcoplasmique, limitant ainsi la libération de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique et le bon fonctionnement du couplage E-C (Allen et coll., 2002). Cependant, la perturbation du couplage E-C, estimée à partir du ratio entre les réponses à basse et haute fréquences (*e.g.*, 10 Hz/100 Hz) (Millet et coll., 2011a), n'est que transitoire lorsqu'elle est d'origine métabolique, mais peut perdurer plusieurs jours si celle-ci est causée par des dégradations structurelles.

L'altération prolongée de la composante périphérique après un exercice induisant des dommages musculaires est généralement impactée par des altérations du couplage E-C et des propriétés contractiles (Warren et coll., 2002). La désorganisation des sarcomères (**Figure 4**) induite par l'exercice peut induire une diminution de la tension au niveau des fibres musculaires lésées et une perte de force musculaire (Warren et coll., 2002). Cette altération au niveau de la contractilité du muscle est généralement évaluée par l'amplitude de la réponse mécanique à une stimulation électrique périphérique à haute fréquence (*i.e.*, 100 Hz) (Millet et coll., 2011a). Par ailleurs, comme la présence de caféine dans le tissu musculaire est connue pour augmenter la libération de Ca^{2+} dans le milieu sarcoplasmique, certains auteurs (Ingalls et coll., 1998; Warren et coll., 2001) ont pu montrer que l'ajout de caféine permettait de réduire la perte de force observée les jours après un exercice excentrique. Cela suggère une altération du relargage du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique après un exercice excentrique. Il semblerait que la réduction du largage de Ca^{2+} serait due à la rupture des structures impliquées dans ce processus comme les tubules T ou le réticulum sarcoplasmique (Takekura et coll., 2001). Il a également été suggéré que les junctophilines, des protéines assurant la communication mécanique entre le tubule T et le réticulum sarcoplasmique, puissent être impliquées dans l'altération du couplage E-C (Corona et coll., 2010). Tout dommage au niveau du sarcolemme ou des tubules T pourrait également conduire à une altération de la génération/propagation des potentiels d'actions, pouvant aussi affecter le couplage E-C (Allen, 2001). Ainsi, l'onde M, représentant la somme des potentiels d'action de toutes les unités motrices enregistrées pas les électrodes EMG après

une stimulation électrique, peut être altérée après des exercices excentriques (Piitulainen et coll., 2008). Cette altération peut être la conséquence directe des atteintes membranaires, mais aussi la conséquence de l'augmentation de la concentration extracellulaire en K^+ (Sejersted & Sjøgaard, 2000).

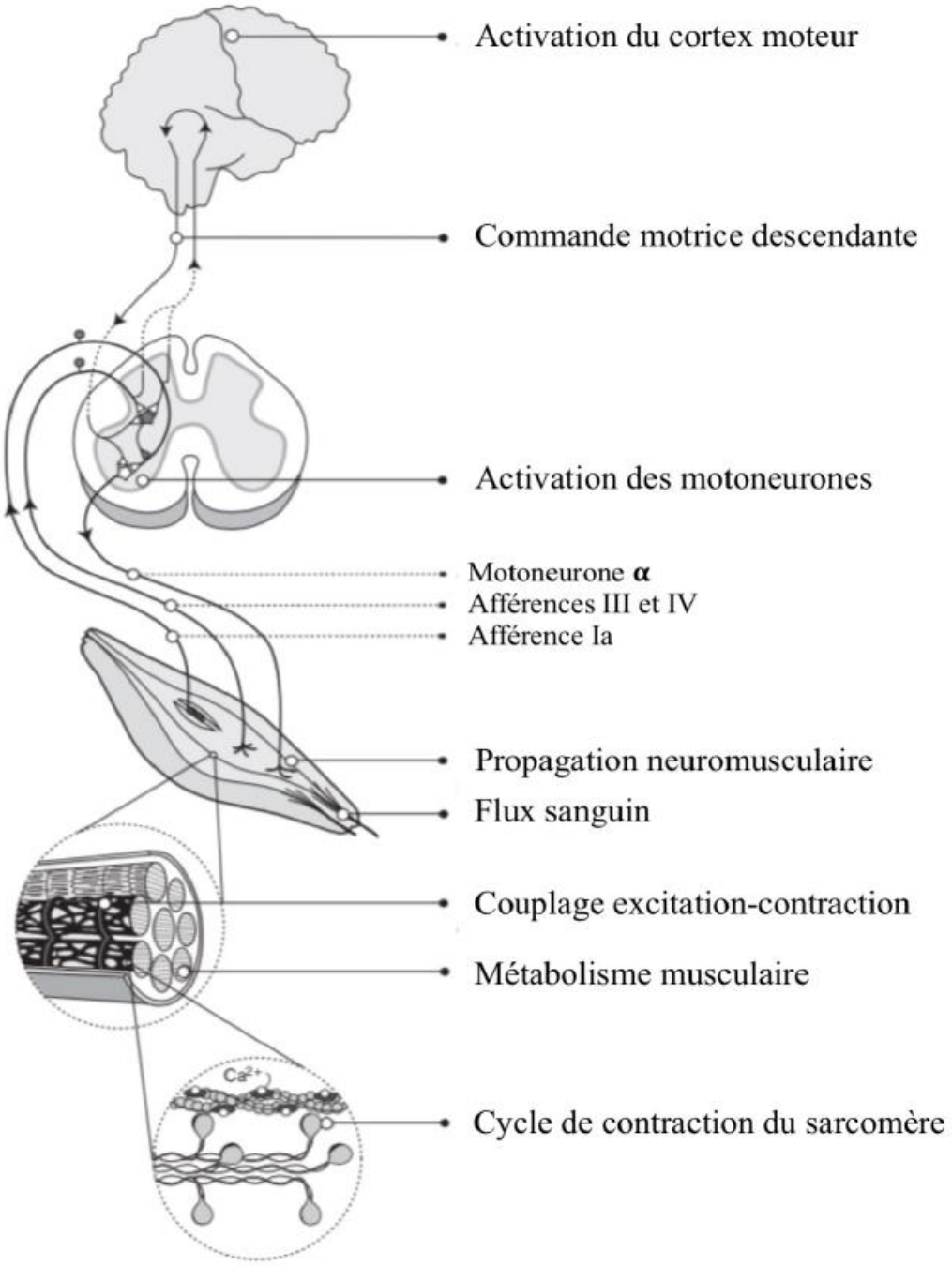


Figure 5. Représentation schématique des différents sites et processus permettant la production de la force et de la puissance musculaire et pouvant être impliqués dans l'altération de la fonction neuromusculaire. *Figure adaptée de Hunter (2018).*

A noter que les paramètres de la fonction neuromusculaire (*i.e.*., réponses évoquées) sont généralement mesurés à une longueur musculaire spécifique (Warren et coll., 1999), car ils sont modifiés par la longueur musculaire (*i.e*, l'angle articulaire) (Rassier et coll., 1999). Après des dommages musculaires induits par l'exercice, cette dépendance à la longueur peut être modifiée. Premièrement, il a été démontré que l'angle optimal pour la production du moment de force peut être déplacé vers les grandes longueurs musculaires après un exercice excentrique (Brockett et coll., 2001; Morgan & Allen, 1999). Ce déplacement vers la droite de la relation force-longueur entraîne une diminution plus importante du moment de FMV à courtes qu'à grandes longueurs musculaires (Child et coll., 1998; Philippou et coll., 2003; Saxton & Donnelly, 1996). De plus, Prasartwuth et coll. (2006) ont observé que la courbe force-angle articulaire avait tendance à plafonner aux grandes longueurs musculaires dans les heures et les jours suivant un exercice excentrique des fléchisseurs du coude, mais les mécanismes sous-jacents restent à identifier.

D. L'effet protecteur ou « *repeated bout effect* »

Si la littérature a montré que la réalisation d'un exercice inhabituel, prolongé et/ou intense peut induire des altérations prolongées de la fonction neuromusculaire et l'apparition d'une multitude de symptômes (Warren et coll., 1999), il est également bien connu que la répétition du même exercice dans les semaines qui suivent se caractérise par une diminution de l'amplitude de ces altérations/symptômes (Clarkson & Tremblay, 1988; Nosaka et coll., 1991). Ce phénomène, consécutif à un unique exercice induisant des dommages musculaires, est communément appelé « effet protecteur » ou « *repeated bout effect* » (RBE) dans la littérature internationale (McHugh, 2003). Cette réponse adaptative se met en place dans les premiers jours suivant l'exercice induisant des dommages musculaires et peut perdurer jusqu'à 6 mois (Nosaka et coll., 2001). Cependant l'amplitude de l'effet protecteur diminue dès les premières semaines (Maeo et coll., 2015) et est proportionnelle à l'intensité du premier exercice réalisé (Chen et coll., 2012a; Chen et coll., 2007). Si tous les mécanismes impliqués dans l'effet protecteur ne sont pas encore bien compris, une revue récente (Hyldahl et coll., 2017) précise que sa mise en place pourrait impliquer des adaptations nerveuses, des modifications des propriétés mécaniques du muscle et de la réponse inflammatoire, et un remodelage au niveau de la matrice extracellulaire.

Concernant les adaptations nerveuses, différentes études (Hyldahl et coll., 2017; McHugh, 2003) ont suggéré un recrutement préférentiel des unités motrices lentes et une

meilleure synchronisation des unités motrices au cours du deuxième exercice en comparaison du premier. Ces théories sont basées sur la diminution de la fréquence de décharge moyenne avec le RBE (Warren et coll., 2000) et l'utilisation d'algorithmes permettant d'identifier la synchronisation des différents potentiels d'action à partir d'un signal EMG (Dartnall et coll., 2011). Hyldahl et coll. (2017) suggèrent que le système nerveux central ajuste l'activation des motoneurones en distribuant le stress mécanique induit par l'exercice sur un plus grand nombre d'unités motrices lorsque l'exercice est répété. De plus, la mise en évidence d'un effet protecteur sur le membre controlatéral (Howatson & van Someren, 2007; Starbuck & Eston, 2012) suggère également la contribution des adaptations nerveuses dans le RBE. Cependant, l'amplitude de la protection conférée sur le membre controlatéral est inférieure à celle conférée sur le membre ipsilatéral (Howatson & van Someren, 2007), suggérant que les adaptations nerveuses n'expliquent pas entièrement le RBE.

Des modifications de la réponse inflammatoire comme une réduction de l'activation des monocytes et des neutrophiles ont été décrites après la répétition d'un exercice excentrique et pourraient être associées au RBE (Pizza et coll., 1996). De manière similaire, Smith et coll. (2007) ont observé une réduction de l'interleukine 6 (IL-6) et de MCP-1 (pour *macrophage chemo-tactic protein 1*) et une augmentation d'IL-10 (anti-inflammatoire) dans les heures qui suivent un deuxième exercice induisant des dommages musculaires (*i.e*. course en descente) par rapport au premier effectué quatre semaines plus tôt. Cependant, on ignore si les adaptations de la réponse inflammatoire sont la cause ou la conséquence de la réduction des dommages musculaires avec le RBE. Plus récemment, Deyhle et coll. (2016) ont montré une augmentation de cytokines pro-inflammatoires (*e.g*., MCP-1) et de l'infiltration de lymphocytes T après un deuxième exercice par rapport au premier effectué quatre semaines auparavant Cela suggère que le muscle devient plus efficace pour recruter des cellules immunitaires après un exercice excentrique unique et pourrait ainsi contribuer au RBE. Au vue des résultats contradictoires dans la littérature, plus d'études semblent nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de l'inflammation dans le RBE.

Des modifications des propriétés mécaniques du muscle sont également avancées pour expliquer le RBE (Hyldahl et coll., 2017). Proske et Morgan (2001) ont suggéré que l'addition de sarcomères en série (*i.e*. décalage de l'angle optimal) pourrait réduire le niveau d'étirement de chaque sarcomère, et donc le stress mécanique induit sur les fibres musculaires au cours de la répétition de l'exercice. Cependant, le lien entre l'augmentation du nombre de sarcomère en série et le RBE n'a jamais clairement été établi. Par ailleurs, des études (Lau et coll., 2015;

Penailillo et coll., 2015b) ont montré que des modifications du comportement des fascicules (*e.g.*, moindre élongation) et de la jonction musculo-tendineuse (*e.g.*, moindre déplacement) après un deuxième exercice excentrique pourraient être impliquées dans la moindre altération musculaire observée lorsque l'exercice est répété. Cela suggère que la raideur musculo-tendineuse est augmentée dans les semaines qui suivent un exercice induisant des dommages musculaires, dans le but de rendre le muscle plus résistant à un stress mécanique subséquent. En lien avec cette hypothèse, Lacourpaille et coll. (2014) ont montré une augmentation de la raideur musculaire 21 jours après un exercice excentrique des fléchisseurs du coude. Cette augmentation de raideur pourrait être due au remodelage de certaines protéines du cytosquelette comme la titine ou la desmine après un exercice excentrique (Féasson et coll., 2002; Lehti et coll., 2007). De plus, Hyldahl et coll. (2017) ont rapporté que le remodelage de la matrice extracellulaire pourrait augmenter la raideur musculaire et conférer une protection contre un stress mécanique subséquent. Enfin, il est important de noter que le RBE peut également survenir sans modification des propriétés mécaniques (Hoffman et coll., 2016). Il est possible que les caractéristiques de l'exercice (muscles, intensité, durée, etc.) expliquent la présence ou l'absence de certaines adaptations impliquées dans le RBE.

Synthèse :

Les dommages musculaires induits par l'exercice peuvent intervenir au niveau du sarcomère, du cytosquelette ou des éléments membranaires. Les dommages musculaires sont généralement définis par deux phases : la phase initiale due au stress mécanique, et la phase secondaire liée à des facteurs aggravants comme la perte de l'homéostasie du calcium ou l'inflammation. Si les exercices induisant des dommages musculaires conduisent à des altérations prolongées de la fonction neuromusculaire (d'origines centrale et périphérique), la répétition du même exercice dans les semaines qui suivent se caractérise par une diminution de l'amplitude de ces altérations. Cela s'expliquerait par différentes adaptations conférées par le premier exercice et reflèterait une moindre amplitude de dommages musculaires lorsque le même exercice est répété. Ce phénomène est appelé « effet protecteur » ou RBE.

III. Marqueurs indirects de dommages musculaires

Un marqueur, ou « biomarqueur » est défini comme « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » ("Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework," 2001). Classiquement, les marqueurs sont utilisés en milieu clinique et peuvent avoir diverses applications :

- Diagnostiquer une pathologie
- Différencier les stades d'une pathologie ou évaluer l'ampleur de celle-ci
- Pronostiquer l'évolution d'une pathologie
- Prédire et/ou surveiller la réponse à une intervention thérapeutique

L'évaluation de l'impact des séances d'entraînement, des compétitions et/ou des missions opérationnelles militaires sur la performance sont un enjeu pour de nombreux sportifs/militaires afin de gérer au mieux de la récupération et/ou les charges d'entrainement. Par conséquent, de nombreux marqueurs ont été proposés au cours des dernières décennies pour évaluer les dommages musculaires (Brancaccio et coll., 2010; Lippi et coll., 2018; Warren et coll., 1999). Cependant aucun ne s'est imposé comme le « *gold standard* » (*i.e.*, la référence) (Paulsen et coll., 2012; Warren et coll., 1999), amenant certains auteurs (Sorichter et coll., 1999) à formuler des recommandations sur ce que serait un marqueur idéal de dommages musculaires. D'après Sorichter et coll. (1999), un marqueur idéal pour évaluer les dommages musculaires devrait *(1) être strictement spécifique aux myocytes squelettiques pour permettre un diagnostic fiable du type de fibres musculaires lésées, (2) avoir une large fenêtre de diagnostic afin de réaliser des mesures précoces et tardives, (3) être sensible et permettre de détecter de faibles dommages musculaires, (4) être stable, avec des mesures rapides, simples, quantitatives et peu coûteuses, (5) être peu détectable en absence de lésion, (6) ne pas induire de dommages musculaires, et (7) être présent en grande quantité dans les myocytes squelettiques, permettant une libération importante dans la circulation sanguine après la lésion musculaire.* Cependant, certaines caractéristiques du marqueur de dommages musculaires idéal décrites par ces auteurs semblent applicables uniquement aux marqueurs circulants (*e.g.* créatine kinase, myoglobine) souffrant d'une variabilité interindividuelle (Anesi et coll., 2000; Damas et coll., 2016) qui pourrait limiter leur interprétation. Les marqueurs circulants ne permettent qu'une évaluation systémique des dommages musculaires, alors qu'une localisation

des dommages est également nécessaire afin d'adapter au mieux les stratégies de récupération et les charges d'entrainement. En effet, l'amplitude des dommages musculaires peut varier entre les groupes musculaires (Maeo et coll., 2017) et au sein d'un groupe musculaire (*i.e.*, entre les muscles) (Maeo et coll., 2018) selon les exercices réalisés. L'état de la capacité fonctionnelle des individus étant important dans la prise en charge clinique et pour la performance du sportif (Abernethy et coll., 1995), son évaluation pour quantifier l'amplitude des dommages musculaires a été proposée (Warren et coll., 1999). Malgré l'absence de marqueur idéal pour suivre l'amplitude des dommages musculaires, l'évaluation de la capacité de production de force ou de puissance musculaire est considérée, jusqu'à maintenant, comme la mesure la plus valide pour évaluer les dommages musculaires (Paulsen et coll., 2012; Warren et coll., 1999). Cette mesure, relativement simple à effectuer, permet une évaluation non-invasive de l'état d'un groupe musculaire dans sa globalité, de manière quantitative et reproductible (Abernethy et coll., 1995). De plus, l'amplitude de la diminution de capacité de production de force semble associée au temps nécessaire à sa récupération (**Figure 6**), ce qui semble particulièrement intéressant pour programmer la reprise d'une activité intense.

Les marqueurs communément utilisés pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires de manière non-invasive n'étant pas satisfaisants, une bonne connaissance de leurs avantages/limites semble nécessaire pour les interpréter et orienter la recherche de nouveaux marqueurs. Une revue (non-exhaustive) des marqueurs classiquement utilisés est donc proposée ci-après).

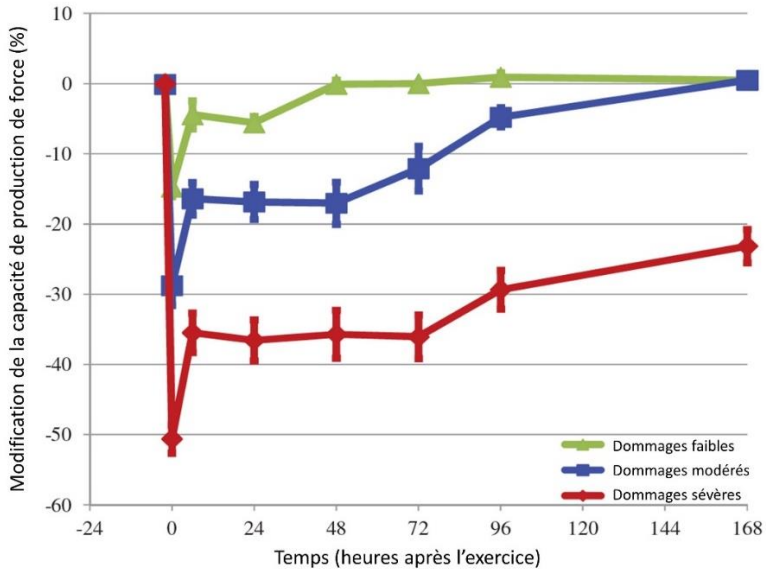


Figure 6. Récupération de la capacité de production de force de sujets ayant effectué des exercices excentriques*. Les dommages musculaires sont considérés comme « faibles », « modérés », et « sévères » lorsque la diminution de la capacité de production de force au-delà de 24 h est d'environ 5, 20 et 35 %, respectivement. À noter que la capacité de production de force est récupérée dans les 48 h lorsque les dommages musculaires sont « faibles », entre 48 et 168 h lorsqu'ils sont « modérés » et au-delà de 168 h lorsqu'ils sont « sévères ». Figure adaptée de (Paulsen et coll., 2012).*

A. Force maximale volontaire

Classiquement, la capacité de production de force/puissance d'un groupe musculaire est évaluée par le moment de force maximale volontaire (FMV), mesuré au niveau articulaire (Abernethy et coll., 1995). Ce moment de force est généralement évalué à l'aide d'un dynamomètre isocinétique et est considéré comme la référence pour ce type d'évaluation (Abernethy et coll., 1995). La sensibilité aux dommages musculaires de la FMV n'est plus à démontrer car une diminution est observée dès la fin de l'exercice lésionnel et peut durer jusqu'à plusieurs jours/semaines après (Clarkson et coll., 1992). Cependant, la spécificité de la mesure n'est pas assurée dans les premières heures après l'exercice. La diminution de la FMV induite par l'exercice peut en effet être le témoin d'un autre phénomène physiologique appelé fatigue neuromusculaire (Bigland-Ritchie & Woods, 1984; Gandevia, 2001). La fatigue neuromusculaire peut être définie comme « toute réduction, induite par l'exercice, de la capacité des muscles à exercer une force ou une puissance » (Bigland-Ritchie & Woods, 1984). Bien que représentant des phénomènes physiologiques différents, la fatigue neuromusculaire et les dommages neuromusculaires peuvent donc intervenir simultanément après la pratique d'exercices inhabituels, prolongés et/ou très intenses (Paulsen et coll., 2012) (*e.g.*, ultra-endurance, marche/course en descente, cross-training). La comparaison d'exercices purement excentriques et concentriques, connus pour induire respectivement d'importants dommages musculaires et une fatigue neuromusculaire importante, permet d'illustrer l'impact de ces deux phénomènes physiologiques sur la capacité de production de force dans les heures et les jours qui suivent l'exercice (Souron et coll., 2018) (**Figure 7**). Comme la réduction de la capacité à produire une force induite par la fatigue neuromusculaire est observable uniquement dans les premières heures suivant l'exercice et que celle induite par les dommages musculaires peut durer plusieurs jours (Paulsen et coll., 2012; Souron et coll., 2018; Warren et coll., 1999), il est généralement admis que la diminution de FMV observée au-delà de 24 h après l'arrêt de l'exercice permet d'évaluer les dommages musculaires uniquement (Paulsen et coll., 2012; Warren et coll., 1999). La réduction de force observée dans les premières heures suivant l'exercice reflète, quant à elle, un effet combiné de la fatigue et des dommages musculaires (Warren et coll., 1999).

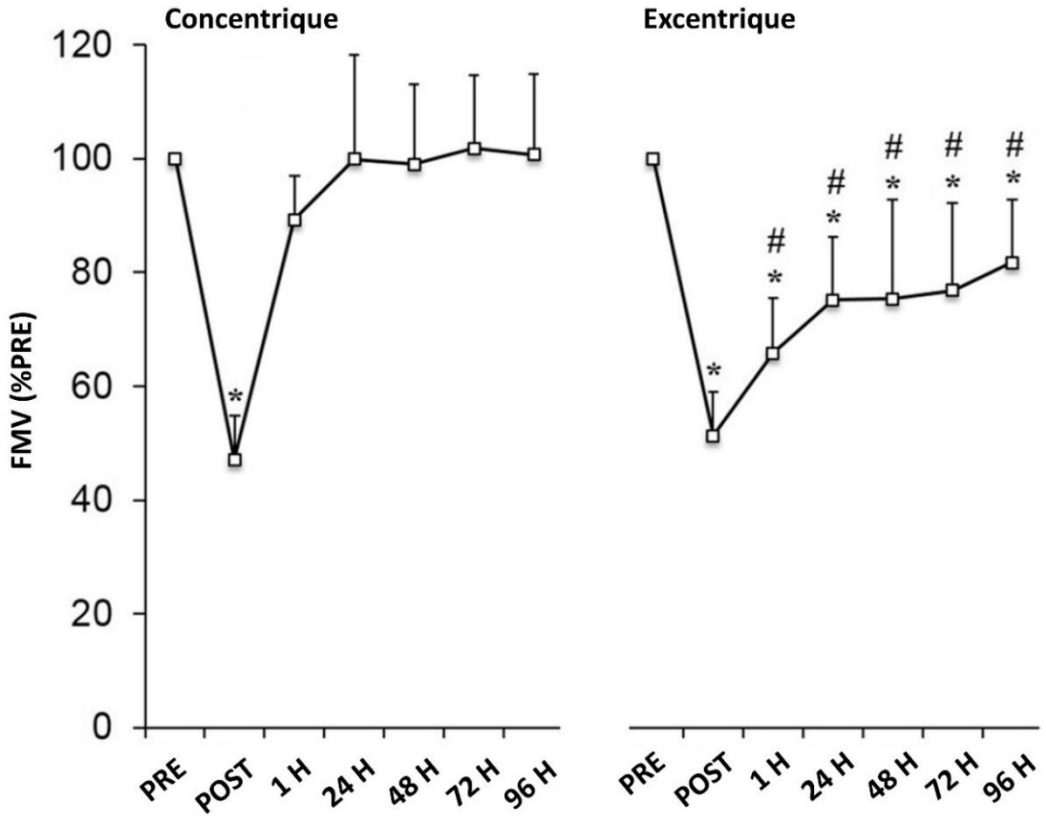


Figure 7. Modification de la force maximale volontaire (FMV) des extenseurs du genou avant (PRE), immédiatement après (POST), et 1, 24, 48, 72, 96 h après (1 H, 24 H, 48 H, 72 H, 96 H) des contractions maximales volontaires concentriques (à gauche) et excentriques (à droite). *La perte de force mesurée immédiatement après la fin de l'exercice et similaire pour les deux conditions, mais la récupération est bien plus longue après les contractions excentriques, connues pour induire des dommages musculaires. FMV : force maximale volontaire. Figure adaptée de Souron et coll. (2018).*

La diminution de la FMV est donc sensible aux dommages musculaires et semble y être spécifique au-delà de 24 h après la fin de l'exercice lésionnel. De plus, l'étude de Damas et coll. (2016) confirme, par une approche indirecte, que la FMV serait un marqueur valide pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires. Dans cette étude, les auteurs ont classifié les réponses de plusieurs marqueurs de dommages musculaires pour un grand nombre de volontaires (n = 286) en trois groupes *(« low », « moderate »* et *« high » responders*), en se basant sur la plus grande perte de FMV observée au-delà de 24 h après un exercice induisant des dommages musculaires sur les fléchisseurs du coude. Leurs résultats ont montré que cette classification permettait de réduire la variabilité des réponses pour les autres marqueurs à l'intérieur des groupes, permettant de différencier les réponses en termes d'amplitude (**Figure 8**) et de cinétique (**Figure 9**). Ces résultats semblent donc suggérer que la classification de la diminution de la FMV au-delà de 24 h pourrait discriminer au moins partiellement les réponses des autres marqueurs, renforçant l'intérêt de ce marqueur pour représenter l'amplitude des dommages musculaires.

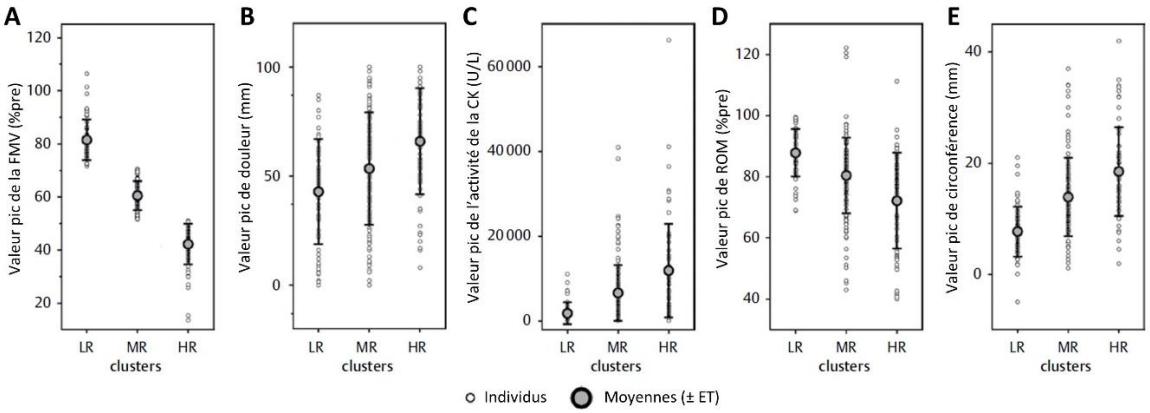


Figure 8. Classification des faibles répondeurs (LR), répondeurs modérés (MR) et forts répondeurs (HR), basé sur la plus grande perte de force maximale volontaire (FMV) mesurée au-delà de 24 h après un exercice induisant des dommages musculaires (A). *La valeur est présentée en pourcentage la valeur initiale (%pre). Les figures B-E représentent les changements les plus importants (valeur pic) par rapport à la valeur initiale de la douleur musculaire* ***(B)****, de la créatine kinase (CK)* ***(C)****, de l'amplitude de mouvement (ROM)* ***(D)****, et de la circonférence du membre lésé* ***(E)****. Figure adaptée de Damas et coll. (2016).*

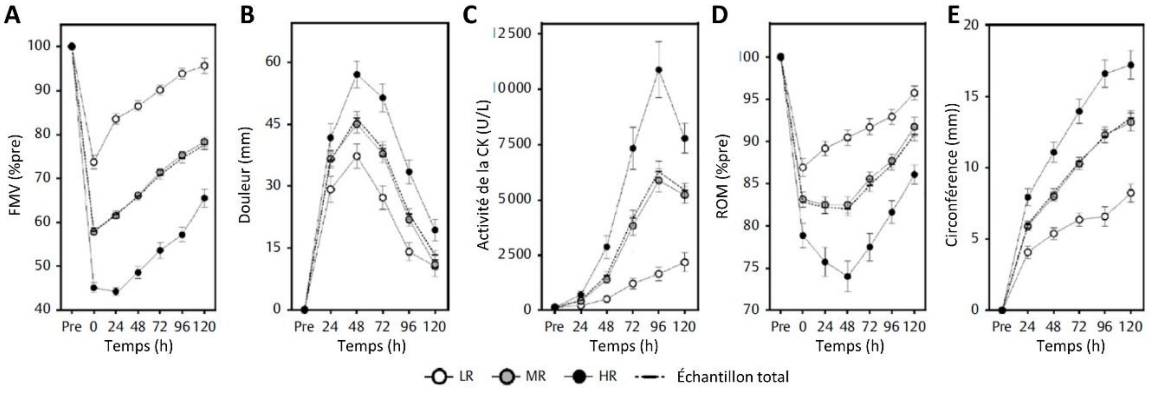


Figure 9. Modifications par rapport à la valeur initiale de la force maximale volontaire (FMV) (A), de la douleur musculaire (B), de l'activité de la créatine kinase (CK) (C), de l'amplitude de mouvement (ROM) (D), et de la circonférence du membre lésé (E) jusqu'à 5 jours après un exercice induisant des dommages. *Les modifications sont représentées (moyenne ± ET) pour les faibles répondeurs (LR), répondeurs modérés (MR) et forts répondeurs (HR) et pour l'ensemble de l'échantillon. %pre : pourcentage de la valeur initiale. Figure adaptée de Damas et coll. (2016).*

À titre de comparaison, Clarkson et coll. (1992) ont réalisé des travaux similaires en classifiant les réponses (n = 109) de plusieurs marqueurs en fonction du pic d'activité de créatine kinase (CK) observé. Les résultats montrent que la classification ne permettait pas de réduire la variabilité des réponses pour les autres marqueurs à l'intérieur des groupes, ne permettant pas de différencier les réponses en termes d'amplitude et de cinétique (**Figure 10**). Ces résultats suggèrent donc une variabilité interindividuelle importante pour ce marqueur pourtant couramment utilisé.

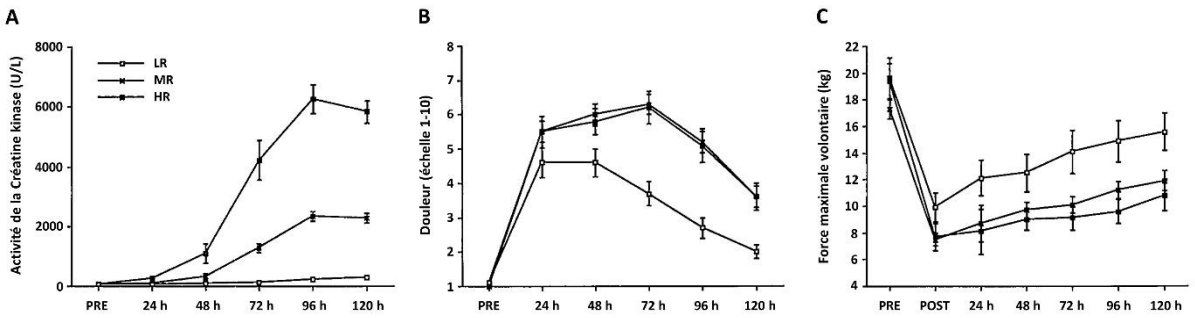


Figure 10. Valeurs de l'activité de la créatine kinase (A), de la douleur musculaire (B), et de la force maximale volontaire (C) avant et jusqu'à 5 jours après un exercice induisant des dommages musculaires pour les faibles répondeurs (LR) (n = 31), répondeurs modérés (MR) (n = 50), et forts répondeurs (HR) (n = 28). *La classification concernant les répondeurs était basée sur le pic de créatine kinase (LR :< 500 U/L ; MR : entre 500 et 2000 U/L ; HR : > 2000 U/L). Figure adaptée de Clarkson et coll. (1992).*

Bien que la diminution de la FMV semble être le marqueur le plus valide pour évaluer les dommages musculaires du fait de sa bonne reproductibilité et de sa bonne sensibilité, spécificité (> 24 h), et proportionnalité aux dommages musculaires, différents aspects méthodologiques doivent être pris en compte lors de l'interprétation de la mesure. Parmi ces aspects, le mode de contraction (isométrique, concentrique ou excentrique), la vitesse de contraction et l'angle/amplitude articulaire auxquels la mesure de FMV est réalisée doivent être contrôlés car ils pourraient impacter la production de force (Abernethy et coll., 1995; Guilhem et coll., 2010; Rassier et coll., 1999). Par ailleurs, comme la FMV peut être impactée par des facteurs centraux (*i.e.*, nerveux) et périphériques (*i.e.*, musculaires) (Gandevia, 2001), la mesure de ces facteurs semble importante pour mieux comprendre l'origine de l'altération de la fonction neuromusculaire après un exercice induisant des dommages musculaires. En effet, une meilleure compréhension de ces facteurs semble nécessaire pour adapter au mieux les stratégies d'entrainement et de récupération.

Bien que la FMV évaluée au-delà de 24 h après l'exercice soit considérée comme le marqueur indirect le plus valide pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires, d'autres marqueurs sont souvent utilisés malgré leurs limites, car ils peuvent : permettre un diagnostic plus précoce, être plus simple à mesurer, ou évaluer les muscles d'un groupe musculaire de manière individuelle. Par ailleurs, ces différents marqueurs pourraient rendre compte plus fidèlement des différents processus physiologiques impliqués (*e.g.*, dommage du sarcolemme, gonflement du muscle).

B. Autres marqueurs de dommages musculaires

1. Angle optimal

Un décalage de l'angle optimal vers la droite (*i.e.*, vers les grandes longueurs musculaires) est souvent observé au décours d'exercices induisant des dommages musculaires (Brockett et coll., 2001; Prasartwuth et coll., 2006; Proske & Morgan, 2001). Ce décalage de la relation force-longueur apparait immédiatement après un exercice excentrique en raison de l'altération des sarcomères, augmentant la compliance en série du muscle (Proske & Morgan, 2001). Par ailleurs, le décalage observé au-delà d'une semaine après l'exercice lésionnel est plutôt considéré comme une adaptation témoignant de l'augmentation du nombre de sarcomères en séries (Proske & Morgan, 2001). Le décalage de l'angle optimal devrait donc être pris en compte lorsque la FMV mesurée à un angle spécifique est utilisée comme un marqueur de dommages musculaires (Warren et coll., 1999). À noter que ce décalage a également été identifié comme pouvant être impliqué dans l'effet protecteur car il permettrait de limiter la tension au niveau des fibres musculaires lors d'un exercice subséquent (Hyldahl et coll., 2017).

2. Taux de développement du moment de force, *Rate of torque development*

Le taux de développement du moment de force, ou *rate of torque development* (RTD) dans la littérature internationale, est défini comme la pente entre le moment de force isométrique et le temps, et représente la capacité du système neuromusculaire à produire rapidement de la force en début de contraction (Aagaard et coll., 2002). Le RTD est généralement mesuré lors d'une contraction maximale volontaire (CMV) sur un court intervalle de temps (inférieur à 250 ms) (Aagaard et coll., 2002; Penailillo et coll., 2015a) mais peut également être mesuré lors d'une contraction évoquée simple (Jenkins et coll., 2013). Pour le RTD évalué lors de CMV, certaines études (Jenkins et coll., 2014; Penailillo et coll., 2015a) ont montré que ce paramètre pourrait être un marqueur intéressant de dommages musculaires. Cependant, il n'existe pas de consensus sur l'intervalle à utiliser pour calculer le RTD (*e.g.*, 0-100 *vs.* 100-200 ms). Il semblerait la phase précoce du RTD (*e.g.*, 0-100 ms) représente plutôt des mécanismes nerveux alors que la phase plus tardive (*e.g.* 100-200 ms) représente plutôt les mécanismes contractiles (Jenkins et coll., 2014; Penailillo et coll., 2015a). Récemment, Brusco et coll. (2022) ont suggéré que la diminution de la phase précoce du RTD pourrait être due aux mécanismes nerveux et à l'altération de la raideur de l'ensemble muscle-tendon, réduisant la transmission de la force. Les auteurs suggèrent que les altérations de l'intégrité du cytosquelette et de la matrice extracellulaire pourraient être mises en cause. De plus, les auteurs suggèrent

que la diminution de la phase tardive du RTD serait due à l'altération des propriétés contractiles du muscle.

3. Courbatures, ou « *delayed-onset muscle soreness* »

Les courbatures (ou DOMS pour « *delayed-onset muscle soreness* » dans la littérature internationale) correspondent à des douleurs musculaires d'apparition retardée survenant généralement lors de la palpation du muscle ou lors du mouvement. L'évaluation de l'amplitude des douleurs se fait généralement à l'aide d'une échelle visuelle analogique, permettant à l'individu de quantifier la douleur. La douleur peut également être quantifiée à l'aide d'un algomètre de pression. Brièvement, une pression croissante est appliquée en regard du muscle à l'aide d'un algomètre jusqu'à ce que l'individu indique que la sensation de pression devient douloureuse. La pression correspondante est appelée « seuil de pression de la douleur (ou PPT pour « *pain pressure threshold* » dans la littérature internationale ») et permet de quantifier la douleur.

Les DOMS sont souvent utilisés pour évaluer les dommages musculaires (Warren et coll., 1999) du fait de leur spécificité aux exercices excentriques. Ces douleurs apparaissent approximativement 24 h après la fin d'un exercice induisant des dommages musculaires et peuvent augmenter jusqu'à 72 h après l'exercice, avant d'observer une récupération après 5 à 7 jours (Lewis et coll., 2012). En effet, de nombreuses études ont montré, par la comparaison des modes de contractions (*i.e.*, concentrique *vs.* excentrique), que les DOMS apparaissaient préférentiellement dans la condition excentrique (connue pour induire des dommages musculaires) (Banzet et coll., 2013; Clarkson et coll., 1986; Souron et coll., 2018). Cependant, la diminution de la FMV au-delà de 24 h et l'augmentation des DOMS sont faiblement corrélées (Damas et coll., 2016; Nosaka et coll., 2002), suggérant que les DOMS sont imparfaits pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires. Cela semble s'expliquer par une différence interindividuelle dans la perception de la douleur (Strong et coll., 2002) et par une étiologie différente entre la diminution de FMV et l'apparition des DOMS. Si l'étiologie des DOMS est encore mal connue, les théories les plus crédibles semblent être liées aux dommages musculaires et/ou des tissus conjonctifs et aux processus inflammatoires (Cheung et coll., 2003). Si les courbatures font souvent référence au muscle par l'utilisation du terme anglais « *delayed-onset muscle soreness* », les dommages induits par l'exercice au niveau du tissu conjonctif (*i.e.*, endomysium et perimysium) pourraient eux aussi être impliqués dans le développement et la perception de la douleur retardée (Cheung et coll., 2003). En effet, une

récente revue (Wilke & Behringer, 2021) a rapporté que le fascia, assurant la connexion entre le muscle et le tendon, est plus sensible à la douleur que le muscle. Au cours de l'inflammation, certaines substances (*e.g.*, prostaglandines, bradykinines, histamine) sont produites et un liquide riche en protéines (exsudat) est libéré vers le muscle en raison d'une augmentation de la perméabilité des capillaires (Smith, 1991). L'apparition de ces substances et l'augmentation de la pression intramusculaire (*i.e.*, gonflement/œdème) induite par l'influx de fluide dans le muscle peuvent sensibiliser et stimuler les afférences musculaires III et IV impliquées dans la nociception.

4. Gonflement du muscle, œdème

L'accumulation de fluides dans le compartiment interstitiel dû à l'inflammation (augmentation du débit sanguin, de la vasodilatation et de la perméabilité vasculaire ; Chazaud (2020)) peut conduire à un gonflement du muscle et l'apparition d'un œdème dans les jours qui suivent l'exercice (Clarkson & Hubal, 2002; Clarkson et coll., 1992). Ce gonflement apparait généralement à partir de 24 h et son pic est fréquemment mesuré au-delà de 72 h (Clarkson & Hubal, 2002; Clarkson et coll., 1992; Damas et coll., 2016). Après des exercices induisant des dommages musculaires, l'œdème peut être objectivé en mesurant la circonférence du membre contenant les muscles lésés, en quantifiant l'intensité échographique (*i.e.* niveau de gris) ou l'épaisseur musculaire par échographie, ou par imagerie par résonance magnétique (IRM) en mesurant le temps de relaxation transversale (T_2). Si toutes ces mesures reflètent le même processus physiologique, ces mesures présentent des avantages et des inconvénients variables. La mesure de la circonférence du membre est un moyen simple et peu couteux d'évaluer l'œdème mais elle ne permet pas de distinguer les muscles d'un même membre. Pourtant, localiser les dommages semble nécessaire afin d'adapter au mieux les stratégies de récupération et les modalités et charges d'entrainement. Les mesures de l'intensité échographique ou de l'épaisseur musculaire par échographie permettent également une évaluation simple et rapide mais avec la possibilité d'évaluer les muscles individuellement. Dans un contexte de dommages musculaires, l'augmentation de l'intensité (*i.e.*, brillance) et de l'épaisseur musculaire est interprétée comme une augmentation de l'œdème mais la fiabilité des mesures semble modérée (Barotsis et coll., 2020; Wong et coll., 2020). Une attention particulière doit être portée sur le placement et l'orientation de la sonde, et sur les paramètres d'acquisition (notamment le gain) qui peuvent influencer l'épaisseur musculaire et l'intensité échographique (*i.e.* « *echo-intensity* ») (Dankel et coll., 2020; Wong et coll., 2020). La mesure du T_2 par IRM est plus

difficile à mettre en place et plus coûteuse mais est considérée comme la méthode de référence pour localiser l'augmentation du contenu en eau dans le muscle (*i.e.*, l'œdème) (Maeo et coll., 2017; Wong et coll., 2020). Cependant, l'œdème semble peu en lien avec la fonction musculaire puisque sa cinétique d'apparition et de récupération est très différente de celle observée pour la FMV (Clarkson & Hubal, 2002; Clarkson et coll., 1992). Malgré cette différence de cinétique, l'évaluation du gonflement pourrait refléter en partie la perte de FMV mesurée au-delà de 24 h. En effet, des corrélations faibles à modérées ont été observées entre cette diminution de force prolongée et l'augmentation de la circonférence du membre (Damas et coll., 2016) ou du T_2 (Foure et coll., 2014). Enfin, le gonflement du muscle pourrait exercer une tension sur les structures conjonctives assurant la connexion entre le muscle et le tendon (*i.e.*, perimysium et epimysium) et pourrait ainsi induire une augmentation de la raideur passive du système musculo-tendineux dans les jours qui suivent l'exercice (Whitehead et coll., 2001).

5. Raideur du système musculo-tendineux

Une augmentation de la raideur musculo-tendineuse passive est souvent observée après des exercices induisant des dommages musculaires (Proske & Morgan, 2001). Parmi les mécanismes explicatifs impliqués dans l'augmentation de raideur musculo-tendineuse, l'altération de l'homéostasie du calcium due à des dommages du sarcolemme (cf. § II.B.1) pourrait conduire à une tension passive basale dès la fin de l'exercice (Whitehead et coll., 2001). De plus, le gonflement du muscle pourrait induire une augmentation de la raideur passive du système musculo-tendineux dans les jours qui suivent l'exercice (Whitehead et coll., 2001). La raideur atteint généralement son pic dans les 72 premières heures après l'exercice et peut rester élevée au-delà d'une semaine (Clarkson et coll., 1992; Damas et coll., 2016; Howell et coll., 1993). La raideur du système musculo-tendineux est classiquement mesurée par l'amplitude de mouvement (ou « *range of motion* » en anglais) (Warren et coll., 1999), par la mesure du moment de force passif (Whitehead et coll., 2001), ou par l'utilisation de techniques d'échographie permettant de suivre le déplacement du tendon ou de l'aponévrose (Kubo et coll., 2000, 2001).

a. Amplitude de mouvement articulaire, ou « *range of motion* »

L'amplitude de mouvement au niveau d'une articulation est définie comme l'amplitude de mouvement maximale permise par le système musculo-tendineux, la peau, les tissus sous-cutanés et la conformation articulaire (Warren et coll., 1999). Cette mesure peut être effectuée de manière simple et rapide. Brièvement, le système musculo-tendineux est étiré par

l'investigateur en mobilisant l'articulation de façon à mesurer l'amplitude maximale de mouvement à l'aide d'un goniomètre. Cependant, cette mesure peut être expérimentateur-dépendante et être influencée par la perception de l'individu à la douleur. Cela pourrait expliquer, en partie, la relation modérée entre la diminution de l'amplitude de mouvement et la diminution de la FMV (Damas et coll., 2016). Son évaluation reste cependant largement utilisée dans un contexte clinique et dans la littérature en raison de sa praticité.

b. Dynamométrie

L'utilisation d'un dynamomètre isocinétique permet également de quantifier la raideur au niveau articulaire. Bien que sa praticité soit moindre, l'ergométrie présente l'avantage de quantifier la force passive induite par l'étirement du système musculo-tendineux et de standardiser la réalisation de l'étirement (*e.g.*, vitesse de mouvement). Brièvement, la raideur est estimée par la relation entre le moment de force passif et l'angle articulaire, en rapportant la valeur du moment de force pour un angle articulaire déterminé, ou en rapportant la valeur de l'angle articulaire pour un moment de force déterminé (Magnusson, 1998). Si cette technique permet d'objectiver l'évaluation de la raideur, l'évaluation ne permet pas d'évaluer directement le comportement mécanique des muscles mais plutôt de l'ensemble des structures croisant l'articulation. Afin de s'affranchir de ces limites, de nombreuses études ont recours à des techniques d'échographie (Gennisson et coll., 2013; Herbert et coll., 2002; Kubo et coll., 2001).

c. Échographie

L'utilisation d'un dynamomètre isocinétique et de l'échographie permet d'objectiver le moment de force et le déplacement du tendon/aponévrose qui sont nécessaires pour calculer la raideur au niveau de l'unité muscle-tendon (Herbert et coll., 2002; Kubo et coll., 2001). Brièvement, la sonde est fixée en regard de la jonction musculo-tendineuse ou de l'aponévrose lorsque l'articulation est passivement mobilisée par le dynamomètre isocinétique (Herbert et coll., 2002) ou lors d'une contraction isométrique triangulaire (Kubo et coll., 2001). La raideur est ensuite calculée par la relation entre la force et le déplacement de la jonction musculo-tendineuse (ou de l'aponévrose). Ces mesures sont donc influencées par différents muscles (*i.e.*, agonistes et antagonistes) et ne représentent pas de la raideur du tissu musculaire mais celle des tissus conjonctifs.

Comme les muscles peuvent être différemment atteints au sein d'un groupe musculaire (Maeo et coll., 2017) du fait de leurs différences anatomiques (*i.e.*, mono- et bi-articulaires) et architecturales (*i.e.*, longueur musculaire et angle de pennation), les propriétés mécaniques (*i.e.*,

la raideur) du muscle peuvent donc être différemment affectées au sein d'un groupe musculaire (Heales et coll., 2018). Des techniques permettant d'évaluer la raideur des différents muscles et des différentes structures (*e.g.*, tendon, aponévroses) semblent donc nécessaires afin d'évaluer l'état du muscle après un exercice induisant des dommages musculaires. L'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement, présentée au § C.1, semble être un outil prometteur pour évaluer la raideur des muscles de manière individuelle après l'exercice.

6. Marqueurs sanguins

L'augmentation de la perméabilité du sarcolemme en réponse aux dommages musculaires induit une libération des molécules intramusculaires vers l'espace extracellulaire, puis vers la circulation sanguine. C'est le cas notamment de la CK, de la myoglobine (Mb) et du lactate déshydrogénase (LDH) dont les mesures d'activités/concentrations dans le sang sont souvent utilisées pour évaluer le niveau de dommage musculaire (Warren et coll., 1999).

a. Activité de la créatine kinase

La CK (masse moléculaire : ~84 kDa) est une enzyme jouant un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique. En effet, elle catalyse le transfert réversible d'ion phosphate entre la phosphocréatine (Pcr) et la créatine, et entre l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP). La CK est présente dans de nombreux tissus mais est principalement contenue dans le muscle (~60-70 % dans le muscle strié squelettique, ~20-30 % dans le muscle cardiaque et ~5-10 % dans le cerveau). Il existe trois différentes iso-enzymes : la CK-MM, la CK-MB et la CK-BB. Le muscle strié squelettique contient 98 % de CK-MM et 2 % de CK-MB, tandis que le muscle cardiaque contient 70-80 % d'isoenzyme MM et 20-30 % de MB (Sumien et coll., 2018). La CK-BB est quant à elle principalement présente dans le cerveau (Sumien et coll., 2018). La spécificité de la CK au tissu musculaire a donc amené à l'utilisation de cette enzyme dans le diagnostic des dommages musculaires induits par des exercices inhabituels, prolongés et/ou très intenses (Armstrong, 1986). À l'heure actuelle, l'activité de la CK est un des marqueurs les plus utilisés dans le diagnostic des dommages musculaires en raison de sa large disponibilité dans le sang (*i.e.*, la CK atteint son pic de détection entre 24 et 96 h et peut rester élevée jusqu'à 7-10 jours) et au coût relativement faible de son dosage (Lippi et coll., 2018). Cependant, le seuil de détection pour le diagnostic des dommages musculaires induits par l'exercice, sur la base d'une hyperCKémie, n'est pas clairement établi dans la littérature (5 à 10 fois les valeurs de bases, > 5000-10000 U/L, etc.) (Stahl et coll., 2020). Cela peut s'expliquer par la faible corrélation entre l'augmentation de cette enzyme et l'amplitude

de la diminution de FMV prolongée (Damas et coll., 2016). En effet, une importante variabilité interindividuelle a été rapportée puisque l'activité de la CK peut être influencée par différents facteurs comme l'âge, le sexe ou l'origine ethnique (Sumien et coll., 2018). Par conséquent, la mesure de l'activité de la CK semble imparfaite pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires.

b. Concentration de la myoglobine

La myoglobine (masse moléculaire : ~17 kDa) est une protéine présente aussi bien dans le muscle strié squelettique que dans le muscle cardiaque. Elle a pour fonction de stocker et de transporter l'oxygène du sarcolemme jusqu'à la mitochondrie. La concentration de la Mb dans le sang est également un des marqueurs les plus utilisés pour diagnostiquer les dommages musculaires. Cependant, la clairance rapide (24 à 72 h) et le coût relativement élevé du dosage de la Mb dans le sang ont conduit à une utilisation un peu moins courante que la CK (Lippi et coll., 2018). La concentration de la Mb dans le sang présente une variabilité interindividuelle non négligeable avec notamment une influence de l'âge et du sexe (Anesi et coll., 2000). Son interprétation est donc également limitée puisque le seuil pathologique n'est pas clairement défini dans la littérature (entre 400 et 4000 µg/L) (Servonnet et coll., 2018). Si les évaluations de la concentration en Mb et de la FMV sont souvent utilisées de façon concomitante pour évaluer les dommages, seuls Carmona et coll. (2018) ont, à notre connaissance, cherché à établir un lien entre ces marqueurs après un exercice excentrique (corrélation modérée). Une corrélation modérée entre la concentration plasmatique en Mb et la performance en sprint (20 m) a également été rapportée par Ascensao et coll. (2008) chez des footballeurs après un match de haut niveau. D'autres explorations du lien entre l'augmentation de concentration en Mb et la diminution de la FMV mesurée au-delà de 24 h après un exercice excentrique semblent donc nécessaires pour valider l'utilisation de la Mb comme marqueur permettant de prédire l'état fonctionnel du muscle.

c. Autres marqueurs couramment utilisés

D'autres marqueurs comme la lactate déshydrogénase (LDH), l'aspartate aminotransférase (AST) et l'alanine aminotransférase (ALT) ont également été largement utilisés comme marqueurs de dommages musculaires (pour une revue voir Brancaccio et coll. (2010)). Le LDH est une enzyme qui convertit le pyruvate en lactate et vice-versa. Elle est abondante aussi bien dans les muscles cardiaques et strié squelettique que dans les poumons, le foie, les reins et les globules rouges. L'AST est une enzyme qui catalyse la réaction : Aspartate

+ Alpha-cétoglutarate ⇌ Oxaloacétate + Glutamate. Elle se trouve en quantité importante dans les muscles (cardiaque et squelettiques), dans le foie, le rein et le cerveau. L'ALT est une enzyme qui catalyse la réaction : Alanine + Alpha-cétoglutarate ⇌ pyruvate + Glutamate. Elle est également retrouvée dans différents tissus comme le muscle, les reins ou le foie. Même si ses différents marqueurs ont été beaucoup utilisés, peu d'études ont évalué leur lien avec la diminution de la FMV après un exercice induisant des dommages musculaires. Carmona et coll. (2018) ont montré des corrélations modérées entre ces marqueurs et la diminution de la FMV mesurée 48 h après un exercice excentrique (Carmona et coll., 2018). Cependant, ces marqueurs ne permettent pas d'évaluer correctement les dommages musculaires en raison de leur manque de spécificité au tissu musculaire et leur augmentation qui semble tardive après un exercice induisant des dommages musculaires (Carmona et coll., 2018; Lippi et coll., 2018). À la vue du manque d'études ayant rapporté des corrélations avec la diminution de la FMV, une meilleure connaissance du lien entre la perte de FMV et les augmentations de ces marqueurs après des exercices induisant des dommages musculaires semble nécessaire.

Synthèse :

La diminution de la FMV mesurée au-delà de 24 h est considérée comme le marqueur le plus valide à l'heure actuelle en raison de sa bonne reproductibilité, sensibilité, spécificité (> 24 h), et proportionnalité aux dommages musculaires. Cependant, la FMV ne semble pas spécifique aux dommages musculaires dans les premières heures suivant l'exercice (due à l'effet confondant de la fatigue et des dommages musculaires) et ne permet pas d'évaluer les muscles de manière individuelle. Les autres marqueurs de dommages musculaires utilisés actuellement ne sont pas proportionnels à la perte FMV mesurée au-delà de 24 h et souffrent de différentes limites comme une faible reproductibilité (*e.g.*, épaisseur musculaire, intensité de l'échographie), un manque de spécificité ou des augmentations tardives (*e.g.*, courbatures, œdème). Par conséquent, aucun marqueur actuel ne semble répondre aux exigences des sportifs/militaires. De « nouveaux » marqueurs permettant de prédire la diminution de la FMV au-delà de 24 h de manière précoce semblent donc nécessaires. Ces marqueurs se doivent d'être reproductibles, sensibles/spécifiques aux dommages musculaires, non ou faiblement invasifs, et si possible permettre des mesures simples, rapides et peu coûteuses.

C. « Nouveaux » marqueurs

Parmi les marqueurs utilisés pour évaluer les dommages musculaires, la raideur musculaire mesurée par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement (Lacourpaille et

coll., 2017) et les microARNs circulants (Banzet et coll., 2013; Siracusa et coll., 2016) semblent prometteurs pour évaluer précocement les dommages musculaires. Cependant leur intérêt pour prédire et suivre l'amplitude des dommages musculaires doit encore être évalué.

1. Raideur musculaire mesurée par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement

    a. Introduction à l'élastographie

L'élastographie s'est développée dans les années 1990 pour mieux caractériser les propriétés mécaniques des tissus mous (*e.g*, raideur) et apporter une information quantitative à la palpation qualitative faite traditionnellement dans le contexte clinique (e.g., diagnostic du cancer du sein ou évaluation de la fibrose hépatique). De plus, le geste clinique de palpation nécessite un contact physique direct et ne peut donc concerner que les organes ou tissus superficiels. En revanche, certaines techniques d'élastographie permettent également l'accès à des organes plus profonds (Gennisson et coll., 2010). D'un point de vue physique, les techniques d'élastographie s'attèlent à quantifier le module de Young (E) d'un tissu (*i.e.*, sa raideur) qui est défini comme la constante de la loi de Hooke permettant de relier la contrainte (σ) à la déformation (ε) d'un tissu :

$$\sigma = E.\varepsilon$$

L'élastographie repose principalement sur deux étapes : (i) une phase d'excitation (force extérieure) du tissu d'intérêt afin d'induire une contrainte et (ii) une phase d'acquisition où l'on mesure les déformations engendrées par la contrainte. L'excitation (*i.e.*, la force extérieure) nécessaire pour induire la déformation du tissu peut être statique (ou quasi-statique), ou dynamique (Gennisson et coll., 2013). Dans le cas de **l'élastographie quasi-statique**, la contrainte est appliquée par l'investigateur par l'intermédiaire de la sonde échographique et la déformation est calculée entre la situation de repos (image de référence) et la situation sous contrainte (image comprimée) par corrélation bidimensionnelle des images échographiques. La déformation est ainsi représentée dans l'image finale à travers d'un élastogramme aussi appelé en anglais « *strain image* ». Cette technique à l'avantage d'être simple à mettre en place et rapide mais elle ne permet qu'une mesure qualitative de la raideur du tissu car la contrainte à l'intérieur du milieu n'est pas connue, rendant ainsi la mesure imprécise. La mesure est donc investigateur-dépendante et permet uniquement l'évaluation des tissus superficiels. Les techniques d'**élastographie dynamiques** permettent toutes des mesures quantitatives et

reposent sur l'excitation du tissu par une brève impulsion mécanique ou ultrasonore. Ces perturbations se propagent dans le tissu en ondes mécaniques, appelées ondes de compression et ondes de cisaillement. Les ondes de compression se propagent très rapidement dans le tissu (~1500 $m.s^{-1}$) et permettent de l'imager, cependant ces ondes ne donnent pas de renseignement sur les propriétés mécaniques du tissu. Les ondes de cisaillement se propagent plus lentement (1 à 50 $m.s^{-1}$) et sont reliées au module de young (*i.e.*, la raideur). L'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement semble être la technique permettant le plus de possibilités car elle permet d'investiguer les tissus à différentes profondeurs sur une surface relativement large et de manière temporelle (plusieurs images par seconde). Brièvement, des faisceaux ultrasonores focalisés, appelés « *pushs* » ou « cône de mach », sont générés par le réseau de transducteurs contenus dans la sonde (Bercoff et coll., 2004). Chaque « *push* » ne dure que quelques millisecondes et génère une vibration à différentes profondeurs dans le tissu d'intérêt (**Figure 11**). Ces vibrations se propagent dans le tissu en ondes de cisaillements, perpendiculairement au sens de propagation des « *pushs* » (**Figure 11**). Immédiatement après la génération de ces ondes de cisaillement, une séquence d'imagerie ultrasonore ultrarapide est générée afin d'acquérir des données radiofréquences successives à une fréquence très élevée (jusqu'à 20 000 images par seconde). Ces images permettent de calculer la vitesse de propagation des ondes de cisaillement dans une région d'intérêt du tissu (**Figure 11**).

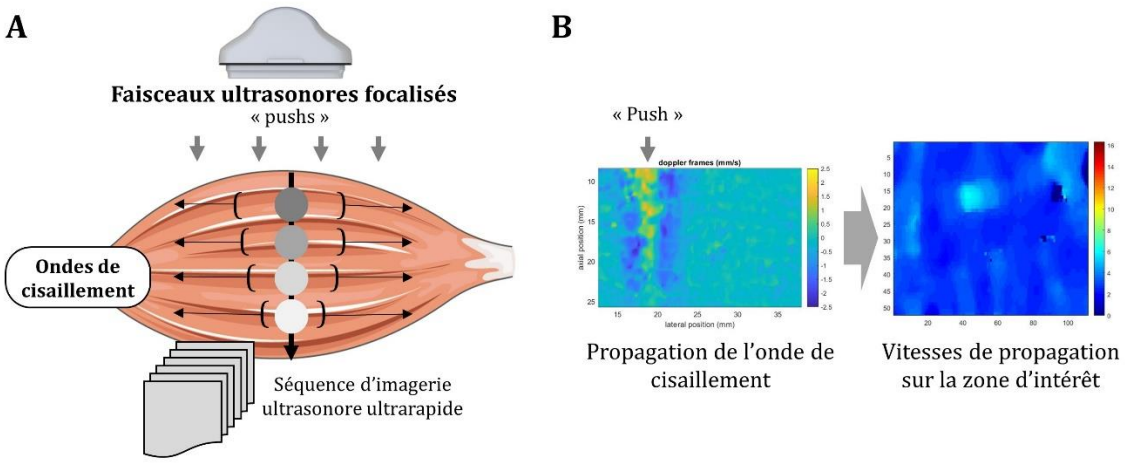


Figure 11. Représentation de l'acquisition d'une image par élastographie par onde de cisaillement. *(A) La sonde émet des faisceaux ultrasonores (« pushs ») focalisés en regard du muscle qui se propagent en ondes de cisaillements. Une séquence d'imagerie ultrasonore ultrarapide permet de suivre la propagation de l'onde de cisaillement. (B) L'image de gauche représente un « push » quelques instants (0.25ms) après son émission, avant qu'il se propage perpendiculairement. L'image de droite représente les vitesses de propagation sur la zone d'intérêt.*

La vitesse de propagation des ondes de cisaillement est directement corrélée au module de cisaillement du tissu (μ en kPa) (Bercoff et coll., 2004). Le μ est calculé de la manière suivante :

$$\mu = \rho . Vs^2$$

où ρ est la densité du tissu (*e.g.*, 1000kg.m^{-3} pour le muscle) et Vs^2 correspond à la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement (en m.s^{-1}). Dans ce travail de thèse, le μ est directement interprété comme un indice de raideur (*i.e.*, élasticité) puisqu'il est directement proportionnel au module de Young (E) selon la formule suivante :

$$E = 3 . \mu$$

L'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement permet donc de mesurer la raideur des tissus biologiques et se distingue des autres techniques d'élastographie par sa capacité à évaluer cette raideur de manière quantitative et en temps réel (Gennisson et coll., 2013).

b. Applications et contraintes méthodologiques

Depuis son introduction, l'élastographie a trouvé de nombreuses applications, notamment pour la détection de cancers du sein (Carlsen et coll., 2015), de la prostate (Tyloch et coll., 2018), ou de pathologies du foie (Xiao et coll., 2017). Cette technique permet aussi une mesure fiable et reproductible de la raideur musculaire (Lacourpaille et coll., 2012), bien que différents aspects techniques soient à prendre en compte lorsque l'on souhaite quantifier la raideur du muscle par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement (Creze et coll., 2018). Premièrement, l'organisation tissulaire du muscle strié squelettique en fait un tissu anisotrope (propriétés différentes selon la direction étudiée) (Gennisson et coll., 2010). Or, il a été montré que les ondes de cisaillement se propagent plus rapidement dans la direction des fibres que perpendiculairement (Eby et coll., 2013). Cependant, la technique est valide lorsque la sonde est positionnée longitudinalement à l'axe du muscle, même pour les muscles pennés (Miyamoto et coll., 2015). Deuxièmement, la pression exercée par la sonde sur la peau peut influencer la raideur du muscle (*i.e.*, augmentation de la vitesse de propagation) en raison du caractère déformable du tissu musculaire (Rominger et coll., 2018). Enfin, la mesure de raideur par élastographie semble moins robuste pour les muscles profonds car il existe un phénomène d'atténuation de la force de radiation (Bouchet et coll., 2020) et des interférences liées aux autres structures environnantes (*i.e.*, fascia, os) (Creze et coll., 2018). Il est donc nécessaire de prendre en compte ces « limites » lors de l'acquisition (*i.e.* région d'intérêt) et de l'analyse des données (*i.e.*, artéfacts).

Malgré ces limites, l'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement est une technique prometteuse et a été utilisée dans de nombreuses études pour investiguer la raideur du muscle en conditions physiologiques et pathologiques (Bouillard et coll., 2011; Lacourpaille et coll., 2015). Il a été montré que le module de cisaillement est corrélé au niveau de production de force, donnant une meilleure estimation de la force des muscles individuels par rapport à l'électromyographie (Bouillard et coll., 2011), notamment en condition de fatigue (Bouillard et coll., 2012). L'élastographie pourrait donc être un marqueur intéressant pour évaluer la capacité de production de force des muscles de manière individuelle dans des conditions physiologiques où cette capacité est diminuée (*e.g.*, fatigue, dommages musculaires). Cependant, l'elastographie ne permet pas, à l'heure actuelle, de mesurer les niveaux de raideur lors de CMV du fait de limitations techniques (Hug et coll., 2015). Pour autant, la mesure de la raideur musculaire passive au repos peut également avoir un intérêt. En effet, cette technique est sensible aux modifications de raideur induites chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (Lacourpaille et coll., 2015) ou induites par certaines conditions physiologiques telles que la fatigue (Siracusa et coll., 2019) ou les dommages musculaires (Lacourpaille et coll., 2014).

c. Elastographie et exercices excentriques

Comme spécifié auparavant (cf. § III.B.0), les dommages musculaires peuvent générer une augmentation de la raideur musculo-tendineuse par une altération de l'homéostasie du calcium ou par la tension exercée par le gonflement du muscle (*i.e.* l'œdème) sur les structures conjonctives. Par conséquent, des techniques permettant d'évaluer rapidement l'effet de l'exercice sur les différents muscles et structures (*e.g.*, tendon) semblent nécessaires pour adapter au mieux la prise en charge des dommages musculaires.

Plusieurs auteurs ont observé une augmentation de la raideur musculaire de repos mesurée par élastographie après différents types d'exercices excentriques (Agten et coll., 2017; Guilhem et coll., 2016; Lacourpaille et coll., 2014; Lacourpaille et coll., 2017; Leung et coll., 2017; Pournot et coll., 2016; Xu et coll., 2018). Lacourpaille et coll. (2017) ont montré une bonne corrélation entre l'augmentation de la raideur mesurée dans la première heure après l'exercice et la perte de force mesurée 48 h après l'exercice, suggérant que l'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement pourrait être un outil intéressant pour quantifier l'amplitude des dommages musculaires (**Figure 12**).

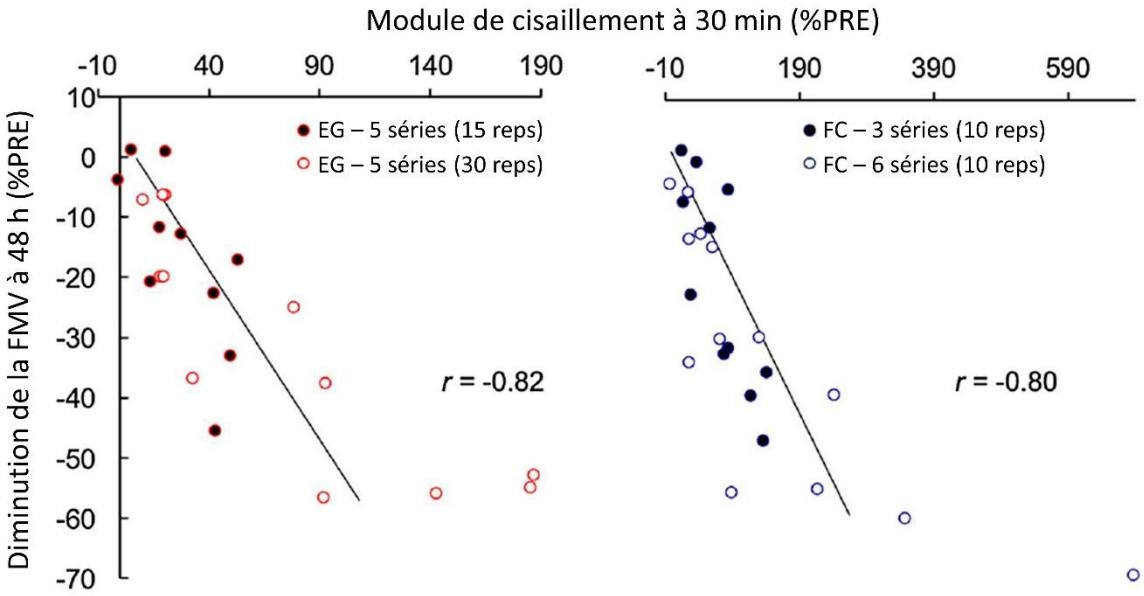


Figure 12. Corrélation entre l'augmentation du module de cisaillement mesurée 30 min après l'exercice et la diminution du moment de force maximal volontaire (FMV) mesuré 48 h après l'exercice. *Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la valeur initiale (%PRE). EG : extenseurs du genou ; FC : Fléchisseurs du coude. Adaptée de Lacourpaille et coll. (2017).*

À l'inverse, aucune augmentation de raideur musculaire n'a été observée par Andonian et coll. (2016) après la réalisation d'un ultra-marathon, connu pour induire d'importants dommages musculaires sur les quadriceps. Cette différence de résultats peut s'expliquer par la différence de modèle d'exercices ou par le fait qu'Andonian et coll. (2016) ont effectué leurs mesures dans une position où le muscle était raccourci (*i.e.*, extension complète de la jambe). En effet, Lacourpaille et coll. (2017) ont montré que la mesure n'était pas sensible à courte longueur musculaire (*i.e.*, 30° de flexion du genou ; 0° : extension complète) et qu'elle augmentait plus aux grandes longueurs musculaires en comparaison des plus courtes (110° *vs.* 90°), certainement en raison de l'augmentation de la sensibilité du calcium lorsque le muscle est étiré (Balnave & Allen, 1996; Rassier et coll., 1999). Cette différence de sensibilité à la raideur selon l'angle évalué pourrait également impacter différemment les réponses évoquées, particulièrement sensibles aux modifications de raideur. Par ailleurs, Lacourpaille et coll. (2014) ont montré que la raideur musculaire mesurée par élastographie était augmentée 1 h après l'exercice, et cela en l'absence d'œdème. Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de la raideur musculaire observée les heures et les jours suivant l'exercice induisant des dommages musculaires serait principalement due à l'altération de l'homéostasie du calcium, même si l'apparition d'un œdème pourrait également participer à cette augmentation à 48 h (Lacourpaille et coll., 2014). De plus, plusieurs études (Heales et coll., 2018; Lacourpaille et coll., 2017; Xu et coll., 2019) ont montré que la raideur musculaire pouvait être différemment

affectée au sein d'un groupe musculaire, probablement en raison des différences anatomiques entre les muscles (*i.e.*, architectures musculaires, muscles mono- *vs.* bi-articulaires) et de leur fonction dans l'exercice réalisé.

Lacourpaille et coll. (2014) ont également observé que la raideur musculaire de repos mesurée par élastographie restait plus élevée que la valeur initiale jusqu'à 21 jours après l'exercice excentrique (+14 ± 19 %). Cette augmentation a été interprétée comme une adaptation rapide des propriétés mécaniques du muscle en réponse à l'exercice excentrique. En effet, il a été suggéré qu'un remodelage des protéines du cytosquelette (*e.g.*, desmine) et de la matrice extracellulaire (*e.g.*, collagène) pourrait induire une augmentation de la raideur musculaire et être impliqué dans l'effet protecteur conféré par l'exercice excentrique (Hyldahl et coll., 2017; McHugh, 2003). En d'autres termes, le muscle pourrait devenir plus résistant lors d'un stress mécanique subséquent. Par exemple, différents auteurs (Lau et coll., 2015; Penailillo et coll., 2015b) ont montré que des modifications du comportement des fascicules (*e.g.*, moindre élongation) et de la jonction musculo-tendineuse (*e.g.*, moindre déplacement) après un deuxième exercice excentrique pourraient être impliquées dans la moindre altération musculaire observée lorsque l'exercice est répété. Cependant, il a également été montré que la protection (*i.e.* RBE) pouvait être observée sans modification des propriétés mécaniques du muscle (Hoffman et coll., 2016). Ces divergences pourraient s'expliquer par les différents muscles investigués entre les études. En effet, les muscles peuvent être différemment étirés pendant l'exercice du fait de leurs différences anatomiques, ce qui pourrait conduire à des dommages musculaires variables entre les muscles (Maeo et coll., 2018). Comme l'amplitude de l'effet protecteur est connue pour être dépendante de l'intensité du premier exercice (Hyldahl et coll., 2017), il est possible que la protection conférée par un exercice excentrique soit différente entre les muscles impliqués. Il n'existe toutefois pas de preuve expérimentale permettant de vérifier cette hypothèse.

d. Elastographie et exercices fatigants

Si la raideur musculaire de repos mesurée par élastographie semble clairement augmenter après des exercices excentriques (Agten et coll., 2017; Guilhem et coll., 2016; Lacourpaille et coll., 2014; Leung et coll., 2017; Pournot et coll., 2016; Xu et coll., 2018) et être corrélée à la perte de force mesurée 48 h après l'exercice (Lacourpaille et coll., 2017), les modifications de raideur musculaire en réponse à un exercice fatigant semblent un peu plus controversées. Nous avons montré (Chalchat et coll., 2020; Siracusa et coll., 2019) que la

raideur de repos pouvait être diminuée après des contractions maximales isométriques répétées, tandis que d'autres (Akagi et coll., 2017; Akagi et coll., 2019) ont montré une augmentation après un maintien isométrique sous-maximal (*i.e.*, 10-20 % de la FMV). Les modifications de raideur musculaire semblent donc tâche-dépendantes et pourraient faire intervenir plusieurs mécanismes. L'augmentation de la raideur musculaire en condition de fatigue serait le résultat de l'incapacité du muscle à se relâcher complétement après un exercice fatigant (Gong et coll., 2000). Une diminution de la raideur musculaire pourrait, quant à elle, être le résultat d'une augmentation de la température du muscle après des contractions répétées. En effet, Sapin-de Brosses et coll. (2010) ont montré une diminution de la raideur musculaire avec l'augmentation de la température. Les modifications de raideur musculaire de repos mesurées par élastographie ne semblent donc pas totalement spécifiques à l'exercice excentrique et devraient donc être évaluées dans un modèle combinant fatigue et dommages musculaires (*e.g.*, course/marche en descente, marathon, etc.).

Synthèse :

La raideur musculaire de repos mesurée par élastographie semble être intéressante pour estimer précocement (*e.g.*, 30 min) la perte de force 48 h après un exercice excentrique. Cependant, cette raideur pourrait également être influencée par d'autres facteurs comme la fatigue ou des adaptations des propriétés mécaniques du muscle à la suite d'exercices pouvant induire des dommages musculaires. Par ailleurs, l'effet protecteur conféré par un exercice induisant des dommages musculaires (*i.e.* RBE) pourrait être en partie expliqué par une adaptation des propriétés mécaniques du muscle (*i.e.*, augmentation de la raideur). Les modifications de la raideur musculaire à la suite d'exercices combinant de la fatigue et des dommages musculaires, ainsi que le rôle des potentielles adaptations mécaniques induites par ces exercices devraient donc être investigués.

2. MicroARNs

a. Introduction aux microARNs

Les microARNs (miARNs) représentent une famille de petits acides ribonucléiques non codants composés de 22 nucléotides en moyenne et sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Depuis leur découverte en 1993 (Lee et coll., 1993), de nombreuses études se sont intéressées aux miARNs et le nombre de séquences répertoriées dans la base de données de référence (miRBase version 22.1 ;

http://www.mirbase.org) n'a cessé d'augmenter. Celle-ci compte actuellement 1 917 séquences de miARNs chez l'Homme parmi 38 589 réparties au sein de 271 organismes.

Les miARNs sont synthétisés au sein du noyau cellulaire et leurs séquences peuvent être localisées dans des régions intergéniques ou dans des régions génomiques codant pour des protéines. La biogénèse d'un miARN (**Figure 13**) commence par la transcription d'un miARN primaire (pri-miARN), long de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de nucléotides, sous l'action d'une ARN polymérase II/III (Winter et coll., 2009). Un pri-miARN possède, comme un ARN messager (ARNm), une coiffe 7-méthylguanosine à son extrémité 5' et une queue polyadénylée à son extrémité 3' mais a une structure en « épingle à cheveux ». Ce pri-miARN subit ensuite différentes étapes de maturation. Les structures aux extrémités 3' et 5' sont libérées du pri-miARN par un clivage sous l'action de la ribonucléase (RNAse) III Drosha et de la protéine *DiGeorge critical region 8* (DGCR8), créant une « épingle à cheveux » plus petite appelée miARN précurseur (pré-miARN). Ce pré-miARN, constitué de 60 à 80 nucléotides, est ensuite transporté du noyau vers le cytoplasme par la protéine *Exportin 5* avant d'être à nouveau clivé sous l'action de la RNAse III Dicer. Cette étape permet de libérer la boucle terminale (la « tête de l'épingle à cheveux ») et d'aboutir à un ARN double-brin de longueur mature (*i.e.*, ≈ 22 nucléotides). L'un des brins, appelé brin « *passenger* », est dégradé et laisse place au brin « *guide* » qui interagit avec la protéine AGO 2 de la famille des *argonautes* pour former un complexe multi-protéique (miRISC, mi*RNA-induced silencing complex*) permettant la régulation post-transcriptionnelle. En effet, une fois intégré dans le complexe miRISC, le miARN "guide" le complexe vers l'ARNm cible en s'appariant à des régions complémentaires. Cet appariement repose principalement sur une séquence précise du miARN appelée "*seed sequence*", localisée entre le deuxième et le huitième nucléotide de l'extrémité 5'. Même si tous les mécanismes ne sont pas parfaitement compris, l'appariement du complexe miRISC à un ARNm cible peut aboutir, en fonction du degré de complémentarité entre les deux, à une répression traductionnelle, une déadénylation ou encore à la dégradation complète (O'Brien et coll., 2018).

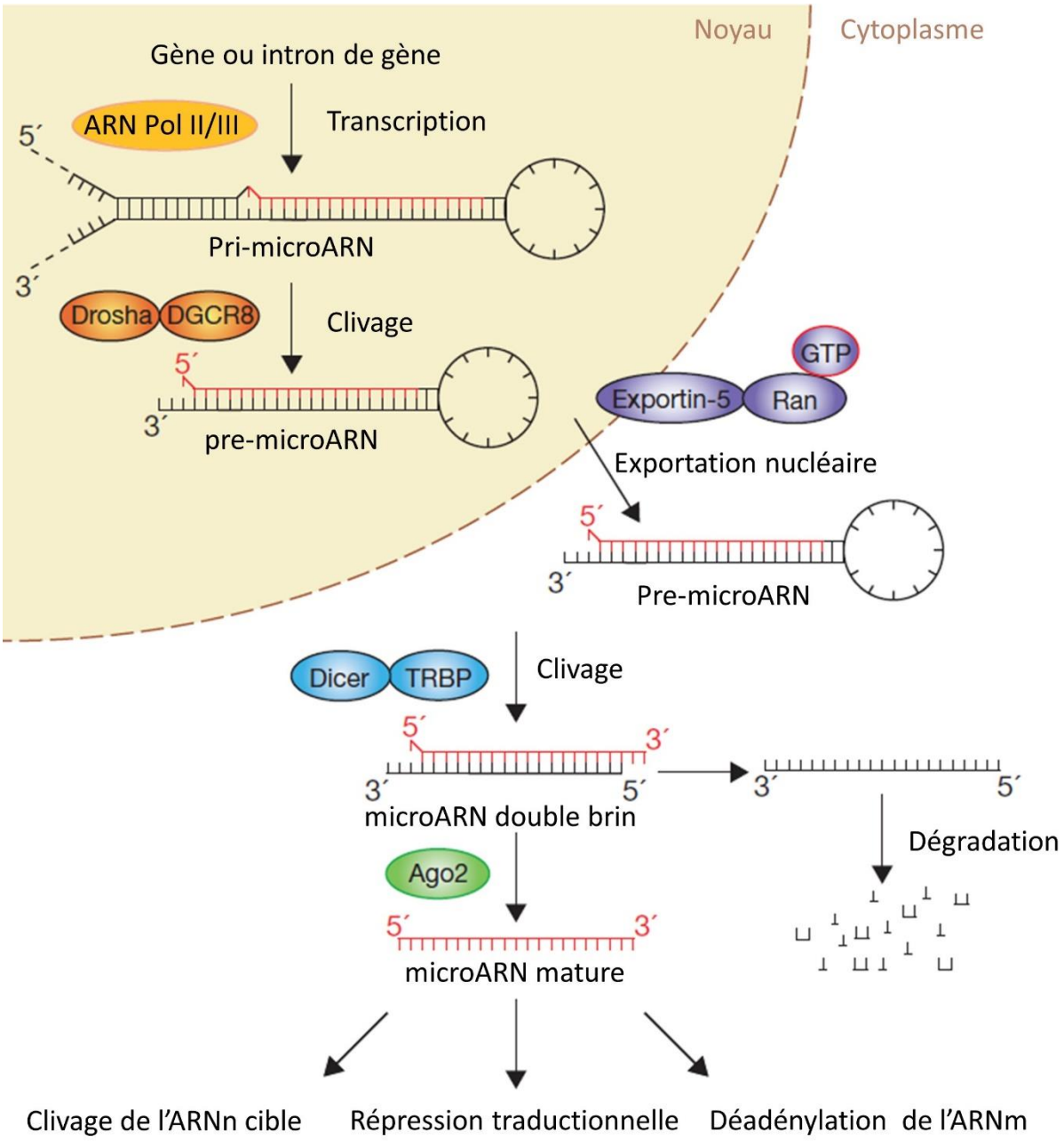


Figure 13. Voie de synthèse classique des microARNs. *Adaptée de Winter et coll. (2009)*

b. Les microARNs circulants

Les miARNs ont été observés dans différents fluides biologiques comme le plasma ou le sérum notamment, favorisant ainsi leur utilisation comme marqueurs de processus physiologiques ou pathologiques (Chen et coll., 2008; Siracusa et coll., 2016). En effet, les miARNs contenus dans les cellules peuvent être libérés vers le milieu extracellulaire par des mécanismes passifs (modification de la perméabilité membranaire) ou actifs (mécanismes de sécrétion) (Chen et coll., 2012b). Les miARNs sont principalement retrouvés dans le milieu extracellulaire sous quatre formes (voir **Figure 14**) (Turchinovich et coll., 2012).

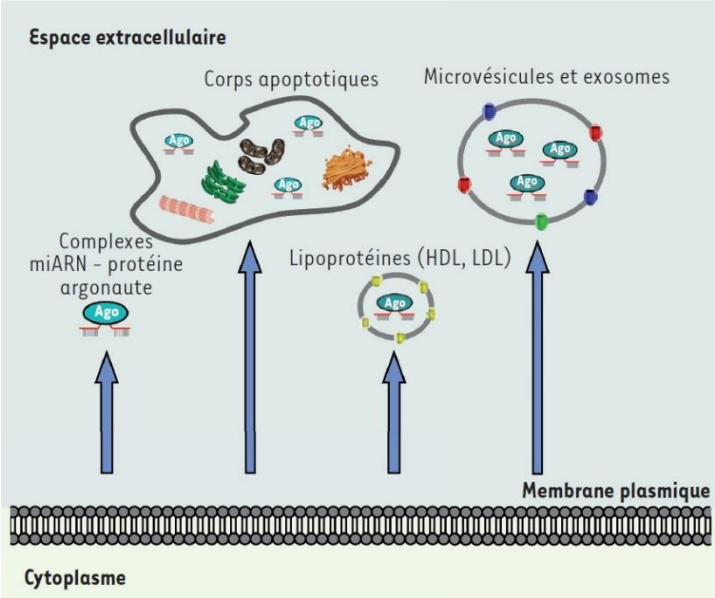


Figure 14. Exports des miARNs dans le milieu extracellulaire *(Baulande et coll., 2014)*

Certains travaux suggèrent que la forme non-vésiculaire, où les miARNs sont associés aux protéines de la famille *Argonaute*, serait majoritaire (Roberts et coll., 2013; Turchinovich et coll., 2012). Les miARNs peuvent aussi être encapsulés dans des corps apoptotiques (*i.e.*, des vésicules formées lors de la mort cellulaire) ou être transportés par des lipoprotéines de haute densité (HDL, pour *high density lipoprotein*) ou de basse densité (LDL, pour *low density lipoprotein*). Enfin, les miARNs peuvent être libérés de la cellule encapsulés dans des vésicules extracellulaires (VEs) comme les exosomes ou les microvésicules dont la taille peut varier de ~50 à ~1000 nanomètres (Mathieu et coll., 2019). Les miARNs encapsulés dans des VEs peuvent être captés par des cellules réceptrices localement (communication autocrine et paracrine) ou à distance (communication endocrine), afin d'y induire des modifications phénotypiques (Mathieu et coll., 2019).

c. Les microARNs musculaires, ou myomiRs

Parmi les nombreux miARNs décrits chez l'Homme, certains sont exprimés dans un grand nombre de tissus et sont dits « ubiquitaires ». D'autres miARNs sont exprimés principalement dans un type de tissu ou de cellules et sont dits « spécifiques ». Lee et coll. (2008) ont proposé des critères permettant de classer les miARNs en fonction de leur spécificité tissulaire. Selon ces auteurs, un miARN est « spécifique » à un tissu lorsque son expression est 20 fois supérieure à la moyenne des autres tissus. Un miARN est dit « abondant » (« *enriched* » en anglais) dans un tissu lorsque son expression est supérieure à la moyenne des autres tissus mais dans une proportion inférieure à 20 fois. Certains miARNs (miR-1, miR-133a, miR-133b,

miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-486 et miR-499) sont spécifiques du tissu musculaire et constituent la famille des « myomiRs » (Siracusa et coll., 2018). Deux d'entre eux sont considérés comme spécifiques du muscle strié squelettique (miR-133b et miR-206), tandis que miR-208a est considéré comme spécifique du muscle cardiaque.

d. MyomiRs circulants comme marqueurs indirects de dommages musculaires

Comme tout miARNs, les myomiRs peuvent être libérés dans la circulation sanguine et être mesurés dans le plasma ou le sérum. Par conséquent, de nombreuses études se sont intéressées aux myomiRs circulants de patients ou de modèles animaux souffrant de maladies neuromusculaires dans le but d'évaluer leur intérêt comme marqueurs permettant d'améliorer le diagnostic et le suivi de ces maladies. La majorité des études se sont intéressées à la DMD, une pathologie d'origine génétique qui se caractérise par l'absence de production de la dystrophine, une protéine primordiale de la liaison entre le cytosquelette de la fibre musculaire et la matrice extracellulaire. L'absence de cette protéine induit une instabilité du sarcolemme et conduit à une dégénération importante des muscles squelettiques, lisses et du myocarde. Cacchiarelli et coll. (2011) ont montré que des patients atteints de DMD présentaient des niveaux de myomiRs (miR-1, miR-133 et miR-206) dans le sérum bien plus important que ceux des sujets sains (*i.e.*, jusqu'à 100 fois plus) ou des patients atteints de la myopathie de Becker (*i.e.*, 5 à 10 fois plus), présentant des atteintes musculaires généralement moins sévères que les patients DMD (**Figure 15**). De manière intéressante, ces auteurs ont également montré que ces myomiRs circulants étaient corrélés avec la sévérité de la maladie chez des patients atteints de DMD, alors que ce n'était pas le cas pour la CK. Depuis, d'autres études ont montré l'augmentation des autres myomiRs circulants (miR-208a, miR-208b, miR-499) dans des myopathies (Li et coll., 2014; Zhang et coll., 2020).

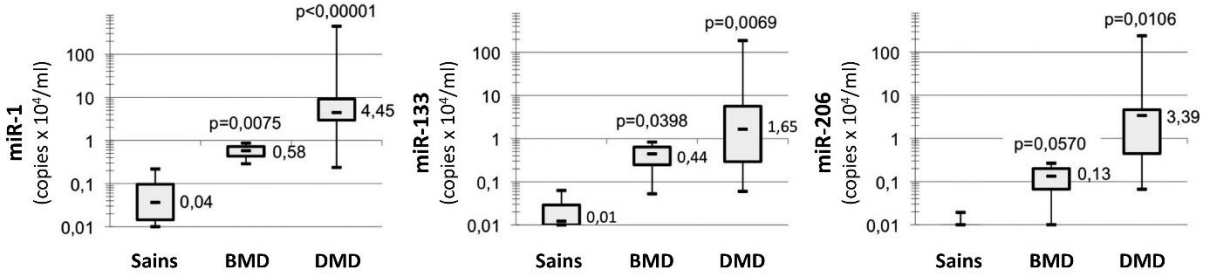


Figure 15. Comparaison des niveaux sériques de miR-1, miR-133, miR-206 chez des sujets sains, et des patients atteints de dystrophies musculaires de Becker (BMD) ou de Duchenne (DMD). *Adaptée de Cacchiarelli et coll. (2011).*

Chez des individus sains, plusieurs études ont aussi évalué l'intérêt des myomiRs comme marqueurs de dommages musculaires en réponse à des lésions aiguës (Banzet et coll., 2013; Laterza et coll., 2009; Siracusa et coll., 2016). Par exemple, une étude menée dans notre laboratoire a évalué les niveaux de myomiRs plasmatiques chez des rats après une injection de notexine, une myotoxine connue pour induire d'importants dommages musculaires (Siracusa et coll., 2016). Les résultats ont montré une augmentation très importante des myomiRs circulants dans les heures suivant l'injection (*i.e.*, 10 à 145 fois plus que dans le groupe contrôle selon les miARNs) permettant de discriminer efficacement les rats lésés des rats non lésés, avec une sensibilité et/ou une spécificité supérieure à la CK. Chez l'homme, plusieurs études ont montré une élévation importante de différents myomiRs après un marathon (Baggish et coll., 2014; Mooren et coll., 2014), exercice connu pour induire des dommages musculaires. Au sein de notre laboratoire, l'influence de dommages musculaires induits par l'exercice sur les niveaux circulants des myomiRs a également été évaluée (Banzet et coll., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont comparé un exercice de 30 min de marche sur un tapis roulant avec une pente positive (effort à forte composante concentrique) ou négative (effort à forte composante excentrique connu pour induire des dommages musculaires). Les résultats ont montré que les myomiRs présentaient des niveaux circulants plus importants après l'exercice en descente, suggérant que les myomiRs pourraient être de bons marqueurs de dommages musculaires (**Figure 16**).

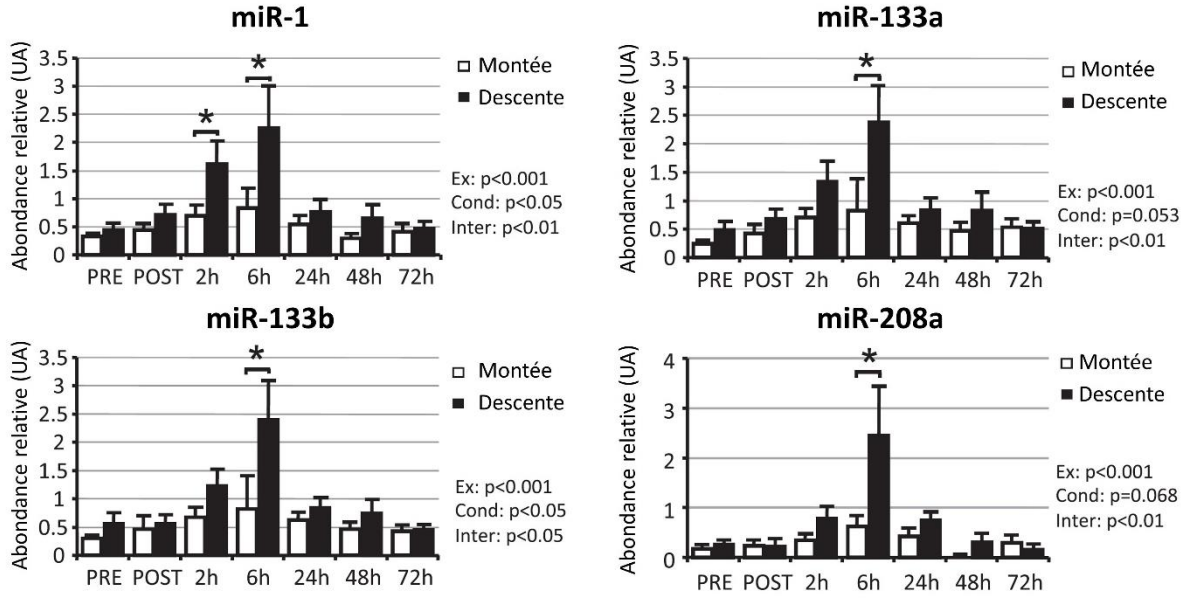


Figure 16. Comparaison des niveaux plasmatiques de miR-1, miR-133a, miR-133b et miR-208b avant (PRE), après (POST) et 2, 6, 24, 48, 72 h (2 h, 6 h, 48 h, 72 h) après un exercice concentrique (blanc) et un exercice excentrique (noir). *Adaptée de Banzet et coll. (2013).*

Pour autant, le niveau de certains myomiRs circulants a également été augmenté après des exercices à forte composante concentrique, ce qui ne permet pas d'exclure un effet métabolique ou mécanique de la contraction musculaire sur la libération de myomiRs dans la circulation sanguine. Par exemple, Ramos et coll. (2018) ont montré que les niveaux circulants de miR-1 et miR-133a étaient d'autant plus importants que l'intensité et la durée de la course pied étaient importantes, les auteurs suggérant que ces myomiRs pourraient avoir un rôle dans les adaptations physiologiques à l'exercice. Finalement, si Cacchiarelli et coll. (2011) ont montré que les niveaux de myomiRs circulants pouvaient être proportionnels à la sévérité de maladies neuromusculaires, aucune étude n'a montré la proportionnalité aux dommages musculaires en réponse à des lésions aigües. Mooren et coll. (2014) ont effectué des corrélations entre le niveau de certains myomiRs circulants et l'activité de la CK après un marathon, mais cette approche semble peu valide puisque l'activité de la CK ne permet pas de quantifier correctement le niveau de dommages musculaires (cf. § III.B.6.a). La relation entre les niveaux des myomiRs circulants et la diminution de la capacité de production de force au-delà de 24 h devrait donc être évaluée.

Synthèse :

Les miARNs sont de petits acides ribonucléiques non codants composés de 22 nucléotides en moyenne et sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Certains miARNs (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-486 et miR-499) sont spécifiques du tissu musculaire et constituent la famille des « myomiRs ». Ces miARNs peuvent être libérés de la cellule vers le milieu extracellulaire par des mécanismes actifs ou passifs lors de la lésion des cellules musculaires et peuvent être mesurés dans le sang. Une augmentation des myomiRs circulants a été observée dans différents modèles de lésions musculaires mais leur sensibilité au niveau de dommage musculaire induit par l'exercice reste à évaluer. La relation entre le niveau circulant des myomiRs et la diminution de la capacité de production de force au-delà de 24 h n'est actuellement pas connue.

IV. Objectifs et hypothèses

Dans ce travail de thèse, l'altération de la fonction neuromusculaire mesurée au-delà de 24 h après la fin de l'exercice est considérée comme le « *gold standard* » (*i.e.*, la référence) pour quantifier l'amplitude des dommages musculaires. Au-delà de la quantification des dommages, ce marqueur est un indicateur de la capacité fonctionnelle des individus. Comme il est important d'évaluer comment l'exercice est susceptible d'impacter la fonction au-delà de 24 h, l'objectif principal de la thèse est d'évaluer l'intérêt de « nouveaux » marqueurs (microARNs circulants et raideur musculaire mesurée par élastographie) pour prédire l'amplitude de la perte prolongée (> 24 h) de fonction neuromusculaire après des exercices induisant des dommages musculaires. Nous faisons l'hypothèse que ces marqueurs permettent d'évaluer de manière précoce l'amplitude de la perte prolongée de la fonction neuromusculaire.

A. Objectif préliminaire

Malgré le nombre important de marqueurs indirects utilisés pour évaluer les dommages musculaires, leur utilité pour quantifier l'amplitude et la cinétique de récupération des dommages musculaires fait toujours l'objet de débats car leurs réponses ne convergent pas toujours. L'objectif était donc de caractériser l'amplitude et la cinétique de récupération des marqueurs indirects de dommages musculaires les plus utilisés dans la littérature, et d'évaluer comment ces marqueurs sont susceptibles d'être utilisés pour évaluer la perte prolongée de fonction neuromusculaire.

Pour répondre à ces objectifs, un travail préliminaire de revue systématique avec méta-analyses (**étude 1**) a été réalisé. Ce travail repose sur le recueil d'un grand nombre de données issues de 141 études ayant évalué la fonction neuromusculaire en conjonction avec d'autres marqueurs de dommages musculaires après des exercices à forte composante excentrique. L'objectif de cette étude était de diminuer la variabilité présente dans la littérature en utilisant une approche de classification en sous-groupes (*i.e.*, clustering) proche de celle proposée par Damas et coll. (2016). Dans cette étude, les auteurs ont effectué une stratification d'un grand nombre de réponses (n = 286) à un exercice excentrique en les regroupant en fonction de la plus grande perte de force mesurée au-delà de 24 h. Cela permettait de réduire la variabilité interindividuelle et d'identifier les cinétiques de récupération de différents marqueurs (douleurs musculaires, CK, amplitude de mouvement articulaire, circonférence du membre) en fonction du niveau de dommage musculaire. Comme la disparité des réponses de ces marqueurs peut s'expliquer en partie par une variabilité interindividuelle importante (âge, sexe, statut

d'entraînement, etc.), la nature de l'exercice, les groupes musculaires impliqués dans l'exercice et le nombre limité de l'échantillon (Damas et coll., 2016; Paulsen et coll., 2012), l'approche proposée permet également d'identifier les facteurs (*e.g.*, modalités d'exercice, caractéristiques des individus) impliqués dans la perte prolongée de fonction neuromusculaire.

B. Objectifs principaux

1. MicroARNs circulants

Le premier objectif de notre travail expérimental était d'évaluer l'intérêt des myomiRs circulants pour refléter l'amplitude de la perte prolongée (> 24 h) de fonction neuromusculaire après des exercices induisant des dommages musculaires. Une première étude de terrain (**étude 2**) a permis de répondre à cet objectif en utilisant un modèle de course d'ultra-endurance (*i.e.*, 24 h de course à pied), connu pour induire d'importantes altérations de la fonction neuromusculaire dans les jours qui suivent l'exercice. Une autre étude complémentaire réalisée en laboratoire (**étude 3a**) a permis de répondre à cet objectif en utilisant l'effet protecteur (*i.e.*, le « repeated bout effect ») comme modèle permettant d'induire une réduction du niveau de dommages musculaires au décours d'un deuxième exercice réalisé deux semaines plus tard. Nous avons émis l'hypothèse que les myomiRs circulants allaient augmenter après les exercices induisant des dommages musculaires et qu'ils seraient représentatifs du niveau de perte prolongée de la fonction neuromusculaire de façon précoce (*i.e.*, dans les premières heures suivant l'exercice). Nous avons également émis l'hypothèse que les myomiRs circulants seraient moins augmentés après un deuxième exercice excentrique par rapport au même exercice réalisé deux semaines plus tôt.

2. Raideur musculaire mesurée par élastographie

Le second objectif était d'évaluer si l'amplitude et la cinétique de récupération de la raideur musculaire mesurée par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement étaient différemment affectées après deux exercices excentriques effectués à deux semaines d'intervalle. Afin de répondre à cet objectif (**étude 3b**), le modèle utilisé était identique à l'**étude 3a**. Nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de la raideur musculaire mesurée par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement serait réduite et persisterait moins après un deuxième exercice excentrique par rapport au même exercice réalisé deux semaines plus tôt. Nous avons également fait l'hypothèse que le premier exercice excentrique pourrait conférer une protection contre les dommages musculaires pouvant être induit par le second exercice

effectué deux semaines après, en raison d'une augmentation à long terme de la raideur musculaire.

C. Objectif méthodologique

Les altérations de la fonction neuromusculaire après des exercices excentriques sont généralement évaluées par la diminution du moment de FMV et de ces composantes (*i.e.*, centrale et périphérique). Ces altérations sont généralement évaluées à l'aide d'un dynamomètre et de stimulations artificielles des nerfs moteurs (Millet et coll., 2011a) à un angle articulaire (*i.e.*, une longueur musculaire) spécifique. Cependant, la dépendance à la longueur des réponses neuromusculaires pourrait être modifiée après la réalisation d'un exercice induisant des dommages musculaires (Byrne et coll., 2001; Child et coll., 1998; Philippou et coll., 2003; Saxton & Donnelly, 1996). Différents facteurs au niveau de la sensibilité au calcium (Edwards et coll., 1977; Roszek et coll., 1994) et des propriétés mécaniques de l'ensemble muscle-tendon (Howell et coll., 1993; Maffiuletti et coll., 2016) pourraient être impliqués, et pourraient induire une moindre altération des paramètres de la fonction neuromusculaire aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes (Prasartwuth et coll., 2006).

L'objectif est donc d'investiguer si les réponses évoquées artificiellement sont différemment affectées par l'angle articulaire après un exercice induisant des dommages musculaires. Pour répondre à cet objectif, nous avons évalué la fonction neuromusculaire et ses composantes par la mesure de différents paramètres des réponses évoquées électriquement avant et les heures/jours suivant un exercice à forte composante excentrique (**étude 3c**). Nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle les réponses évoquées seraient moins affectées à grande longueur par rapport à courte longueur, et que les mécanismes explicatifs pourraient se situer au niveau des tissus musculaires et tendineux.

Partie 2. Matériels et méthodes

I. Organisation générale des travaux de thèse

Dans ces travaux de thèse, différentes études ont été menées pour répondre aux objectifs (**Tableau 1**).

	Objectifs	Modèle	Paramètres investigués
Étude 1	Caractériser l'amplitude et la cinétique de récupération des marqueurs indirects de dommages musculaires les plus utilisés dans la littérature, et évaluer comment ces marqueurs sont susceptibles d'être utilisés pour évaluer la perte prolongée de fonction neuromusculaire.	Revue systématique et méta-analyses. Données issues de 141 études expérimentales ayant utilisé un modèle induisant des dommages musculaires.	• FMV • Hauteur de saut • Amplitude de mouvement • Douleurs musculaires • Circonférence du membre • Réponses évoquées • T_2 mesuré par IRM • CK, Mb, LDH, Il-6
Étude 2	Évaluer l'intérêt des myomiRs circulants pour refléter l'amplitude de la perte prolongée de fonction neuromusculaire.	Ultra-marathon de 24 h de course à pied chez des athlètes élites.	• Hauteur de saut • Douleurs musculaires • CK, Mb • MyomiRs
Étude 3a	Évaluer (1) comment les myomiRs circulants sont modifiés par le RBE et (2) si ces myomiRs circulants peuvent prédire l'amplitude de la perte prolongée de fonction neuromusculaire.	Deux exercices de marche en descente espacés de 2 semaines : • Durée : 45 min • Vitesse : 4,5 $km.h^{-1}$ • Pente : -25 % • Charge : 30 % de la MC	• FMV • CK, Mb • MyomiRs
Étude 3b	Évaluer si l'amplitude et la cinétique de récupération de la raideur musculaire mesurée par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement étaient différemment affectées après deux exercices excentriques effectués à deux semaines d'intervalle.		• FMV • Réponses évoquées • Douleurs musculaires • CK • Amplitude articulaire • Circonférence du membre • Architecture musculaire • Module de cisaillement du muscle
Étude 3c	(1) Investiguer si les réponses évoquées artificiellement sont différemment affectées par l'angle articulaire après un exercice induisant des dommages musculaires. (2) Identifier les mécanismes associés.	Un exercice de marche en descente : • Durée : 45 min • Vitesse : 4,5 $km.h^{-1}$ • Pente : -25 % • Charge : 30 % de la MC	• FMV • Angle optimal • Réponses évoquées • Module de cisaillement du muscle • Raideur de l'aponévrose • Douleurs musculaires

Tableau 1. Organisation générale des études expérimentales. *FMV : force maximale volontaire ; T_2 : temps de relaxation transversale ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; CK : créatine kinase ; Mb : myoglobine ; LDH : Lactate déshydrogénase ; MC : masse corporelle.*

Ce travail de thèse s'articule donc autour de cinq études (**études 1, 2, 3a, 3b, 3c**). L'**étude 1** est une revue systématique avec méta-analyses. L'**étude 2** s'appuie sur un modèle de course d'ultra-marathon. Les **études 3a, 3b et 3c** sont issues d'un même travail expérimental s'appuyant sur un modèle de marche en descente avec port de charge (**Figure 17**). À noter que les **études 3a** et **3b** reposent sur l'entièreté de l'**étude 3**, alors que l'**étude 3c** repose uniquement sur le premier exercice.

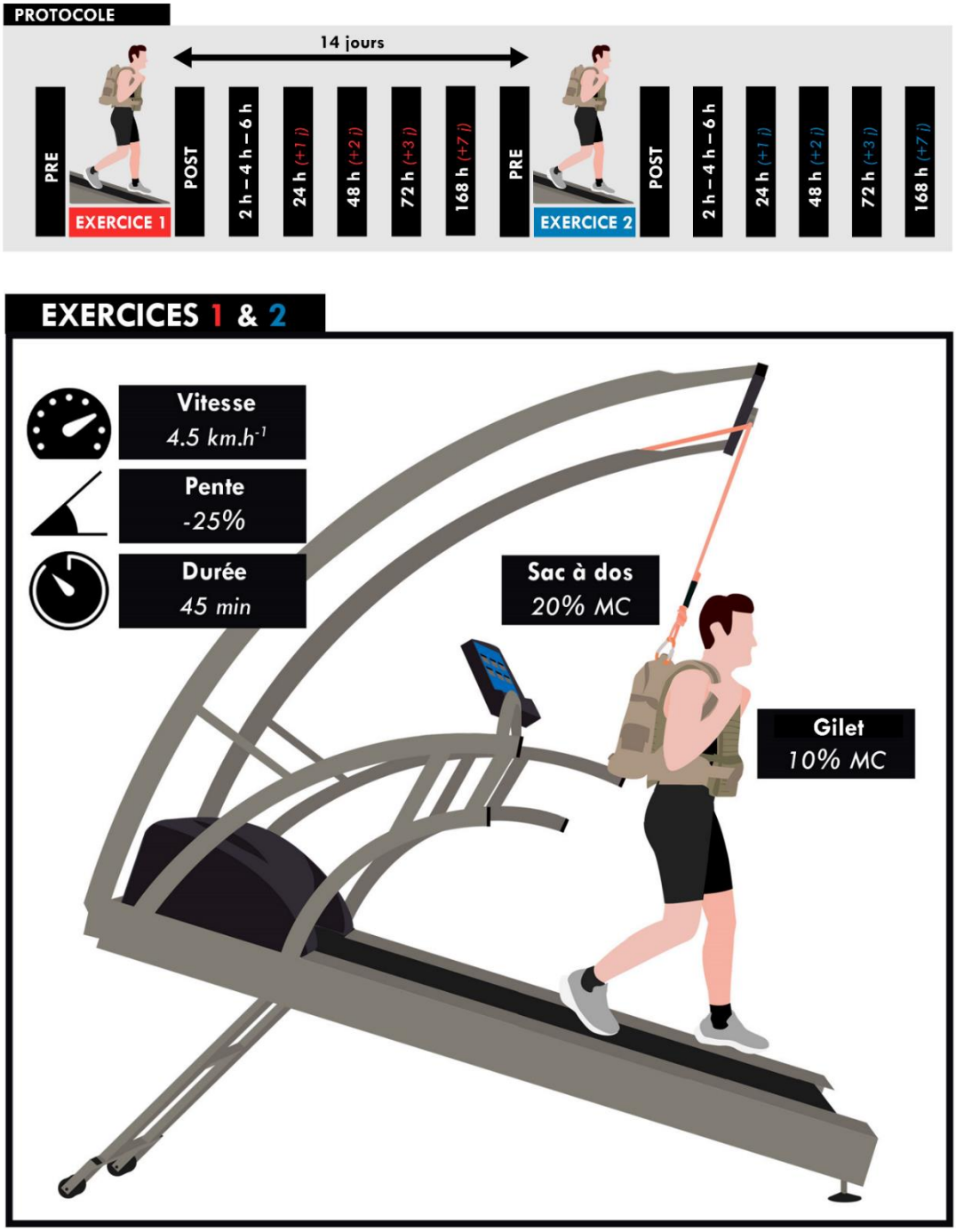


Figure 17. Design expérimental de l'étude 3. *Les participants ont effectué deux exercices de marche en descente séparés par 14 jours sur un tapis roulant pendant 45 min (pente : -25 % ; vitesse : 4,5 km/h) en portant une charge équivalente à 30 % de la masse corporelle (MC). Différentes mesures ont été effectuées avant (PRE), après (POST) et 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h (7 jours) après ces deux exercices.*

II. Procédures expérimentales

A. Anthropométrie

La taille (± 0.01 m) a été mesurée à l'aide d'une toise tandis que la masse corporelle (± 0.01 kg) et le pourcentage de masse grasse ont été mesurés à l'aide d'une balance à impédancemétrie (MC-780MA, Tanita Corporation, Tokyo, Japon). L'indice de masse corporelle a été calculé en divisant la masse corporelle par la taille au carré ($kg.m^{-2}$).

B. Moment de force à l'articulation du genou

Le moment de force net à l'articulation du genou a été évalué à l'aide d'un dynamomètre isocinétique (Cybex Norm, Lumex, Ronkonkoma, NY, Etats-Unis). Lors de la mesure, les participants étaient confortablement assis dans le siège du dynamomètre isocinétique avec un angle de hanche de 70° (0° étant la position allongée) (**Figure 18**).

Figure 18. Position d'un sujet lors de l'évaluation de la fonction neuromusculaire. *L'angle de hanche est fixé à 70° (0° étant la position allongée). A noter que la sonde échographique est positionnée sur le muscle rectus femoris à l'aide du dispositif USONO (Eindhoven, Pays-Bas).*

L'axe de rotation du dynamomètre était aligné avec les condyles fémoraux et le bras de levier était attaché 1 à 2 cm au-dessus de la malléole avec une bande velcro. Toutes les mesures ont été effectuées sur la jambe droite avec un angle de genou fixé à 90° (0° = extension totale). Dans l'**étude 3c**, les mesures ont également été effectuées à 40° et 120°. Les moments de force étaient corrigés par rapport au moment résultant du poids du membre au repos. Les données ont été numérisées et exportées à une fréquence de 2 kHz à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique (Powerlab 16/35 ; ADInstrument, NSW, Australie) et du logiciel Labchart pro 8.1 (ADInstrument, NSW, Australie).

C. Stimulation électrique du nerf fémoral

La stimulation électrique d'un nerf périphérique est utilisée pour évaluer de manière non-invasive les composantes centrale (*i.e.*, nerveuse) et périphérique (*i.e.*, musculaire) de la fonction neuromusculaire d'un groupe musculaire (Millet et coll., 2011a). Au cours des **études 3b et 3c**, des stimulations électriques percutanées (rectangulaires, durée : 1 ms, tension : 400 V) ont été délivrées au niveau du nerf fémoral à l'aide d'un neurostimulateur (Digitimer DS8R, Welwyn Garden City, Grande-Bretagne) (**Figure 19**).

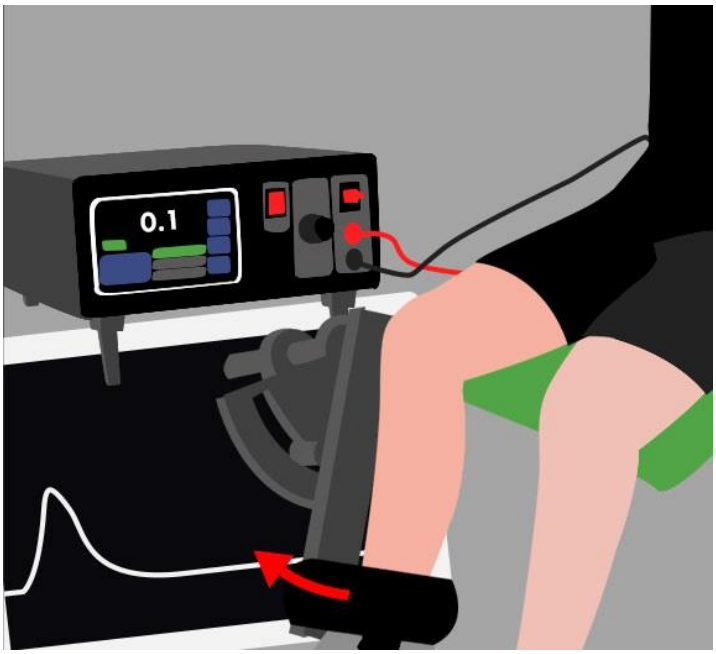


Figure 19. Représentation schématique de la configuration permettant de délivrer des stimulations électriques au niveau du nerf fémoral

Le stimulateur était connecté à une cathode carrée (5 × 5 cm ; Axelgaard manufacturing, Fallbrook, Etats-Unis) appliquée sur la peau au niveau du triangle fémoral et à une anode rectangulaire (5 × 9 cm ; Axelgaard manufacturing, Fallbrook, Etats-Unis) appliquée au niveau de la fosse glutéale. L'intensité de stimulation était comprise entre 65 et 260 mA et correspondait à une intensité de 130 % de l'intensité optimale (*i.e.*, l'intensité à partir de laquelle la secousse musculaire non potentialisée atteint sa valeur maximale et commence à plafonner). Cette intensité a été déterminée à partir d'une courbe de recrutement construite à partir de l'amplitude des secousses musculaires non potentialisée induites par des stimulations simples délivrées toutes les 5 s à différentes intensités (de 40 à 200 mA) (**Figure 20**).

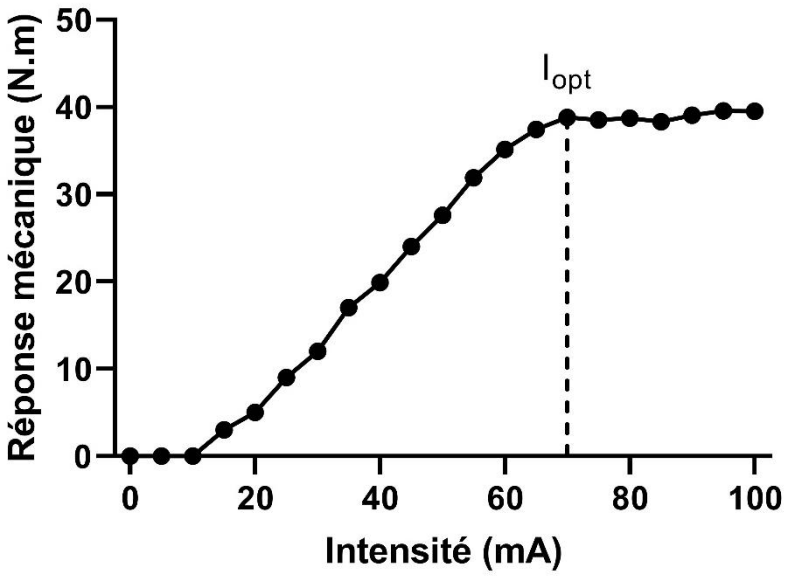


Figure 20. Représentation d'une courbe de recrutement d'un individu. *La réponse mécanique correspond à la valeur pic de la secousse musculaire évoquée par une stimulation simple au repos. L'intensité optimale (I_{opt}) correspond à l'intensité à laquelle la réponse mécanique atteint sa valeur maximale et commence à plafonner.*

D. Évaluation globale de la fonction neuromusculaire

1. Contraction maximale volontaire des extenseurs du genou

Dans ces travaux de thèse, le moment de force maximal au cours d'une CMV des extenseurs du genou est interprété comme une mesure de la FMV que peuvent produire les extenseurs du genou. Au cours de chaque CMV, les participants étaient fortement encouragés par les investigateurs et avaient comme consigne de tenir les poignées latérales du siège pour stabiliser leur bassin et éviter tout mouvement parasite. Les CMV étaient effectuées deux fois (repos : 2 min) et le meilleur des deux essais était conservé.

2. Hauteur de saut

Dans ces travaux de thèse, la hauteur de saut a été mesurée lors d'un counter-movement jump (CMJ) à l'aide de cellules photoélectriques Optojump (Microgate, Bolzano, Italie) et était interprétée comme une mesure globale de la fonction (*i.e.*, puissance) musculaire des membres inférieurs. Au cours du CMJ, les participants avaient comme consignes de garder leurs mains sur leurs hanches et de sauter le plus haut possible (**Figure 21**). Ils avaient deux essais pour atteindre la meilleure performance (*i.e.*, la meilleure hauteur de saut). La meilleure performance a été utilisée pour les analyses ultérieures.

Figure 21. Représentation schématique de l'évaluation de la hauteur de saut à l'aide des cellules photoélectriques Optojump (Microgate, Bolzano, Italie).

E. Évaluation des composantes de la fonction neuromusculaire

1. Paramètres de la composante périphérique

Au cours de nos travaux expérimentaux, la composante périphérique de la fonction neuromusculaire a été évaluée à partir des réponses des mécaniques évoquées par stimulation électrique du nerf fémoral (cf. § IV.C). L'amplitude de cette réponse après une stimulation simple au repos (*i.e*. secousse musculaire) reflète les capacités contractiles du muscle et/ou le couplage excitation-contraction (Millet et coll., 2012). Des stimulations doubles évoquées au repos à différentes fréquences (10Hz et 100Hz) ont également été utilisées afin d'investiguer plus en détail les origines de la fatigue périphérique. La réponse au doublet à haute fréquence (Db100) est généralement interprétée comme un marqueur des propriétés contractiles du muscle, tandis que le rapport entre la réponse du doublet à basse fréquence et celle du doublet à basse fréquence (Db10/Db100) est interprété comme un marqueur du couplage excitation-contraction (Millet et coll., 2011a). L'amplitude de la secousse musculaire (**Figure 22**), a également été évaluée 3 à 5 secondes après une CMV afin de normaliser l'effet de la potentialisation, qui a un effet confondant sur l'évaluation des altérations neuromusculaires (MacIntosh, 2010). En effet, la potentialisation est définie comme un état transitoire, survenant après une contraction, expliqué par la phosphorylation des chaines légères de myosine rendant l'interaction actine-myosine plus sensible au calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique. Ceci a pour conséquence d'augmenter la vitesse de production de la force et le niveau de force développé. La potentialisation (ou PAP, pour « *post-activation potentiation* » dans la littérature

internationale) peut être évaluée par le rapport entre l'amplitude d'une secousse musculaire potentialisée (Tw_p pour *potentiated twitch*) et l'amplitude d'une secousse musculaire non-potentialisée (*i.e.*, sans contraction préalable ; Tw) : PAP = Tw_p/Tw. Enfin, le RTD de la secousse musculaire potentialisée a été calculé comme la pente de la relation entre le moment de force et le temps. La pente est calculée entre le début du développement de la force (5 % du pic) jusqu'au pic de moment de force survenant après une stimulation électrique simple au niveau du nerf fémoral. Cette mesure rend compte de la capacité du muscle à se contracter rapidement (Maffiuletti et coll., 2016).

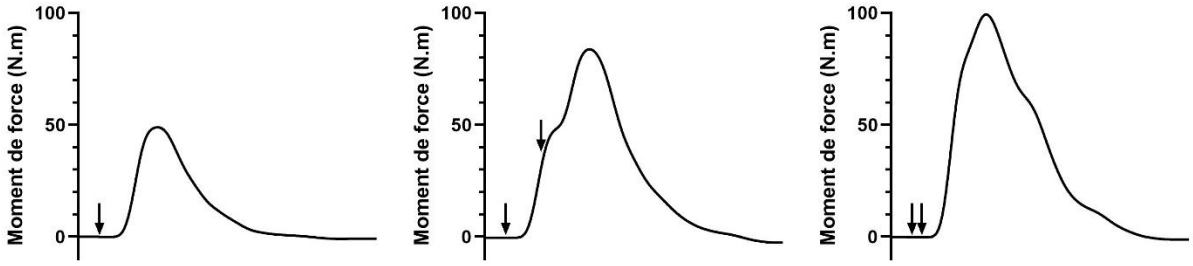


Figure 22. Exemple d'une secousse musculaire (à gauche), et de doublets à basse (au milieu) et haute (à droite) fréquences. *Les flèches représentent les instants auxquels les stimulations électriques ont été délivrées au niveau du nerf fémoral.*

2. Paramètres de la composante centrale

Lors des CMV, le moment de force maximale produit peut être limité par l'incapacité de l'individu à activer la totalité de ses unités motrices. Ce déficit d'activation représente l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production de force situés en amont de la jonction neuromusculaire (Gandevia, 2001) et est généralement quantifié par la technique de secousse surimposée (Merton, 1954). Cette technique consiste à évoquer une contraction par stimulation électrique du nerf moteur (cf. § IV.C) à une intensité supra-maximale au cours d'une CMV et au repos lorsque le muscle est relâché. La première stimulation (**Figure 23**) permet d'évoquer une secousse musculaire appelée « surimposée » et correspond au moment de force évoqué par les unités motrices qui n'ont pas été recrutées volontairement par l'individu. La seconde stimulation (**Figure 23**) est effectuée au repos, 3 secondes après la fin de la contraction volontaire, et permet d'évoquer la secousse musculaire potentialisée.

Le rapport entre les amplitudes de ces deux doublets appelé « niveau d'activation volontaire » (NAV) et est calculé de la façon suivante :

$$NAV = \left(\frac{1 - secousse\ surimposée \text{ à } 100\ Hz}{secousse\ potentiée \text{ à } 100\ Hz}\right) \times 100$$

où le NAV est exprimé en pourcentage (%) et les secousses surimposée et potentialisée à 100 Hz correspondent aux amplitudes des secousses évoquées par une stimulation double à 100 Hz.

Le NAV reflète la proportion d'unités motrices activées puisqu'une valeur à 100% (*i.e.*, secousse surimposée nulle) correspondrait à l'activation maximale des unités motrices.

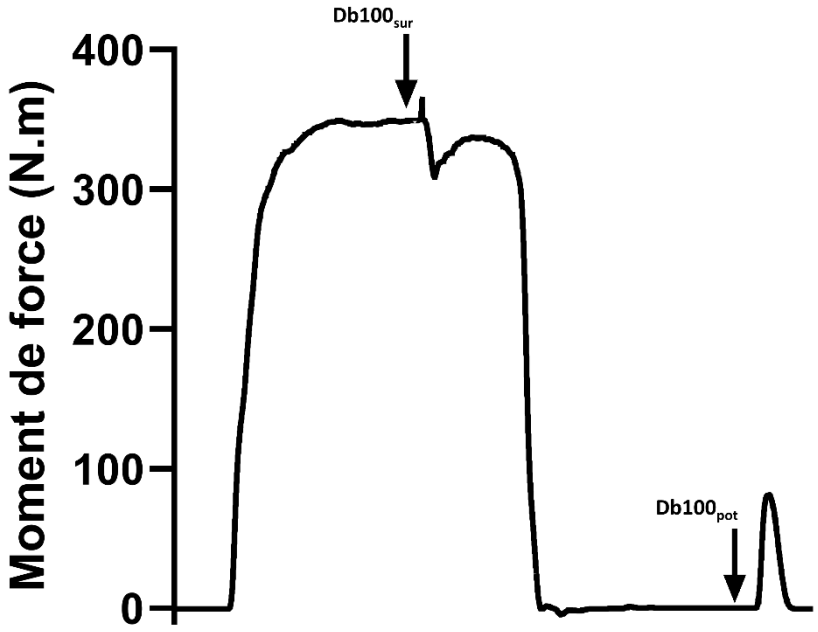


Figure 23. Représentation de la technique de secousse surimposée lors d'une contraction maximale volontaire d'un individu. *Les secousses surimposées ($Db100_{sur}$) et potentialisée ($Db100_{pot}$) sont évoquées respectivement lorsque la force maximale volontaire est atteinte et lorsque le muscle est relâché (3 secondes après la fin de la contraction volontaire).*

F. Angle optimal de production du moment de force

L'angle optimal pour la production du moment de force maximal, généralement appelé « angle optimal », a été déterminé au cours de trois CMV concentriques consécutives réalisées à 120°.s^{-1} sur une amplitude articulaire allant de 20 à 120° (0° : extension complète). L'angle du genou pour lequel le couple moyen des trois contractions a atteint son maximum a été considéré comme l'angle optimal, comme décrit précédemment par Brockett et coll. (2001).

G. Amplitude de mouvement

L'amplitude de mouvement a été mesurée à l'aide d'un goniomètre manuel (± 1°) au niveau de l'articulation du genou. Le participant était allongé sur le ventre de façon à ce que l'angle de hanche soit fixé à 0° de flexion et que le fémur soit stabilisé pour éviter tout mouvement. Le goniomètre était centré sur l'épicondyle latéral du fémur droit. La partie proximale du goniomètre était placée le long du fémur en utilisant le grand trochanter comme référence et la partie distale était placée le long de la fibula en utilisant la malléole latérale

comme référence. La position de départ était fixée at 0° (*i.e.*, extension complète du genou) et l'amplitude de mouvement était mesurée lorsque l'investigateur amenait lentement le genou en flexion. Au cours de la mobilisation articulaire, la valeur était relevée lorsque le participant signalait l'apparition de douleur au niveau des quadriceps (**Figure 24**). Les mesures ont été effectuées six fois sur la jambe droite et la valeur moyenne de la cinquième et de la sixième mesure a été utilisée pour les analyses ultérieures pour prendre en compte l'effet de la thixotropie musculaire (Lakie & Campbell, 2019). En effet, une raideur subsiste au niveau musculaire après une période de repos, mais peut être réduite lorsque le membre est mobilisé. L'amplitude de mouvement au niveau du genou est interprétée comme un marqueur de la raideur du système musculo-tendineux des extenseurs du genou, même si elle peut être influencée par la peau, les tissus sous-cutanés, et la conformation articulaire (Warren et coll., 1999).

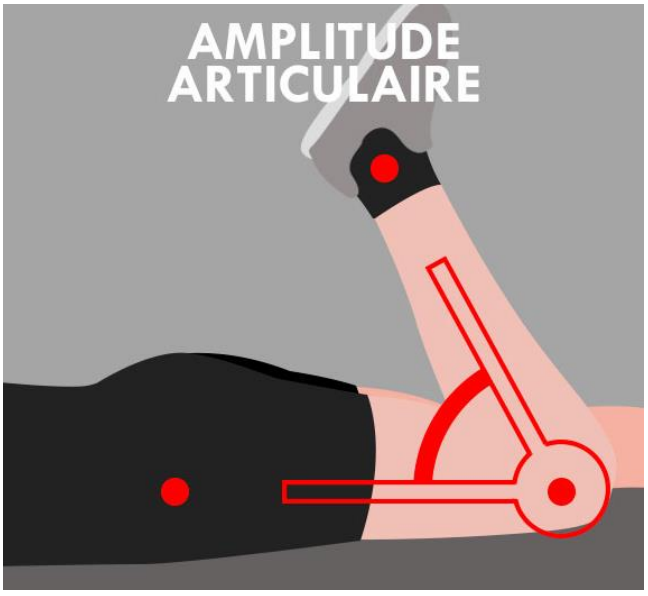


Figure 24. Représentation schématique de l'évaluation de l'amplitude de mouvement articulaire.

H. Douleurs musculaires

Les douleurs musculaires ont été évaluées à l'aide d'une échelle visuelle analogique (EVA) de 100 mm (**Figure 25**) représentant une « absence de douleur » à une extrémité (0 mm) et une « douleur maximale imaginable » à l'autre extrémité (100 mm). Les participants avaient pour consigne de coter la douleur musculaire des quadriceps à l'aide du marqueur de l'EVA (**Figure 25**) après la réalisation d'un squat effectué sur une amplitude de 90°.

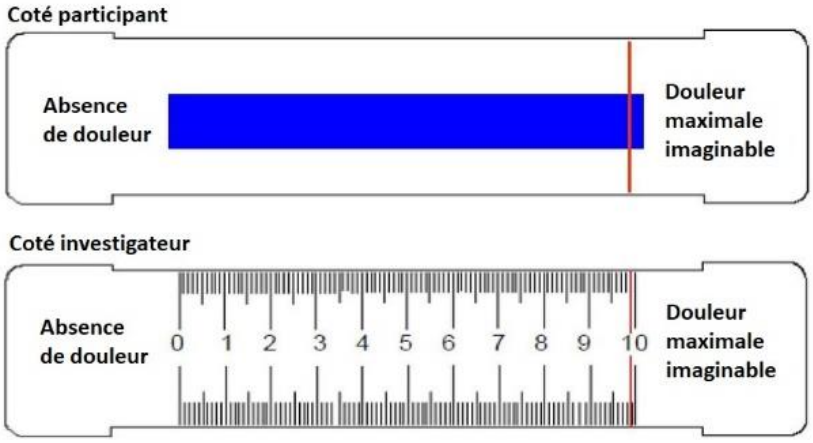


Figure 25. Échelle visuelle analogique permettant de quantifier la douleur. *L'échelle comporte un côté où le participant cote la douleur (en haut) et un côté où l'investigateur relève la valeur de cette douleur en millimètres (en bas).*

I. Seuil de pression de la douleur, ou « *pain pressure threshold* » (PPT)

Un algomètre (NOD, OT Bioelettronica, Turin, Italie) avec une tige en plastique rigide recouverte d'une surface en caoutchouc d'une surface de 1,0 cm² et une échelle allant de 0 à 500 kPa a été utilisé pour mesurer le seuil de pression de la douleur musculaire (PPT) (**Figure 26**). Les participants ont été évalués en position assise avec le genou placé à 90° de flexion (0° = extension complète), et avaient pour consigne de relâcher complètement leurs muscles. La pression a été appliquée verticalement sur la partie médiale des muscles RF et VL avec une augmentation constante de 50 kPa par seconde. Les participants avaient pour consigne de dire « stop » au moment où « la sensation de pression se transforme en douleur au niveau musculaire ». Deux mesures ont été effectuées pour chaque muscle à un intervalle de 60 s. La moyenne de ces deux mesures a été utilisée pour les analyses ultérieures.

Figure 26. Représentation schématique de l'algomètre (NOD, OT Bioelettronica,, Turin, Italie) positionné au niveau du muscle rectus femoris de la cuisse droite.

J. Circonférence de la cuisse

La circonférence a été mesurée sur la portion médiane de la cuisse (*i.e.*, le milieu entre le grand trochanter et l'épicondyle latéral du fémur) lorsque le participant était en position debout avec les pieds espacés à une largeur équivalente aux épaules. La cuisse a été marquée d'une ligne horizontale à l'aide d'un marqueur permanent et la mesure a été effectuée à l'aide d'un mètre ruban (± 0.1 cm) (**Figure 27**). La circonférence de la cuisse était interprétée comme un marqueur de gonflement du muscle.

Figure 27. Représentation schématique de l'évaluation de la circonférence de la cuisse

K. Architecture musculaire

L'épaisseur musculaire et l'angle de pennation des muscles RF et VL a été évaluée par échographie (Aixplorer version 12.2 ; Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) à partir de trois images en mode B effectuées lorsque le participant était installé sur le dynamomètre isocinétique avec un angle de genou de 90° (0° = extension complète). Les images en mode B ont été exportées et analysées *a posteriori* à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.42, National Institute of Health, Bethesda, MA, Etats-Unis). L'épaisseur musculaire a été évaluée comme la longueur (en cm) entre l'aponévrose superficielle et profonde. Cette épaisseur a été calculée au niveau des parties distales, médiane et proximale de l'image en mode B et la valeur moyenne de ces trois longueurs a été utilisée pour l'analyse statistique. L'angle de pennation a été évalué comme l'angle (en °) entre l'aponévrose profonde et l'orientation des fascicules musculaires.

L. Marqueurs sanguins

1. Prélèvements

Le sang a été prélevé dans la veine antécubitale dans deux tubes différents (5 mL, Becton Dickinson vacutainer, Franklin Lakes, Etats-Unis). Au cours de l'**étude 2**, le premier tube contenait de l'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) et le second de l'héparine de lithium. Au cours de l'**étude 3**, le premier tube contenait de l'EDTA et le second tube permettait la séparation de sérum (SST pour « *serum separating tube* »).

Au cours de l'**étude 2**, le sang était conservé à 4°C (< 1 h) jusqu'à ce que le plasma soit centrifugé (2000 g, 4°C, 10 min). Le plasma issu du tube contenant de l'héparine de lithium a été utilisé dans les 2 h pour les analyses biochimiques (CK et Mb), et le plasma issu du tube contenant de l'EDTA a été aliquoté et congelé à -20°C pour l'analyse des miARNs.

Au cours de l'**étude 3**, le tube SST a été laissé 30 min à température ambiante puis centrifugé (2000 g, 4°C, 10 min). Le tube contentant de l'ETDA a été centrifugé immédiatement après le prélèvement (2000 g, 4°C, 10 min). Le plasma a ensuite été prélevé en se tenant à l'écart de l'interface formée pas les globules rouges et les plaquettes. Une seconde centrifugation (2000 g, 4°C, 10 min) a été réalisée afin d'éliminer les éventuelles contaminations par les globules rouges ou les plaquettes. Le sérum et le plasma issus respectivement des tubes SST et EDTA étaient ensuite aliquotés et congelés à -80°C jusqu'à l'analyse ultérieure. Le sérum permettait l'analyse de la CK et de la Mb tandis que le plasma était utilisé pour l'analyse des miARNs.

2. Analyse de l'activité de la créatine kinase et de la concentration de la Myoglobine

L'activité de la CK et la concentration de la Mb ont été analysées par électrochimiluminescence avec l'automate Cobas c501 (RocheDiagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) du centre hospitalier d'Albi pour l'**étude 2**, et par immunoturbidimétrie avec l'automate Advia 1800 (Siemens Healthineers, Erlangen, Allemagne) de l'Unité Analyses Biologiques de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) pour l'**étude 3**.

3. Analyse des miARNs

Les niveaux plasmatiques de différents miARNs ont été quantifiés dans ce travail de thèse : homo sapiens (hsa)-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR208b-3p, hsa-miR-378a-3p, and hsa-miR-499a-5p. Ces miARNs ont été

choisis en raison de leur expression spécifique au tissu musculaire (Lee et coll., 2008) et de leur augmentation observée après une lésion musculaire toxique (Siracusa et coll., 2016) et des dommages musculaires induits par l'exercice (Baggish et coll., 2014; Banzet et coll., 2013; Mooren et coll., 2014).

a. Extraction des ARNs du plasma

L'extraction des ARNs a été effectuée à partir de 200 µL de plasma avec le kit mirVana Paris (Ambion, Austin, Etats-Unis) qui combine une étape d'extraction organique et une étape de purification sur des colonnes anioniques. De plus, une étape de précipitation a été réalisée en fin de protocole afin d'optimiser la quantité et la pureté des ARNs extraits. Les détails du protocole sont présentés dans l'**annexe 1**.

b. *Reverse transcription*, synthèse des ADN complémentaires

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc), ou *reverse transcription* (RT) des ARNs extraits du plasma a été effectuée avec le kit miRCURY LN RT (Qiagen, Courtaboeuf, France) à partir d'un volume de 5 µL d'ARNs dilué au 1/6ème dans un volume de réaction de 10 µL contenant :

- 2 µL de *reaction buffer*
- 1 µL d'*enzyme mix*
- 0,5 µL d'*UniSp6 Spike-in*
- 1,5 µL de *Nuclease-free water*

Le kit utilisé est adapté à la synthèse d'ADNc à partir d'ARNs de petites tailles. La première étape permet de fixer une queue poly-A à l'extrémité 3' du miARN mature. Lors de la seconde étape, l'ADNc est synthétisé avec une queue poly-T possédant un ancrage dégénéré à son extrémité 3' et un *tag* universel à son extrémité 5' (**Figure 28**). Les détails du protocole utilisé pour la synthèse des ADNc sont présentés dans l'**annexe 2**.

Figure 28. Schéma de la synthèse des ADNc avec le kit miRCURY LN RT (Qiagen, Courtaboeuf, France). *(A) Une queue poly-A est ajoutée à l'extrémité 3' du miARN mature ; (B) l'ADNc est ensuite synthétisé avec une amorce poly-T possédant un ancrage dégénéré à son extrémité 3' et un tag universel à son extrémité 5'. Figure adaptée de la documentation du fabricant.*

c. PCR quantitative en temps réel

La réaction en chaine par polymérase quantitative en temps réel, ou « *real-time quantitative polymerase chain reaction* » (RT-qPCR) est une technique basée sur l'amplification cyclique de l'ADNc. L'amplification repose sur l'utilisation d'une ADN polymérase et d'amorces spécifiques à l'ADN que l'on souhaite quantifier. La RT-qPCR consiste en la succession de cycles comportant trois différentes étapes : 1) la dénaturation : l'ADNc se sépare progressivement en double brin ; 2) l'hybridation : les amorces spécifiques se fixent aux brins d'ADNc ; 3) l'amplification : l'ADN polymérase amplifie le brin d'ADN complémentaire à la séquence cible.

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le système commercialisé par Qiagen (Courtaboeuf, France) dont les amorces (ou *primers*) sont optimisées pour la mesure des ARNs de petites tailles. La séquence sens se fixe sur l'extrémité 3' de l'ADNc et la séquence antisens se fixe à la fois sur le tag universel, la queue poly-T et l'extrémité 5' de l'ADNc (**Figure 29**). Les amorces Qiagen intègrent des bases nucléotidiques LNA (*i.e.*, *Locked Nucleic Acid*) dont le cycle ribose est bloqué dans une conformation N (*North*) par un pont méthylène. Cette conformation stabilise la structure de l'ADN, permettant d'augmenter la température d'hybridation (60°C), et donc la sensibilité et la spécificité des amorces pour leur cible. Ces propriétés permettent de s'affranchir, au moins en partie, des amplifications non spécifiques dues à la petite taille et la grande similarité des séquences des miARNs.

La détection de l'amplification de l'ADNc repose sur l'utilisation de SYBR green, un intercalant de l'ADN émettant une fluorescence lorsqu'il est intégré dans une molécule ADN (**Figure 29**). La quantification de la fluorescence permet de déterminer la quantité d'ADN à chaque cycle. Cette quantité est évaluée par un cycle de quantification (Cq) qui correspond au cycle où la fluorescence émise par l'ADN cible dépasse significativement le niveau basal de fluorescence (*i.e.*, le bruit de fond).

Dans ce travail de thèse, la RT-qPCR a été effectuée sur un LightCycler 480 à 96 puits (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) avec 4 µL d'ADNc (dilué au 1/40 dans de l'eau stérile), 1 µL d'amorces et 5 µL de SYBR Green Master Mix (Qiagen Courtaboeuf, France) dans un volume de réaction de 10 µL. Le protocole consistait en un cycle d'activation (95°C, 2 min), 52 cycles d'amplification (dénaturation : 95°C, 10 s ; hybridation/amplification : 56°, 1 min). La valeur du Cq était automatiquement calculée par la méthode du maximum de la dérivée seconde à l'aide du logiciel LightCycler 480 version 1.5.1 (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). Avant la mesure des miARNs, un contrôle qualité pour l'extraction et

la *reverse transcription* a été effectué. Ce contrôle consistait en une mesure individuelle de hsa-miR-103a-3p et de l'ARN synthétique UniSp6. Les échantillons dont le Cq était > 32 pour hsa-miR-103a-3p et > 20 pour UniSp6 étaient soumis à une nouvelle étape de *reverse transcription*. Si cette étape ne permettait pas d'obtenir un Cq inférieur ou égal à ses seuils, les ARNs étaient à nouveau extraits.

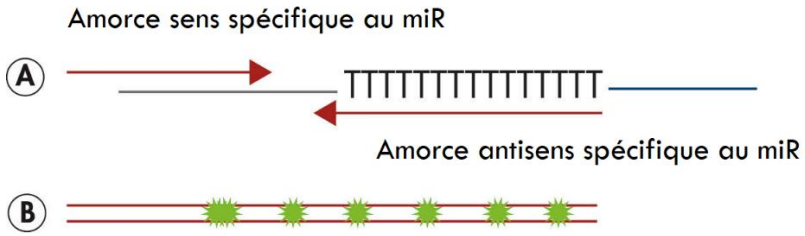


Figure 29. Schéma de l'amplification des ADNc avec le kit miRCURY LN RT (Qiagen, Courtaboeuf, France). *(A) Une amorce sens se fixe à l'extrémité 3' de l'ADNc et l'amorce antisens se fixe à la fois sur le tag universel, la queue poly-T et l'extrémité 5' de l'ADNc ; (B) La détection de l'amplification est ensuite réalisée grâce à la détection du SYBR green, qui émet une fluorescence lorsqu'il est contenu dans un ADN double brin. Figure adaptée de la documentation du fabricant.*

d. Normalisation des résultats de RT-qPCR

La normalisation des résultats de la RT-qPCR pour les miARNs d'intérêt (*i.e.*, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR208b-3p, hsa-miR-378a-3p, and hsa-miR-499a-5p) est essentielle pour réduire la variabilité due aux nombreuses étapes analytiques (*i.e.*, extraction, RT et RT-qPCR). Comme proposé par Vandesompele et coll. (2002), la normalisation des miARNs d'intérêt a été effectuée à l'aide de plusieurs miARNs de référence sélectionnés parmi des miARNs connus pour être relativement abondants et stables dans le sang (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-210-3p, and hsa-miR-320a-3p). La sélection des miARNs de référence a été effectuée à l'aide de geNorm (Vandesompele et coll., 2002), un algorithme permettant d'évaluer la stabilité des miARNs en comparant deux à deux les différents miARNs mesurés. La méthode utilisée par ce logiciel permet également d'identifier le nombre optimal de miARNs de référence pour assurer une normalisation robuste. La moyenne géométrique des Cq des miARNs de référence était ensuite utilisée pour quantifier une abondance relative des miARNs d'intérêt selon la formule suivante :

$$\text{Abondance relative} = 1{,}9^{\text{Cq miARNs de référence - Cq miARN d'intérêt}}$$

M. Elastographie et imagerie ultrarapide

1. Acquisition des données

Dans ce travail de thèse, un échographe ultrarapide (Aixplorer version 12.2 ; Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) relié à un réseau de transducteurs linéaires (SuperLinear 15-4 ; Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) a été utilisé. Le mode B a été utilisé pour s'assurer que le transducteur était aligné avec la direction des faisceaux musculaires. L'alignement du transducteur était considéré comme correct lorsque les fascicules musculaires et l'aponévrose étaient visibles sur l'image sans interruption. La sonde était placée en regard des muscles *rectus femoris* (RF) et *vastus lateralis* (VL) au niveau des ventres musculaires, où l'épaisseur musculaire était la plus importante. La sonde (*i.e.*, le transducteur) était fixée sur la peau à l'aide d'un dispositif permettant des réglages à 360° (USONO, Eindhoven, Pays-Bas) afin d'augmenter la fiabilité de la mesure (**Figure 18**). En effet, ce dispositif permet d'éviter tout mouvement qui pourrait affecter la position et l'orientation de la sonde, et d'éviter une pression excessive appliquée sur le muscle. La position de la sonde a été marquée sur la peau à l'aide d'un marqueur permanent pour assurer le même positionnement tout au long de l'expérimentation. La région d'intérêt (*i.e.*, la région où la propagation des ondes de cisaillement est analysée) était placée au milieu de l'image en mode B, sous l'aponévrose superficielle au niveau des ventres musculaires de RF et VL. La position de la région d'intérêt a été repérée à l'aide de l'image en mode B lors de la visite de familiarisation afin de s'assurer de garder la même région d'intérêt tout au long de l'expérimentation. Des séquences d'acquisition élastographiques ont été réalisées au repos pendant 5 s (fréquence d'échantillonnage d'environ 1-2 Hz) pour les muscles RF et VL, avec l'articulation du genou positionnée à un angle de 40°, 90° et 120° (0° = genou complètement étendu). Par ailleurs, des séquences ultrarapides ont été délivrées au cours de stimulations électriques simples afin de suivre le déplacement de l'aponévrose des muscles VL et RF aux différents angles de genou. Brièvement, l'échographe envoyait une impulsion logique transistor-transistor afin que le stimulateur électrique délivre une stimulation simple. Ensuite, le stimulateur envoyait à son tour une impulsion logique transistor-transistor. Le délai entre les deux signaux (~ 200 ms) a été enregistré et utilisé pour synchroniser les données de FMV et les images échographiques. Au cours des évaluations, les participants avaient pour consigne de se détendre autant que possible afin d'éviter toute contraction musculaire pouvant altérer la mesure.

2. Analyse des données

a. Module de cisaillement musculaire

Les données brutes des vitesses de propagation des ondes de cisaillement de la région d'intérêt ont été exportées à l'aide du pack recherche disponible sur la version 12.2 de l'échographe (Aixplorer, Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France). Les données ont ensuite été analysées à l'aide d'un script MATLAB (MathWorks, Natick, MA, États-Unis) développé dans notre laboratoire. Brièvement, les valeurs vides (égales à 0 $m.s^{-1}$) et saturées (supérieures à 16,32 $m.s^{-1}$) de la région d'intérêt étaient retirées et la valeur moyenne de la région d'intérêt était ensuite calculée pour toutes les séquences acquisitions (~5-8 images). Les valeurs moyennes de ces différentes séquences d'acquisition étaient ensuite moyennées afin de calculer le module de cisaillement μ (kPa) :

$$\mu = \rho . Vs^2$$

où ρ est la densité du tissu (*e.g.*, 1000$kg.m^{-3}$ pour le muscle) et Vs^2 correspond à la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement (en $m.s^{-1}$).

Dans l'**étude 3b**, comme décrit précédemment par Lacourpaille et coll. (2017), la pente de la relation entre le μ musculaire et l'angle articulaire du genou entre 90° et 120° a été calculé à chaque temps de mesure (PRE, POST, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 7 jours) et interprété comme un indice d'augmentation du μ (exprimé en %PRE). Cet indice nous a permis de comparer l'augmentation de μ entre les muscles VL et RF quelle que soit leur longueur relative (Lacourpaille et coll., 2017).

b. Raideur de l'aponévrose

À partir des signaux radiofréquence enregistrés pendant la contraction évoquée, 1 000 images en mode B ont été reconstruites pendant une période de 1 s. Toutes les mesures d'imagerie ultrarapide ont été transférées sur un poste de travail et analysées à l'aide d'un script MATLAB développé dans notre laboratoire et par le fabricant. La fréquence d'images élevée (1000 images/s) nous a permis de suivre le déplacement de l'aponévrose profonde des muscles RF et VL le long de l'axe longitudinal pendant toute la contraction évoquée électriquement. La raideur de l'aponévrose a été quantifiée comme la pente de la relation entre le moment de force évoqué et le déplacement de l'aponévrose, obtenue par régression linéaire entre 5 % du pic de la secousse musculaire et la valeur pic de cette dernière.

N. Indice de protection

Afin d'évaluer l'amplitude de l'effet protecteur conféré par le premier exercice, un indice de protection (IP) a été calculé pour les symptômes de dommages musculaires (*e.g.*, paramètres NM, μ musculaire, activité de la CK, douleur musculaire, circonférence de la cuisse) en utilisant une équation adaptée de Chen et coll. (2012a): [changements relatifs par rapport à PRE après l'exercice 2 - changements relatifs par rapport à PRE après l'exercice 1] avec PRE correspondant à 100 %. Par exemple, lorsque le moment de FMV représente 70 % de la valeur PRE après le premier exercice et 90 % après le deuxième exercice, le calcul est : 90 – 70 = 20. Ce résultat indique que la diminution du moment de FMV est atténuée de 20 % après le deuxième exercice par rapport au premier. Pour autre exemple, lorsque le μ de RF représente 150 % de la valeur PRE après le premier exercice et seulement 120 % après le deuxième exercice, le calcul est : 120 – 150 = -30. Ce résultat indique que l'augmentation du μ de RF est atténuée de 30 % après le deuxième exercice par rapport au premier. L'équation a été adaptée car la version initiale de Chen et coll. (2012a) était applicable aux valeurs moyennes mais pas aux valeurs individuelles. Deux IP différents ont été calculés. Dans l'**étude 3a**, l'IP a été calculé pour l'amplitude maximale des altérations (pics). Dans l'**étude 3b**, l'IP a également été calculé pour les valeurs à 7 jours afin d'évaluer la protection sur le taux de récupération.

Partie 3. Contribution personnelle

Sous-partie 1. Évaluation des marqueurs indirects de dommages musculaires les plus utilisés dans la littérature

Malgré le nombre important de marqueurs indirects utilisés pour évaluer les dommages musculaires, leur utilité pour quantifier l'amplitude et la cinétique de récupération des dommages musculaires fait toujours l'objet de débats car leurs réponses ne convergent pas toujours. Ce manque de consensus peut s'expliquer par une variabilité interindividuelle importante (âge, sexe, statut d'entraînement, etc.), la nature de l'exercice, et le groupe musculaire impliqués dans l'exercice. Afin de mieux appréhender la complexité des réponses, une approche permettant de regrouper (*i.e.*, classification en clusters) les réponses similaires d'un grand nombre d'études pourrait être utilisée dans une revue systématique avec méta-analyses. L'objectif de cette sous-partie était donc de caractériser l'amplitude et la cinétique de récupération des marqueurs indirects de dommages musculaires les plus utilisés dans la littérature, et d'évaluer comment ces marqueurs sont susceptibles d'être utilisés pour évaluer la perte prolongée de fonction neuromusculaire.

I. Étude 1 : Évaluation de la pertinence des marqueurs indirects de dommages musculaires après des exercices excentriques des membres inférieurs : Revue systématique avec méta-analyse

Cette étude a fait l'objet d'une soumission dans *PLOS ONE* le 16/03/2022, en révision depuis le 26/04/2022 (annexe 3) :

Appropriateness of indirect markers of muscle damage following lower limbs eccentric-biased exercises: A systematic review with meta-analysis. **Chalchat E**, Gaston AF, Charlot K, Peñailillo L, Valdés O, Tardo-Dino PE, Nosaka K, Martin V, Garcia-Vicencio S, Siracusa J

A. Résumé

Objectif : L'objectif de cette revue était de (1) caractériser l'amplitude et la cinétique de récupération des marqueurs indirects de dommages musculaires induits par l'exercice en fonction du niveau de perte de force maximale volontaire mesuré 24 à 48 heures après l'exercice ($FMV_{24\text{-}48h}$), (2) identifier les facteurs (*e.g.*, caractéristiques de l'exercice et de la population) affectant le niveau de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$, et (3) évaluer la pertinence des marqueurs de dommages musculaires comme indicateurs de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$.

Méthodes : L'amplitude des modifications de chaque marqueur de dommages musculaires a été normalisée à l'aide de la méthode des différences moyennes standardisées (taille d'effet) qui permet de comparer les résultats des différentes études entre elles. La cinétique d'apparition/récupération des marqueurs a été caractérisée selon trois niveaux de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ à l'aide d'une analyse en clusters des 141 études incluses. L'association entre les niveaux de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ et les caractéristiques des participants et des exercices a été évaluée par le test du khi carré. Des méta-régressions ont été effectuées pour étudier les associations entre la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ et les modifications des marqueurs de dommages musculaires à < 6 h, 24 h, 48 h, 72 h et > 96 h après l'exercice.

Résultats : La cinétique d'apparition/récupération des marqueurs de dommages musculaires diffère entre les niveaux de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$. Le statut d'entraînement et le type/modalité d'exercice étaient associés au niveau de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ ($p < 0,05$). La perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ était corrélée aux modifications de concentration de la myoglobine (< 6 h), de la hauteur de saut (24 h) et de l'amplitude de mouvement (48 h) ($p < 0,001$).

Conclusion : Comme l'exercice peut affecter différemment les marqueurs en fonction de l'amplitude des dommages musculaires (*i.e.*, les niveaux de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$), différents marqueurs devraient être utilisés en fonction du temps de la mesure. La concentration de la myoglobine devrait être utilisée pendant les premières heures après l'exercice (< 6 h), tandis que la hauteur de saut (24 h) et l'amplitude de mouvement (48 h) pourraient se substituer à la mesure de la FMV dans les jours qui suivent. De plus, le statut d'entraînement et le type/modalité d'exercice pourraient impacter l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$.

B. Problématiques et objectifs

Les dommages musculaires induits par l'exercice se caractérisent par une réduction prolongée de la capacité de production de force/puissance, laquelle étant utilisée pour représenter l'amplitude des dommages musculaires lorsqu'elle est évaluée au-delà de 24 h après l'exercice (Paulsen et coll., 2012; Warren et coll., 1999). La réduction de la fonction neuromusculaire s'accompagne souvent d'autres symptômes, qui ont traditionnellement été utilisés pour quantifier l'amplitude des dommages musculaires. Parmi les marqueurs indirects de dommages musculaires, l'apparition de courbatures, la diminution de l'amplitude de mouvement articulaire, ainsi que l'augmentation des niveaux de CK et de Mb dans le sang sont le plus souvent rapportées (Warren et coll., 1999). Ces marqueurs de dommages musculaires sont souvent mesurés de manière concomitante pour décrire différents processus physiologiques tels que la perte de l'intégrité myofibrillaire, les lésions du tissu conjonctif, les lésions membranaires, l'altération du couplage E-C et le remodelage de la matrice extracellulaire (Clarkson & Hubal, 2002; Paulsen et coll., 2012; Warren et coll., 1999).

Warren et coll. (1999), dans les limites d'une approche de revue narrative, ont publié des recommandations dans lesquelles la mesure de la force musculaire pouvait être considérée comme le meilleur marqueur pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires dû à sa bonne fiabilité, son faible coût, son accessibilité et sa facilité d'utilisation (Abernethy et coll., 1995). Malgré le nombre important de marqueurs indirects utilisés pour évaluer les dommages musculaires, leur utilité pour quantifier l'amplitude et la cinétique de récupération des dommages musculaires fait toujours l'objet de débats, car leurs réponses ne convergent pas toujours. De nombreuses études ont mis en évidence une variabilité importante des marqueurs de dommages musculaires à la fois en termes d'amplitude et de cinétique d'apparition/récupération, ce qui limite leur interprétation (Damas et coll., 2016; Paulsen et coll., 2012). Ces divergences dans les réponses de ces marqueurs entre les participants et entre les études peuvent s'expliquer en partie par une variabilité interindividuelle importante (âge, sexe, statut d'entraînement, etc.), une taille limitée de l'échantillon, la nature de l'exercice, et les groupes musculaires impliqués dans l'exercice (Damas et coll., 2016; Paulsen et coll., 2012). Pourtant, aucune étude n'a proposé une revue de littérature s'appuyant sur une approche systématique et quantitative, ce qui ne permet pas de savoir quel(s) est (sont) le(s) meilleur(s) marqueur(s) pour évaluer les dommages musculaires. Par ailleurs, les dommages musculaires ne sont pas souhaitables au cours d'une prise en charge clinique dont le but est d'améliorer la santé. En effet, l'adhésion et le plaisir sont essentiels pour induire des changements durables

chez les patients. Dans ce contexte, il peut être très intéressant d'évaluer quantitativement comment les caractéristiques de l'exercice et de la population pourraient influencer l'amplitude et la cinétique de récupération des marqueurs indirects de dommages musculaires.

Afin de mieux comprendre la complexité des réponses aux dommages musculaires, nous avons proposé d'effectuer une revue systématique avec méta-analyses dans le but de caractériser l'amplitude et l'évolution temporelle des marqueurs indirects des dommages musculaires couramment utilisés pour différents niveaux de perte de FMV mesuré 24 à 48 heures après l'exercice ($FMV_{24\text{-}48h}$) (basé sur les valeurs de taille d'effet). Pour cela, nous avons proposé une analyse de classification en sous-groupes (clustering) comme suggéré précédemment par Damas et coll. (2016) (**Figure 8** ; **Figure 9**). Le deuxième objectif était d'identifier les facteurs tels que les caractéristiques de l'exercice et de la population pouvant affecter l'amplitude de la perte de force musculaire après l'exercice. Enfin, nous avons cherché à évaluer la pertinence des marqueurs de dommages musculaires comme indicateurs de la réduction prolongée de la fonction musculaire.

C. Procédures expérimentales

1. Recherche bibliographique

La recherche bibliographique a été effectuée sur cinq bases de données, dont Pubmed, Embase, Web of Science, Cochrane et Scopus. De plus, la recherche a été complétée avec SPORTDiscus qui contient la « littérature grise », c'est-à-dire la littérature difficile à localiser ou à récupérer (thèses et mémoires) (Moher et coll., 2015). La recherche a été effectuée pour les articles en anglais parus jusqu'au 29/10/2021 avec les termes suivants : ("muscle damage" OR "muscle injury" OR "EIMD") AND (contraction OR exercise) AND (strength OR MVC OR torque OR force OR "muscle function" OR "neuromuscular function" OR "maximal voluntary contraction") NOT ("mouse" OR "Mice" OR "rat" OR "animal"). La recherche a conduit à l'identification de 4 897 résultats (**Figure 30**).

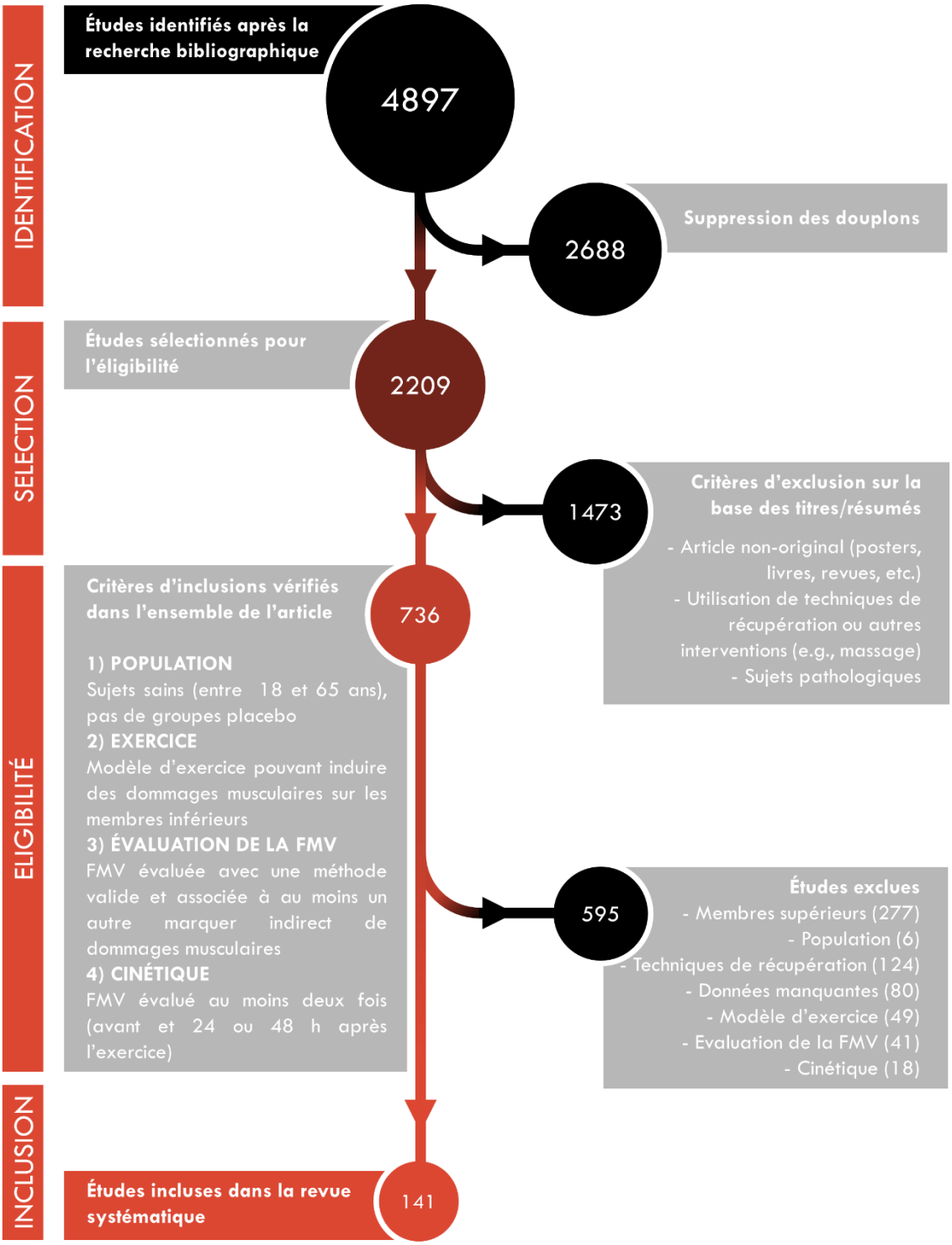


Figure 30. Organigramme représentant le processus de sélection des études de la recherche initiale jusqu'à l'inclusion.

2. Critères de sélection

Après suppression de 2 688 doublons, les titres et les résumés de 2 209 articles ont été examinés à l'aide du programme en ligne Abstrackr (URL. http://abstrackr.cebm.brown.edu/), un outil open source pour les revues systématiques (Wallace et coll., 2012). Parmi les 2 209 résumés, 1 473 articles ont été exclus lors de la première sélection sur la base des critères énumérés ci-après, réduisant le nombre d'articles à examiner intégralement à 736 articles. Les études étaient incluses si elles remplissaient les critères suivants : (1) un modèle permettant d'induire des dommages musculaires sur les membres inférieurs a été utilisé chez des adultes en bonne santé (18 à 65 ans) ; (2) un moment de force à l'articulation a été mesuré au moins à deux temps de mesures (avant et 24 ou 48 h après l'exercice), en combinaison avec l'évaluation d'au moins un autre marqueur indirect de dommages musculaires (*e.g.*, CK, amplitude de mouvement, douleurs musculaires); (3) aucune technique de récupération ou autre intervention (*e.g.*, massage, glaçage, supplémentation nutritionnelle) n'a été utilisée tout au long de l'expérimentation; et (4) les données nécessaires pour calculer les différences moyennes standardisées (SMD, pour *standardized mean differences* en anglais) (*i.e.*, la valeur absolue, l'écart type et la taille de l'échantillon) sont disponibles. Les études ont été exclues si elles présentaient des données issues d'une précédente publication. Lorsque plusieurs exercices ont été effectués dans une étude, seulement le premier a été considéré. Le protocole de l'étude a suivi les recommandations PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* ; Moher et coll. (2015)). Les critères d'exclusion sont affichés dans la **Figure 30**.

3. Recueil des données et évaluation de la qualité des études

Les études incluses (n = 141) ont été analysées par neuf examinateurs selon une répartition aléatoire. Une feuille de calcul (Excel, Microsoft, Redmond, Etats-Unis) standardisée permettait de recueillir toutes les données nécessaires à la présente étude. Les données suivantes ont été recueillies : la taille de l'échantillon, le sexe, l'âge, le niveau d'entraînement, le type d'exercice, le moment de FMV et autres marqueurs indirects de dommages musculaires à tous les points de mesures disponibles. Les données ont été extraites du texte, des tableaux ou extrapolées à partir des figures à l'aide du logiciel ImageJ (v1.51j8 ; Schneider et coll. (2012)). Lorsque des données étaient manquantes, les auteurs correspondants des études ont été contactés. Seuls les marqueurs de dommages musculaires présents dans au moins cinq études ont été inclus dans l'analyse : la hauteur de saut, l'amplitude de mouvement,

les douleurs musculaires évaluées activement et passivement, le seuil de pression de la douleur, la circonférence du membre, la réponse mécanique à la stimulation périphérique (amplitude du moment de force évoquée), le RTD, le niveau d'activation volontaire (NAV), la CK, la Mb, le LDH, l'IL-6 et le T_2 mesuré par IRM. En raison du grand nombre d'études évaluant les douleurs musculaires avec plusieurs méthodes différentes, ces réponses ont été classées en « DOMS actifs » (*i.e.*, pendant un mouvement), « DOMS passifs » (*i.e.*, sans mouvement) et PPT. La qualité des études incluses a été évaluée par les neuf examinateurs sur la base d'une checklist adaptée de celle proposée par Downs et Black (1998) (**Figure 31**).

4. Standardisation des données (codage)

Les modérateurs (*i.e.*, facteurs) suivants ont été codés : le sexe (homme, femme ou les deux), le statut d'entraînement basé sur le volume d'entraînement (sédentaire, actif, entraîné), la modalité d'exercice (contractions excentriques sur dynamomètre isocinétique, exercice excentrique/musculation, exercice pliométrique, exercice aérobie prolongé, marche/course en descente, électrostimulation neuromusculaire, etc.) et le type d'exercice (mono-articulaire, poly-articulaire). Les temps des mesures ont également été codés (< 6, 24, 48, 72, > 96 h). Les mesures précoces (*i.e.*, entre 0 et 6 h) ont été regroupées en "< 6 h", en raison du manque de consensus dans la littérature pour évaluer les marqueurs de dommages musculaires en "post-exercice". De la même manière, les mesures retardées évaluées entre 96 et 168 h ont été regroupées en "> 96 h" en raison du nombre relativement faible d'évaluations à ces temps de mesure. Chaque modérateur et chaque temps de mesure ont été codés par deux examinateurs indépendants. Tout désaccord entre les examinateurs a été discuté lors d'une réunion, puis les points non résolus ont été traités par un troisième examinateur.

5. Analyses statistiques

Pour toutes les analyses, le niveau de significativité statistique a été fixé à $p < 0,05$. La différence moyenne standardisée (Hedges, 1981) (SMD, également appelé "taille d'effet" (Faraone, 2008)) et l'erreur-type du moment de FMV et des autres marqueurs indirects dommages musculaires ont été calculés pour chaque groupe expérimental à plusieurs temps de mesure. La mesure de la SMD peut être utilisée pour comparer, entre les études, l'amplitude des modifications de mesures similaires. En effet, les modifications ne peuvent pas être directement comparées car les études peuvent différer dans leurs échelles/unités de mesure et/ou dans la précision de la mesure (Faraone, 2008). Les SMD ont été calculées de la façon suivante :

$$SMD = \frac{Moyenne_{TM} - Moyenne_{PRE}}{ET\ groupé}$$

où TM était la valeur au temps de mesure d'intérêt, PRE était la valeur de référence (avant l'exercice) et ET était l'écart type. L'écart-type groupé a été calculé de la façon suivante :

$$ET\ groupé = \sqrt{\frac{(N_{TM} - 1)\ VARIANCE_{TM} + (N_{PRE} - 1)VARIANCE_{PRE}}{(N_{TM} - 1) + (N_{PRE} - 1)}}$$

où N est le nombre de participants.

Les critères de Cohen ont été utilisés pour interpréter l'amplitude de la SMD : < |0,50| : petite ;|0,50| à |0,80| : modérée ; et > |0,80| : grande (Cohen, 1988). Tous les calculs ont été effectués avec le logiciel *Comprehensive Meta-analysis* (http://www.meta-analysis.com). Après que la SMD ait été calculée pour toutes les études, une SMD a été calculée pour estimer l'effet global des modifications du moment de FMV et des autres marqueurs indirects à chaque instant (< 6, 24, 48, 72, > 96 h) (Borenstein et coll., 2009). Un modèle à effets aléatoires a été utilisé car l'effet des marqueurs indirects peut différer selon le type d'exercice, le statut d'entraînement, le sexe ou d'autres modérateurs. Cette analyse a été réalisée afin de décrire l'évolution temporelle de chaque marqueur indirect en réponse à l'exercice. Un *clustering k-medoids* (*Partitioning around medoids*) a été réalisé à l'aide du logiciel R (R Core Team; 2020. R: A language and environment for statistics computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. URL : https://www.R- project.org) et le nombre optimal de clusters a été déterminé à l'aide du pack *NbClust R* (Maechler et coll., 2012). Cette analyse de *clustering* a été utilisée pour classer 141 groupes expérimentaux en 3 catégories (clusters) en fonction de la plus grande réduction de $FMV_{24\text{-}48h}$ (SMD) de chaque groupe. Ainsi, les groupes expérimentaux ont été classés en : faibles répondeurs (cluster 1 ; LOW), répondeurs modérés (cluster 2 ; MOD) et forts répondeurs (cluster 3 ; HIGH), en fonction de l'amplitude de la $FMV_{24\text{-}48h}$ (SMD). Une fois répartis en clusters, l'effet global (SMD) de chaque cluster pour le moment de FMV et les autres marqueurs de dommages musculaires ont été calculés à chaque temps de mesure (< 6, 24, 48, 72, > 96 h) à l'aide d'un modèle à effets aléatoires. Cela permettait de caractériser l'amplitude et l'évolution temporelle des marqueurs indirects de dommages musculaires couramment utilisés en fonction des différents niveaux de perte de la $FMV_{24\text{-}48h}$. Les SMD positives et négatives correspondent respectivement à une augmentation et une

diminution des marqueurs indirects de dommages musculaires après l'exercice. La SMD de chaque cluster n'a pas été calculée pour le PPT, la circonférence des membres, le NAV, le RTD, le LDH, l'IL-6 et le T_2, en raison du manque de groupes expérimentaux dans au moins un cluster. Un test de khi carré a été réalisé pour étudier la relation entre le niveau de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ (clusters) et les caractéristiques des participants et des exercices (âge, sexe, statut d'entraînement, type/modalité d'exercice et muscles impliqués). Les résultats sont représentés par la distribution (fréquences) dans chaque cluster (**Tableau 2**). Des méta-régressions ont été effectuées pour étudier l'association entre les modifications de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ et les modifications des marqueurs indirects à chaque temps de mesure (< 6, 24, 48, 72, > 96 h) (**Tableau 3**). Une corrélation entre la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ et un marqueur de dommages musculaires mesuré dans les 6 heures après l'exercice indique que ce marqueur pourrait en partie prédire la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$. Une corrélation entre la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ et un marqueur de dommages musculaires mesuré entre 24 h et 48 h indique, quant à elle, que ce marqueur pourrait se substituer à la mesure de la FMV aux temps de mesures concernés. Enfin, une corrélation entre la $FMV_{24\text{-}48h}$ et un marqueur de dommages musculaires mesuré au-delà de 48 h après l'exercice indique que ce marqueur est capable d'estimer rétrospectivement la $FMV_{24\text{-}48h}$.

D. Résultats

1. Études incluses : Caractéristiques et classification en clusters

Un total de 3089 participants (24,1 ± 3,5 ans) issus de 141 groupes expérimentaux différents a été inclus dans cette étude. Parmi ces individus, environ 81 % étaient des hommes et 19 % des femmes. Ces participants ont été classés dans différents statuts d'entrainements selon le nombre d'heures d'activité physique pratiquée par semaine : sédentaires (26,9 % ; < 3 h/semaines), actifs (36.9 % ; > 3 h/semaines et < 6 h/semaines), entrainés (27,7 % ; > 6 h/semaines), et non-identifié (8,5 %). Les participants ont effectué différents exercices : des contractions excentriques sur un dynamomètre isocinétique (37,6 %), des exercices excentriques/de musculation (22,7 %), de la marche/course en descente (14,9 %), des exercices pliométriques (12,0 %), des exercices aérobies prolongés (> 45 min ; 4,3 %), de l'électrostimulation neuromusculaire (1,4 %) et d'autres exercices (*e.g.*, sports collectifs, exercices intermittents, etc.) (7,1 %). Ces exercices étaient classés comme mono-articulaires (47,5 %) ou poly-articulaires (52,5 %). Les exercices mono-articulaires étaient réalisés sur les extenseurs du genou (80,6 %), les fléchisseurs du genou (11,9 %), les fléchisseurs plantaires

(6,0 %) et les fléchisseurs dorsaux de la cheville (1,5 %). Parmi les 3 089 participants, 2 001 participants ont été évalués pour l'activité de la CK (64,8 %), 1 974 pour les DOMS actifs (63,9 %), 760 pour les DOMS passifs (24,6 %), 501 pour la concentration de Mb (16,2 %), 492 pour l'amplitude de mouvement (15,9 %), 486 pour la hauteur de saut (15,7 %), 352 pour la réponse du moment de force évoquée (11,4 %), 247 pour le NAV (8,0 %), 241 pour le PPT (7,8 %), 185 pour la circonférence des membres (6,0 %), 169 pour le LDH (5,5%), 154 pour le RTD (5,0%), 149 pour l'IL-6 (4,8%), et 52 pour le T_2 mesuré par IRM (1,7%).

Les valeurs de $FMV_{24\text{-}48h}$ (SMD) de chaque groupe sont affichées dans la **Figure 31** pour les trois clusters : faibles répondeurs (LOW : centre des SMD = -0,29 ± 0,03, n = 50) ; répondeurs modérés (MOD : centre des SMD = -0,81 ± 0,04, n = 52) ; forts répondeurs (HIGH : centre SMD = -1,81 ± 0,12, n = 39). Les modifications globales (*i.e.*, pour toutes les études disponibles) de chaque marqueur indirect en réponse à l'exercice sont décrites dans la **Figure 32**. Les cinétiques d'apparition/récupération de chaque marqueur indirect sont décrites pour les trois clusters dans les **Figure 33 et Figure 34**. La SMD pour chaque cluster n'a pas été calculée pour le PPT, la circonférence du membre, le NAV, le RTD, le LDH, l'IL-6 et le T_2, en raison du manque de groupes expérimentaux dans au moins un cluster.

Figure 31. Récapitulatif des groupes expérimentaux inclus dans les différents clusters : (a) LOW, (b) MODERATE, et (C) HIGH. *Qa : évaluation de la qualité de l'étude ; Sed : Sédentaires ; Act : Actifs ; Entr : Entrainés ; ? : inconnu ; EXCiso : exercice excentrique sur un dynamomètre isocinétique ; Plio : exercice pliométrique ; Musc : exercice de résistance ou excentrique ; Desc : marche ou course en descente ; Prol : exercice prolongé ; ES : séance d'électrostimulation ; CK : créatine kinase ; DOMS : douleurs musculaires ; Mb : myoglobine ; ROM : amplitude de mouvement ; HdS : hauteur de saut ;Tw : amplitude des réponses évoquées ; PPT : seuil de pression de la douleur ; NAV : niveau d'activation volontaire ; LDH : lactate déshydrogénase ; RTD : taux de développement du moment de force ; Circ : circonférence du membre ; IL-6 : interleukine-6 ; T_2 :temps de relaxation transversale. Les données sont exprimées par la différence moyenne standardisée (SMD) ± l'erreur-type. La SMD affichée correspond à la diminution de force maximale volontaire la plus importante observée entre 24 et 48 h.*

a

		Caractéristiques des participants				Protocole		CLUSTER « LOW »
	Qa	n	Sexe (H ou F)	Age (a)	Statut d'entr.	Type d'exercice	Marqueurs évalués	
Aldret et coll. (2017)	61	8	H	23 ± 2	Entr	Desc	Mb, ROM	0,18 ± 0,28
Apostolopoulos et coll. (2018)	68	10	H	25 ± 6	Act	ECCiso	CK, DOMS	-0,38 ± 0,25
Arazi et coll. (2016)	71	8	H	21 ± 0	Act	Plio (F)	CK, DOMS, ROM, HdS	-0,39 ± 0,28
Arazi et coll. (2016)	71	8	H	20 ± 1	Act	Plio (S)	CK, DOMS, ROM, HdS	-0,55 ± 0,29
Ascensao et coll. (2008)	71	16	H	21 ± 1	Entr	Autre	CK, DOMS, Mb	-0,47 ± 0,20
Avela et coll. (1999)	61	7	H/F	29 ± NA	Entr	Prol	CK, DOMS, RTD	-0,16 ± 0,29
Banzet et coll. (2013)	61	9	H	32 ± NA	Act	Desc	CK, DOMS, Mb	-0,23 ± 0,26
Banzet et coll. (2013)	61	9	H	32 ± NA	Act	Autre	CK, DOMS, Mb	-0,06 ± 0,26
Baumann et coll. (2014)	75	11	H	28 ± 6	Entr	Desc	CK, DOMS	-0,39 ± 0,24
Baumert et coll. (2017)	57	5	H/F	23 ± 4	Sed	EXCiso	DOMS	-0,33 ± 0,36
Black et coll. (2016)	76	25	H	23 ± 3	Sed	Musc	DOMS, PPT	-0,36 ± 0,16
Bridgeman et coll. (2016)	61	8	H	26 ± 5	Entr	Plio	CK, DOMS, HdS	0,05 ± 0,27
Burt et coll. (2011)	50	8	H/F	22 ± 3	Act	Plio	DOMS	-0,47 ± 0,29
Chatzinikolaoau et coll. (2010)	68	12	H	23 ± 9	Entr	Plio	CK, HdS, LDH, IL-6	0,01 ± 0,22
Chrismas et coll. (2017)	75	40	H/F	26 ± NA	Act	Desc	CK, DOMS, NAV	-0,30 ± 0,13
Coratella et coll. (2015)	54	13	H	22 ± 3	Act	Musc	CK, DOMS	-0,58 ± 0,23
Crystal et coll. (2013)	75	10	H	21 ± 3	Entr	Desc	DOMS	-0,19 ± 0,25
Dabbs et coll. (2018)	54	13	H/F	20 ± 1	Entr	Musc	DOMS	-0,43 ± 0,22
Dantas et coll. (2019)	82	10	H	33 ± 5	Act	Prol	CK, DOMS	-0,43 ± 0,26
Davies et coll. (2018)	61	11	H	23 ± 3	Entr	Musc	CK, DOMS, HdS	-0,30 ± 0,24
Easthope et coll. (2010)	50	10	H	31 ± 7	Entr	Prol	CK, Tw, LDH	-0,46 ± 0,26
Easthope et coll. (2014)	64	20	H/F	35 ± 10	Entr	Prol	DOMS	-0,50 ± 0,18
Ferguson et coll. (2014)	71	21	H	21 ± 1	Entr	Autre	CK, DOMS, LDH, IL-6	-0,10 ± 0,17
Giandolini et coll. (2015)	68	23	H	39 ± 11	Entr	Desc	DOMS, Tw, NAV	-0,53 ± 0,17
Huang et coll. (2019)	71	12	H	22 ± 2	Sed	Musc	CK, DOMS, Mb	-0,01 ± 0,22
Joseph et coll. (2014)	71	20	H	22 ± 3	Act	Desc	CK, DOMS	-0,10 ± 0,17
Keane et coll. (2015)	50	11	F	22 ± 3	Entr	Autre	CK, DOMS, HdS, Circ	-0,40 ± 0,24
Lin et coll. (2015)	57	52	H	21 ± 2	Sed	EXCiso (KE)	CK, DOMS, Mb, ROM	-0,06 ± 0,11
Lin et coll. (2015)	57	52	H	21 ± 2	Sed	EXCiso (KF)	CK, DOMS, Mb, ROM	-0,13 ± 0,11
Lombard et coll. (2012)	68	10	H	22 ± 3	Entr	Autre	CK, DOMS, ROM	0,74 ± 0,28
Machado et coll. (2012)	79	20	H	20 ± 2	Sed	EXCiso	CK, DOMS, PPT	-0,56 ± 0,19
Maeo et coll. (2015)	54	14	H/F	21 ± 1	Sed	Desc	CK, DOMS	-0,56 ± 0,22
Maeo et coll. (2017)	79	12	H	24 ± 5	Act	Desc	CK, DOMS	-0,44 ± 0,23
Maeo et coll. (2017b)	71	11	H	29 ± 4	Act	Desc	DOMS, T_2	-0,29 ± 0,24
Maeo et coll. (2017b)	71	11	H	29 ± 4	Act	Musc	DOMS, T_2	-0,57 ± 0,25
Marcora et coll. (2007)	79	15	H/F	31 ± 9	Entr	Plio	CK, DOMS, Circ	-0,58 ± 0,22
McHugh et coll. (2001)	54	20	H/F	NA ± NA	?	EXCiso	DOMS, PPT	-0,38 ± 0,18
Paschalis et coll. (2007)	86	10	F	21 ± 10	Sed	EXCiso	CK, DOMS	-0,41 ± 0,25
Peñailillo et coll. (2014)	71	10	H	28 ± 8	?	Musc	RTD	-0,55 ± 0,26
Pincheira et coll. (2018)	57	20	H/F	25 ± 3	Sed	EXCiso	DOMS, Tw	-0,11 ± 0,17
Pournot et coll. (2010)	68	9	H	22 ± 5	Entr	Plio	CK, DOMS, HdS, LDH	-0,48 ± 0,27
Romero-Moraleda et coll. (2017)	71	16	H/F	24 ± 5	Act	Plio	DOMS	-0,40 ± 0,20
Stultskolehmainen et coll. (2014)	71	30	H/F	20 ± 1	Entr	Musc	HdS	-0,24 ± 0,14
Tékus et coll. (2017)	61	12	H	23 ± 7	Entr	EXCiso	CK	-0,38 ± 0,23
Thompson et coll. (1997)	61	6	F	25 ± 3	Act	Plio	CK, DOMS, ROM, Circ	-0,40 ± 0,33
Tofari et coll. (2017)	57	12	H	25 ± 4	Entr	Autre	CK, HdS, Tw, NAV	-0,37 ± 0,23
Twist et coll. (2011)	61	10	H	24 ± 2	Entr	Autre	CK, DOMS, HdS	-0,55 ± 0,26
Vaczi et coll. (2018)	61	10	H	21 ± 2	Entr	Plio	DOMS, Tw, NAV, RTD	0,12 ± 0,25
Vilach et coll. (2011)	57	10	H	25 ± 3	?	EXCiso	CK, DOMS, RTD	-0,41 ± 0,25
Xu et coll. (2018)	68	26	H/F	24 ± 3	Sed	EXCiso	DOMS	-0,43 ± 0,16

Figure 31 (suite)

b

	Qa	Caractéristiques des participants: n	Sexe (H or F)	Age (a)	Statut d'entr.	Protocole: Type d'exercice	Marqueurs évalués	CLUSTER « MODERATE »
Aminianfar et coll. (2011)	68	17	H/F	22 ± 2	Sed	EXCiso	CK, DOMS, Circ	-1,27 ± 0,25
Arroyo et coll. (2017)	86	13	H	47 ± 4	Act	EXCiso (M-A)	CK, DOMS, Mb	-0,90 ± 0,25
Arroyo et coll. (2017)	86	12	H	22 ± 2	Act	EXCiso (Y-A)	CK, DOMS, Mb	-0,88 ± 0,26
Barker et coll. (2012)	71	9	H	33 ± 6	Act	Plio	CK, DOMS	-1,00 ± 0,32
Baumert et coll. (2017)	57	40	H/F	23 ± 4	Sed	EXCiso	DOMS	-0,65 ± 0,13
Berhens et coll. (2012)	54	15	H/F	27 ± 4	Sed	Musc	Tw, PPT, NAV	-0,83 ± 0,23
Black et coll. (2015)	79	8	H/F	22 ± 1	Entr	EXCiso	DOMS, Tw, NAV, RTD	-0,81 ± 0,32
Brown et coll. (2016)	61	11	F	19 ± 1	Act	Musc	CK, DOMS, HdS, Circ	-0,67 ± 0,26
Brown et coll. (2016)	61	10	F	20 ± 1	Act	Autre	CK, DOMS, HdS, Circ	-0,71 ± 0,27
Burt et coll. (2012a)	82	9	H	26 ± 4	Act	Musc	CK, DOMS, HdS	-0,78 ± 0,30
Burt et coll. (2012b)	57	10	H	23 ± 3	Act	Musc	CK, DOMS	-0,62 ± 0,27
Burt et coll. (2013)	75	8	H	24 ± 2	Entr	Musc	CK, DOMS	-0,93 ± 0,33
Burt et coll. (2015)	75	8	H	27 ± 4	Entr	Musc (H-H)	CK, DOMS	-0,60 ± 0,30
Burt et coll. (2015)	75	8	H	26 ± 5	Entr	Musc (L-H)	CK, DOMS	-0,67 ± 0,30
Camacho et coll. (2020)	71	22	H	21 ± 1	Act	EXCiso	DOMS	-0,95 ± 0,20
Chen et coll. (2009)	64	15	H	22 ± 2	Sed	Desc	CK, Mb	-1,26 ± 0,27
Davies et coll. (2011)	61	8	F	24 ± 4	Entr	Musc	CK, DOMS, HdS	-0,74 ± 0,28
Davies et coll. (2018)	50	10	H	22 ± 4	Act	Musc	CK, DOMS	-0,77 ± 0,31
Deschenes et coll. (2000)	54	9	H	21 ± 3	Sed	Musc	CK	-0,63 ± 0,28
Dobbin et coll. (2016)	61	8	H	23 ± 3	Entr	Autre	DOMS, HdS	-0,65 ± 0,30
Doguet et coll. (2019)	64	11	H	27 ± 2	Act	EXCiso	DOMS	-0,91 ± 0,28
Easthope et coll. (2010)	50	13	H	46 ± 6	Entr	Prol	CK, Tw, LDH	-0,79 ± 0,25
Fonda et coll. (2015)	86	12	F	21 ± 2	Act	Musc	CK, DOMS, HdS, LDH	-0,66 ± 0,25
Fouré et coll. (2014)	75	25	H	22 ± 2	Act	ES	CK, DOMS, Tw, NAV, RTD, T_2	-1,28 ± 0,21
Gleeson et coll. (2013)	64	8	H	21 ± 2	Entr	EXCiso	CK, DOMS, ROM	-0,60 ± 0,30
Gordon et coll. (2017)	64	10	H	47 ± 4	Act	EXCiso (M-A)	CK, DOMS, Mb, RTD, IL-6	-0,62 ± 0,27
Gordon et coll. (2017)	64	9	H	22 ± 2	Act	EXCiso (Y-A)	CK, DOMS, Mb, RTD, IL-6	-0,78 ± 0,29
Guilhem et coll. (2016)	54	17	H/F	25 ± 4	Sed	EXCiso	DOMS, ROM	-0,62 ± 0,21
Hasson et coll. (1993)	61	5	H	24 ± 4	Act	Musc	PPT	-0,74 ± 0,39
Highton et coll. (2009)	61	7	H/F	21 ± 1	Act	Plio	DOMS	-0,89 ± 0,35
Hody et coll. (2013)	54	18	H	23 ± 2	Sed	EXCiso	CK, DOMS	-1,12 ± 0,23
Larsen et coll. (2015)	68	14	H/F	26 ± 5	Act	Musc	DOMS, PPT, T_2	-0,64 ± 0,23
Macintyre et coll. (1996)	50	10	F	27 ± NA	Act	EXCiso	CK, DOMS	-1,13 ± 0,31
Maeo et coll. (2015)	54	14	H/F	21 ± 1	Sed	Desc	CK, DOMS	-0,63 ± 0,23
Maeo et coll. (2017)	71	11	H	29 ± 4	Act	Musc	DOMS, T_2	-1,02 ± 0,29
Millet et coll. (2011)	68	11	H	38 ± 7	Entr	Prol	CK, Mb, Tw, NAV, LDH	-0,61 ± 0,25
Minahan et coll. (2015)	68	8	F	22 ± 3	Act	EXCiso	CK, Mb	-0,90 ± 0,32
Nelson et coll. (2004)	61	11	H	28 ± NA	?	Desc	DOMS, Circ	-0,66 ± 0,26
Neverdeen et coll. (2014)	61	7	H	25 ± 1	Act	Musc (F)	DOMS	-0,85 ± 0,34
Neverdeen et coll. (2014)	61	7	H	25 ± 3	Act	Musc (L)	DOMS	-1,23 ± 0,39
Nikolaidis et coll. (2007)	57	12	F	23 ± 2	Sed	EXCiso	CK, DOMS, ROM	-0,87 ± 0,26
Nottle et coll. (2005)	79	20	H	28 ± 7	?	Desc	CK, DOMS, PPT	-1,01 ± 0,21
Oakley et coll. (2013)	64	33	H/F	24 ± 4	?	EXCiso	CK, DOMS	-0,73 ± 0,28
Okamoto et coll. (2018)	79	15	H	23 ± 3	Sed	Musc	DOMS	-0,65 ± 0,22
Paschalis et coll. (2007)	61	12	F	20 ± 4	Sed	EXCiso	CK, DOMS	-1,12 ± 0,29
Pointon et coll. (2011)	57	10	H	21 ± 2	Entr	Musc	DOMS, Tw, PPT, NAV, RTD	-0,74 ± 0,28
Szczyglowski et coll. (2017)	79	12	H/F	23 ± 4	Act	EXCiso	DOMS	-0,83 ± 0,26
Tékus et coll. (2017)	61	6	H	25 ± 7	Sed	EXCiso	CK	-0,78 ± 0,36
Twist et coll. (2008)	61	9	H/F	24 ± 3	?	Plio	DOMS	-0,80 ± 0,30
Willoughby et coll. (2003)	68	8	H	21 ± 3	Sed	Musc	DOMS, IL-6	-1,19 ± 0,36
Yanagisawa et coll. (2010)	54	7	H	22 ± 1	Act	EXCiso	DOMS	-1,02 ± 0,36
Yanagisawa et coll. (2011)	54	6	H	22 ± 1	Sed	Musc	CK, DOMS, T_2	-0,95 ± 0,38

Figure 31 (suite)

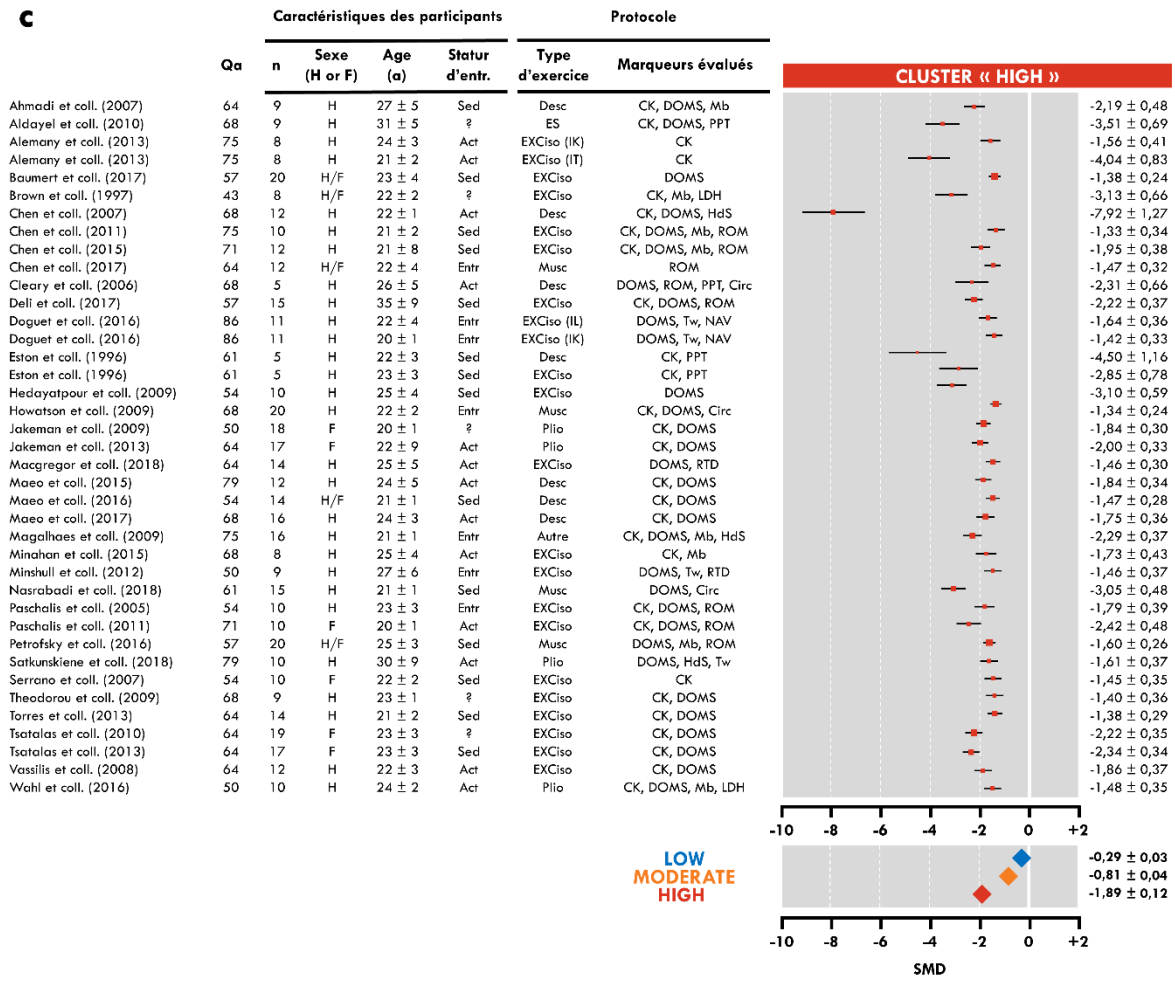
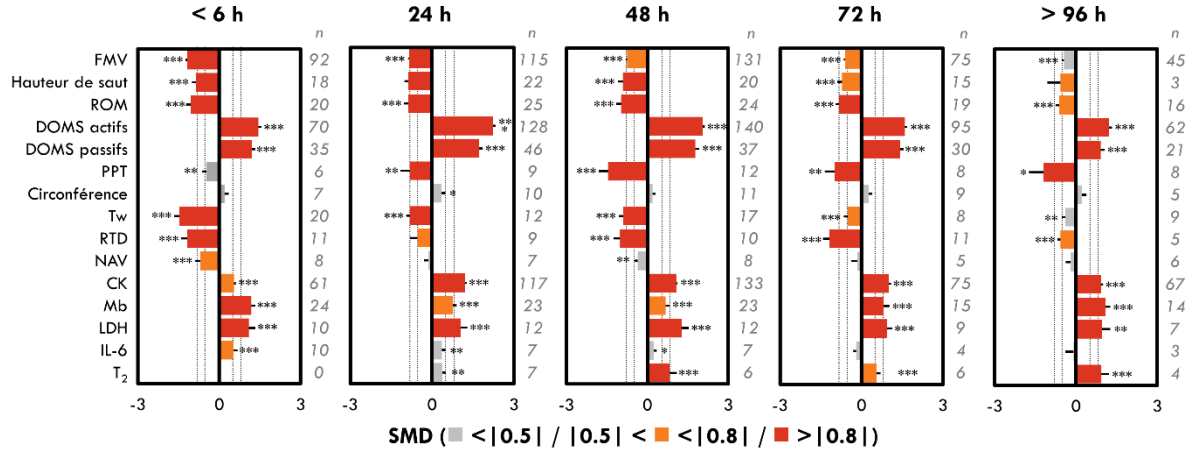


Figure 32. Cinétiques du moment de force maximale volontaire (FMV), de la hauteur de saut, de l'amplitude de mouvement (ROM), des douleurs musculaires (DOMS) actives et passives, du seuil de pression de la douleur (PPT), de la circonférence du membre, de l'amplitude de la réponse évoquée (Tw), du taux de développement du moment de force (RTD), du niveau d'activation volontaire (NAV), de l'activité de la créatine kinase (CK), de la concentration en myoglobine (Mb), de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH) et du temps de relaxation transversale (T_2). *Les données sont exprimées par la différence moyenne standardisée (SMD) ± l'erreur-type. Les couleurs grises, oranges et rouges correspondent à des effets faibles (< |0.50|), modérés (|0.50| to |0.80|) et larges (> |0.80|), respectivement. *, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement.*



2. Cinétique des marqueurs indirects de dommages musculaires

a. Marqueurs de la capacité de production de force

Moment de FMV. Comme attendu, nous avons constaté que l'évolution temporelle de la FMV était différente entre les clusters (**Figure 33b**). La récupération de la FMV était plus rapide dans les clusters LOW et MOD par rapport au cluster HIGH (**Figure 33b**). Un effet important de l'exercice était encore observé sur la FMV à 72 h (SMD = -1,18 ± 0,12) dans le cluster HIGH alors que des effets faibles à modérés ont été trouvés pour les autres clusters (LOW : SMD = -0,14 ± 0,05 ; MOD : CMS = -0,50 ± 0,06).

Hauteur du saut. La hauteur de saut mesurée 24 à 48 h après l'exercice a montré une diminution plus importante dans le cluster HIGH (SMD = -2,13 ± 0,72) par rapport aux clusters LOW (SMD = -0,47 ± 0,14) et MOD (SMD = -0,68 ± 0,19) (**Figure 33f**). De plus, la récupération était plus rapide dans les clusters LOW et MOD par rapport au cluster HIGH. Un effet important de l'exercice sur la hauteur de saut (SMD = -1,95 ± 0,28) était encore observé 72 h après l'exercice dans le cluster HIGH, alors que des effets faibles ont été trouvés pour les autres clusters (LOW : SMD = -0,44 ± 0,14 ; MOD : SMD = -0,21 ± 0,29).

Amplitude de la réponse évoquée. Une diminution significative de l'amplitude de la réponse de couple évoquée a été observée au cours des jours suivant les exercices (**Figure 32** ; **Figure 33c**). La diminution mesurée 24 à 48 h après l'exercice était plus importante pour le cluster HIGH (SMD = -1,21 ± 0,23) par rapport aux clusters MOD (-0,95 ± 0,23) et LOW (-0,33 ± 0,16) (**Figure 33d**). La récupération était plus longue (> 96 h) pour le cluster HIGH par rapport aux clusters MOD et LOW (48 h) (**Figure 33d**). Un effet important de l'exercice sur l'amplitude de la réponse évoquée a été observé 48, 72 et 96 h après l'exercice, alors que des effets faibles à modérés et aucun effet n'étaient observés pour les clusters MOD et LOW, respectivement (**Figure 33d**).

Niveau d'activation volontaire. Le NAV a été significativement diminué dans les 6 h (SMD = -0,71 ± 0,20) et 48 h (SMD = -0,36 ± 0,11) suivant l'exercice (**Figure 32**). La cinétique de ce marqueur n'a pas été analysée pour chaque cluster en raison du manque de groupes expérimentaux dans au moins un cluster.

Taux de développement du moment de force. Une diminution modérée à élevée du RTD a été observée après l'exercice (**Figure 32**). La réduction du RTD était plus importante dans les 6 heures suivant l'exercice (SMD = -1,18 ± 0,24), récupérait de manière transitoire 24

h après l'exercice (SMD = 0,53 ± 0,28 ; p = 0,06) et diminuait à nouveau 48 h après l'exercice (SMD = -1,01 ± 0,26). La cinétique de ce marqueur n'a pas été analysée pour chaque cluster en raison du manque de groupes expérimentaux dans au moins un cluster.

b. Amplitude du mouvement articulaire

Une diminution significative de l'amplitude de mouvement a été observée au cours des jours suivant les exercices (**Figure 32** ; **Figure 33g**). Cependant, l'amplitude de mouvement n'a été significativement réduite que dans les clusters MOD et HIGH et la diminution maximale est apparue 48 h après l'exercice pour ces clusters (SMD : -1,14 ± 0,48 et -1,29 ± 0,39, respectivement) (**Figure 33h**). De plus, l'amplitude de mouvement a été réduite de manière plus précoce dans le cluster HIGH (< 6 h) par rapport au cluster MOD (48 h).

c. Douleurs musculaires

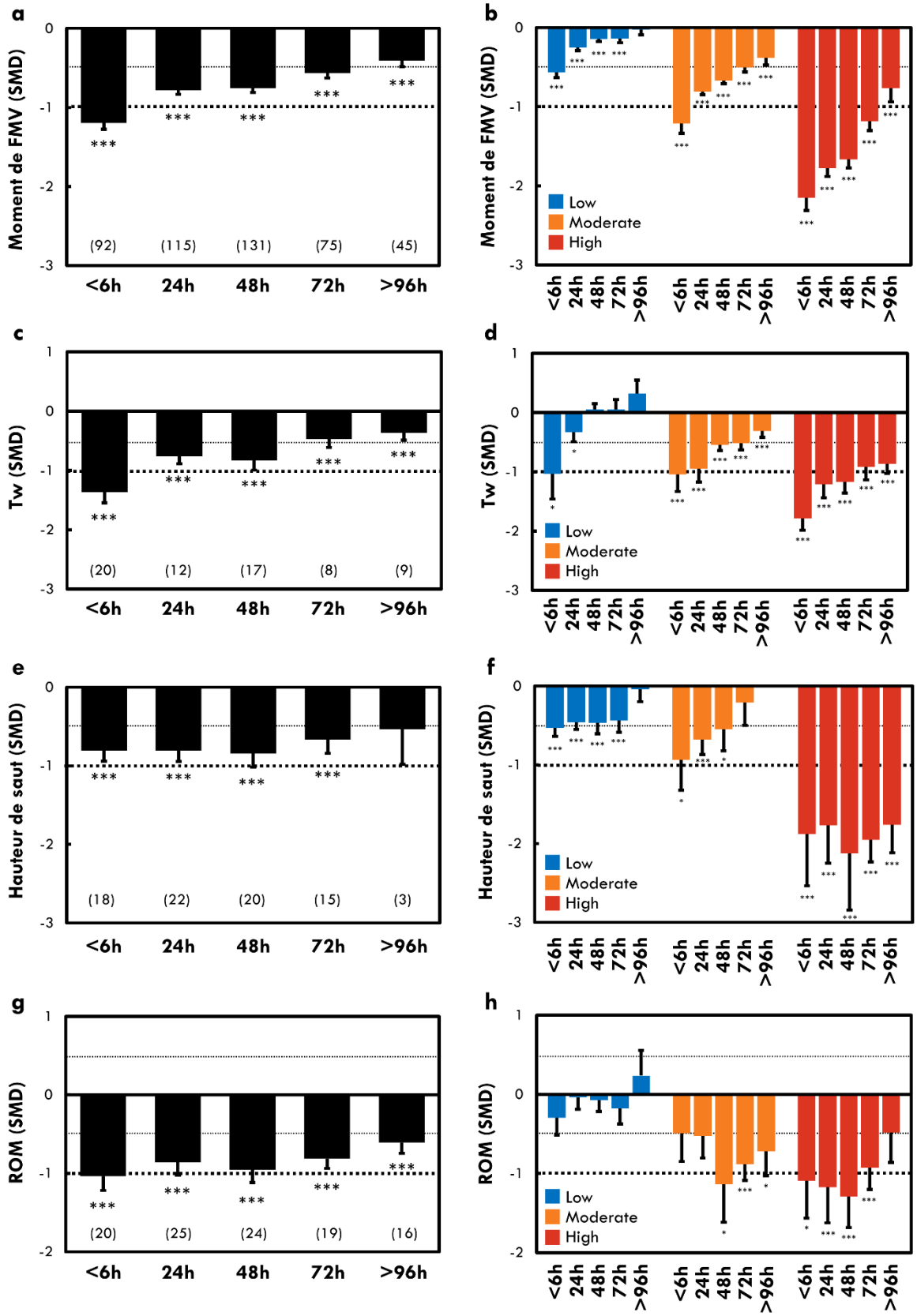
Une augmentation des DOMS actifs et passifs et une diminution du PPT ont été observées avec un pic 24 à 48 h après l'exercice (**Figure 32**; **Figure 34a et c**). Le pic de DOMS est apparu 48 h après l'exercice dans le cluster HIGH, et 24 h après l'exercice dans les clusters LOW et MOD. De plus, la récupération a été plus rapide dans le cluster LOW par rapport aux clusters MOD et HIGH (**Figure 34b et d**). Un effet important de l'exercice sur les DOMS actifs/passifs était encore présent 72 à 96 h après l'exercice dans le groupe HIGH, alors que des effets faibles à modérés ont été observés pour les autres groupes à ces temps de mesure (**Figure 34b et d**).

d. Gonflement du muscle

Circonférence des membres. Une faible augmentation de la circonférence des membres a été observée uniquement 24 h après l'exercice (SMD = 0,35 ± 0,15 ; **Figure 32**). La cinétique de ce marqueur n'a pas été analysée pour chaque cluster en raison du manque de groupes expérimentaux dans au moins un cluster.

Temps de relaxation transversale. Le T_2 a été significativement augmenté après l'exercice (**Figure 32**). Bien qu'aucune étude n'ait évalué le T_2 les 6 premières heures après l'exercice, les augmentations les plus importantes du T_2 ont été observées entre 48 et 96 h après l'exercice (**Figure 32**). La cinétique de ce marqueur n'a pas été analysée pour chaque cluster en raison du manque de groupes expérimentaux dans au moins un cluster.

Figure 33. Cinétique du moment de force maximale volontaire (FMV ; a-b), de l'amplitude de la réponse évoquée (Tw ; c-d), de la hauteur de saut (e-f) et de l'amplitude de mouvement (ROM ; g-h) après l'exercice. *La différence moyenne standardisée (SMD) et l'erreur-type sont représentées pour toutes les études incluses (a, c, e, g) et pour les trois clusters représentants trois niveaux de perte prolongée de FMV. *, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement.*



e. Marqueurs sanguins

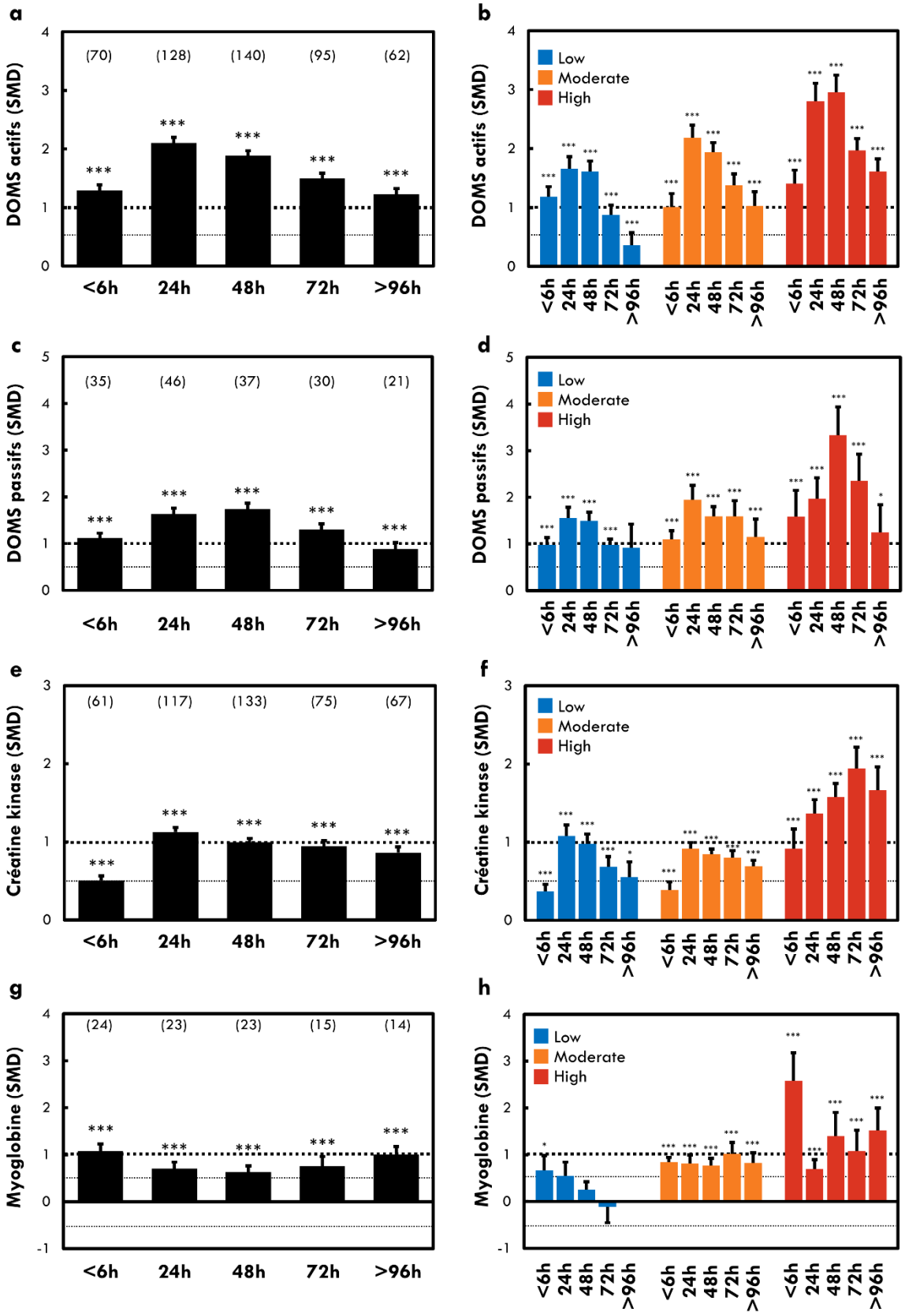
Créatine kinase. L'activité de la CK était augmentée, en moyenne, 24 h après l'exercice, et restait élevée jusqu'à 96 h après l'exercice (**Figure 32** ; **Figure 34e**). La cinétique de l'activité de la CK différait en fonction des clusters (**Figure 34f**). Le pic d'activité de la CK était observé 24 h après l'exercice pour les clusters LOW (SMD = 1,08 ± 0,14) et MOD (SMD = 0,92 ± 0,08) et 72 h après l'exercice pour le cluster HIGH (SMD = 1,94 ± 0,27) (**Figure 34f**).

Myoglobine. Le pic d'apparition de la concentration de la Mb était observé, en moyenne, dans les 6 h suivant l'exercice, mais la concentration pouvait rester élevée jusqu'à 96 h après l'exercice (**Figure 32**; **Figure 34g**). La cinétique de la concentration de Mb différait également en fonction des clusters (**Figure 34h**). La récupération de la concentration de Mb était plus longue dans les clusters MOD et HIGH (> 96 h) par rapport au cluster LOW (24 h) (**Figure 34h**). La concentration maximale de la Mb était plus importante pour le cluster HIGH (SMD = 2,58 ± 0,60) que pour les clusters MOD (SMD = 1,01 ± 0,25) et LOW (SMD = 0,66 ± 0,32) (**Figure 34h**).

Lactate déshydrogénase. L'activité du LDH a atteint son pic 48 h après l'exercice (SMD = 1, 28 ± 0, 24 ; **Figure 32**), mais pouvait rester élevée jusqu'à 96 h après l'exercice (SMD = 0, 95 ± 0, 31 ; **Figure 32**). La cinétique de ce marqueur n'a pas été analysée pour chaque cluster en raison du manque de groupes expérimentaux dans au moins un cluster.

Interleukine-6. Une augmentation modérée de la concentration d'IL-6 a été observée dans les 6 h suivant l'exercice (SMD = 0,51 ± 0,15 ; **Figure 32**). L'IL-6 n'a augmenté de manière significative que pendant les deux premiers jours suivant l'exercice (< 6 h, 24 h et 48 h ; **Figure 32**). La cinétique de ce marqueur n'a pas été analysée pour chaque cluster en raison du manque de groupes expérimentaux dans au moins un cluster.

Figure 34. Cinétiques des douleurs musculaires (DOMS) actives (a-b) et passives (c-d), le l'activité de la créatine kinsase (e-f), et de la concentration de la myoglobine (g-h). *La différence moyenne standardisée (SMD) et l'erreur-type sont représentées pour toutes les études incluses (a, c, e, g) et pour les trois clusters représentant trois niveaux de perte prolongée de FMV. *, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement.*



3. Facteurs associés à la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$

Le test d'association du khi carré a montré une relation significative entre le niveau de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ (clusters) et le statut d'entraînement ($p < 0,05$), la modalité d'exercice ($p < 0,01$) et le type d'exercice ($p < 0,01$) (**Tableau 2**). En effet, les participants entraînés étaient surreprésentés dans le cluster LOW (**Tableau 2a**) alors que les contractions excentriques utilisant un dynamomètre isocinétique et des exercices mono-articulaires étaient surreprésentées dans le cluster HIGH (**Tableau 2b et c**).

(a)

Cluster*	LOW	MOD	HIGH	Attendue
Sédentaire	20,0 %	26,9 %	35,9 %	26,9 %
Actif	30,0 %	46,2 %	33,4 %	36,9 %
Entrainé	44,0 %	19,2 %	17,9 %	27,7 %
Inconnu	6,0 %	7,7 %	12,8 %	8,5 %
Total	100 %	100 %	100 %	100 %

(b)

Cluster**	LOW	MOD	HIGH	Attendue
EXCiso	22,0 %	38,5 %	56,4 %	37,6 %
Plio	20,0 %	5,8 %	10,3 %	12,0 %
Musc	16,0 %	38,5 %	10,3 %	22,7 %
Desc	20,0 %	7,7 %	18,0 %	14,9 %
Prol	8,0 %	3,8 %	0,0 %	4,3 %
ES	0,0 %	1,9 %	2,5 %	1,4 %
Autres	14,0 %	3,8 %	2,5 %	7,1 %
Total	100 %	100 %	100 %	100 %

(c)

Cluster**	LOW	MOD	HIGH	Attendue
Poly-articulaire	76,0 %	42,3 %	35,9 %	52,5 %
Mono-articulaire	24,0 %	57,7 %	64,1 %	47,5 %
Total	100 %	100 %	100 %	100 %

Tableau 2. Caractéristiques des clusters LOW, MODERATE (MOD) et HIGH. *La distribution du statut d'entrainement (a), de la modalité de l'exercice (b) et du type d'exercice (c) est affichée pour chaque cluster. Les données sont exprimées en pourcentage de la totalité des participants (%). EXCiso : exercice excentrique sur un dynamomètre isocinétique ; Plio : exercice pliométrique ; Musc : exercice de résistance ou excentriques ; Desc : marche ou course en descente ; Prol : exercice prolongé ; ES : séance d'électrostimulation ; Les valeurs attendues correspondent à proportion de chaque caractéristique dans l'ensemble de l'échantillon (3 clusters réunis). Toute association significative entre les clusters et les caractéristiques sont affichées (* : p < 0,05 ; ** : p < 0,01).*

4. Méta-régression : association entre marqueurs EIMD et la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$

Les résultats des méta-régressions entre la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ et les changements des autres marqueurs sont présentés dans le **Tableau 3**.

a. Associations dans les 6 h suivant l'exercice

Les modifications du moment de FMV mesurées dans les 6 h suivant l'exercice étaient significativement corrélées ($r^2 = 0,67$; $p < 0,001$) avec les modifications de la $FMV_{24\text{-}48h}$. Les

modifications de la hauteur de saut, de l'amplitude de mouvement, des DOMS actifs, de la circonférence des membres, du NAV, et de la concentration de la Mb observées dans les 6 h suivant l'exercice étaient également corrélées aux modifications de la $FMV_{24\text{-}48h}$ (**Tableau 3**).

b. Associations entre 24 et 48 h après l'exercice

Les modifications de la hauteur de saut, du PPT, de la circonférence des membres, de l'amplitude de la réponse évoquée, du RTD et du T_2 observés 24 h après l'exercice étaient corrélées avec les modifications de la $FMV_{24\text{-}48h}$ (**Tableau 3**). De même, les modifications de l'amplitude de mouvement, des DOMS actifs/passifs, de la circonférence des membres, de l'amplitude de la réponse évoquée et du T_2 observées 48 h après l'exercice étaient corrélées avec les modifications de la $FMV_{24\text{-}48h}$ (**Tableau 3**).

c. Associations au-delà de 48 h après l'exercice

Les modifications de la hauteur de saut, des DOMS actifs/passifs, du PPT, de la circonférence des membres, de l'amplitude de la réponse évoquée, du NAV et de l'activité de la CK observées 72 h après l'exercice étaient corrélées avec les modifications de la $FMV_{24\text{-}48h}$ (**Tableau 3**). De même, les modifications des DOMS actifs, de l'amplitude de la réponse évoquée et du RTD mesurées à > 96 h après l'exercice étaient corrélées aux modifications de la $FMV_{24\text{-}48h}$ (**Tableau 3**).

Temps	< 6 h			24 h			48 h			72 h			> 96 h		
	r^2	p	n	r^2	p	n	r^2	p	n	r^2	p	n	r^2	p	n
HdS	0,21	**<0,001**	16	0,40	**<0,001**	19	0,00	0,21	17	0,07	**<0,001**	13	-	-	-
ROM	0,23	**0,01**	12	0,00	0,36	16	0,52	**<0,001**	16	0,02	0,23	12	0,00	0,41	8
DOMS actifs	0,03	**0,02**	43	0,00	0,55	62	0,13	**<0,001**	77	0,16	**<0,001**	43	0,28	**<0,001**	26
DOMS passifs	0,00	0,13	26	0,00	0,71	31	0,16	**<0,001**	40	0,22	**0,02**	20	0,00	0,16	10
PPT	0,17	0,24	6	0,13	**0,02**	7	0,05	0,09	10	0,10	**0,02**	6	0,00	0,35	7
Circ	1,00	**<0,001**	4	0,78	**<0,001**	7	0,82	**0,01**	8	0,76	**0,01**	7	0,31	0,08	4
Tw	0,00	0,16	14	0,88	**<0,001**	10	0,91	**<0,001**	12	0,98	**<0,001**	8	1,00	**<0,001**	8
RTD	0,04	0,36	4	0,51	**0,02**	7	0,00	0,42	9	-	-	-	0,95	**<0,001**	5
NAV	0,32	**0,04**	10	0,29	0,29	7	0,00	0,42	10	0,70	**<0,001**	5	0,00	0,83	7
CK	0,02	0,08	37	0,00	0,39	73	0,00	0,61	80	0,21	**<0,001**	49	0,00	0,19	30
Mb	0,47	**<0,001**	15	0,00	0,26	15	0,09	0,30	16	0,00	0,14	10	0,00	0,93	7
LDH	0,00	0,52	5	0,00	0,40	8	0,00	0,52	8	0,00	0,77	7	-	-	-
IL-6	0,00	0,46	5	0,00	0,62	5	0,46	0,13	5	-	-	-	-	-	-
T_2	-	-	-	1,00	**<0,001**	5	1,00	**<0,001**	6	1,00	0,10	4	-	-	-

Tableau 3. Coefficients de détermination (r^2) et valeur p des méta-régressions entre la réduction prolongée du moment de force maximale volontaire et les modifications de la hauteur de saut (HdS), de l'amplitude de mouvement (ROM), de la douleur musculaire (DOMS) active et passive, du seuil de pression de la douleur (PPT), de la circonférence du membre, de l'amplitude de la réponse évoquée (Tw), du taux de développement du moment de force (RTD), du niveau d'activation volontaire (NAV), de la créatine kinase (CK), de la myoglobine (Mb), de l'interleukine-6 (IL-6) et du temps de relaxation transversale (T_2) *Les résultats avec une valeur de $p < 0,05$ étaient considérés comme significatifs et sont affichés en gras.*

E. Discussion

Cette étude était la première (1) à évaluer quantitativement l'amplitude et l'évolution temporelle des marqueurs indirects de dommages musculaires les plus utilisés et (2) à les regrouper en fonction des niveaux de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ après des exercices pouvant induire des dommages musculaires sur les membres inférieurs. Cette approche a été appliquée à une quantité importante de données provenant de 141 études utilisant diverses modalités d'exercice avec des participants dont les caractéristiques sont variées. Premièrement, trois cinétiques différentes ont été identifiées, correspondant à trois niveaux de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ (LOW, MOD, HIGH) pour les marqueurs de dommages musculaires couramment utilisés (*e.g*., activité de la CK, concentration de la Mb, DOMS, amplitude de mouvement). Par exemple, l'amplitude des modifications semble plus importante et la récupération plus lente dans le cluster HIGH (*i.e.* altération fonctionnelle importante) par rapport aux autres clusters pour le moment de FMV, l'amplitude de la réponse évoquée, la hauteur de saut, la concentration de la Mb. L'atteinte du pic peut également apparaitre plus tardivement dans le cluster HIGH par rapport aux autres clusters pour les DOMS et l'activité de la CK. Deuxièmement, nous avons montré que certains facteurs tels que le statut d'entraînement et le type/modalité d'exercice expliquent en partie le niveau de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$. Par exemple, les contractions excentriques effectuées sur dynamomètre isocinétique et les exercices mono-articulaires ont induit une perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ plus importante que les autres modalités d'exercices et les exercices poly-articulaires, respectivement. Troisièmement, certains marqueurs de dommages musculaires pourraient se substituer à la mesure de la FMV (*e.g*., hauteur de saut, amplitude de la réponse évoquée), ou pourraient estimer en partie (*e.g*, Mb) le niveau de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ de façon précoce.

1. Cinétique des marqueurs indirects de dommages musculaires

a. Marqueurs de la capacité de production de force

Les résultats de la présente étude ont montré que plus la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ observée sur les muscles des membres inférieurs est importante, plus la récupération est longue (**Figure 33b**). Ceci est cohérent avec Damas et coll. (2016) qui ont rapporté des différences de cinétiques entre trois clusters construits à partir de la perte individuelle de la FMV (> 24 h) après un exercice excentrique maximal des fléchisseurs du coude. La cinétique de récupération du moment de FMV est également cohérente avec une précédente étude de Paulsen et coll. (2012) qui a montré une récupération plus longue après des dommages musculaires « graves » par rapport aux dommages musculaires « légers » ou « modérés », basé sur la perte de FMV. De

manière intéressante, nous avons également constaté que plus la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ est importante (*i.e.*, dommages musculaires importants), plus les récupérations de l'amplitude de la réponse évoquée et de la hauteur de saut sont longues. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de comparer les cinétiques du NAV et du RTD pour différents niveaux de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ en raison du manque d'études évaluant ces marqueurs dans au moins un cluster. Cependant, nous avons constaté que le NAV était diminué pendant les premières heures après l'exercice (< 6 h) et 48 h après l'exercice. Le RTD, une mesure de la capacité du système neuromusculaire à produire rapidement de la force pendant une CMV, a diminué dans les premières heures suivant les exercices (< 6 h), mais aussi 48 à 96 h après l'exercice. Comme la capacité du système neuromusculaire à activer le muscle (*i.e.*, le NAV) n'a pas été affectée 72 et 96 h après l'exercice dans la présente étude, on pourrait supposer que la diminution du RTD à ces temps de mesure était probablement due à des facteurs périphériques. En accord avec ces résultats, il a été suggéré (Jenkins et coll., 2014; Penailillo et coll., 2015a) que la phase précoce du RTD reflète les mécanismes nerveux impliqués dans la diminution de la FMV suite à l'exercice, tandis que la phase tardive du RTD pourrait refléter les mêmes mécanismes physiologiques que la perte de FMV. Les résultats de l'amplitude de la réponse évoquée et du NAV ont confirmé que la perte de FMV observée les heures/jours suivant un exercice induisant des dommages musculaires est due à des altérations périphériques (*i.e.*, musculaires) et centrales (*i.e.*, nerveuses) du système neuromusculaire. De plus, nous avons confirmé que le processus de récupération pour rétablir la capacité de production de force après une séance d'entraînement ou une intervention d'exercice doit être adapté individuellement en fonction de l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$.

b. Douleurs musculaires, amplitude de mouvement, et gonflement du muscle

La présente revue a confirmé que les DOMS passifs et actifs présentaient un pic entre 24 et 48 h après l'exercice, et a montré que plus la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ est importante, plus le pic de DOMS apparait tardivement. En effet, nous avons constaté que les DOMS atteignaient leur pic 24 h après l'exercice pour les clusters LOW et MOD, alors que ce pic apparaissait à 48 h après l'exercice pour le cluster HIGH. Ces résultats ne sont pas cohérents avec ceux rapportés par Damas et coll. (2016) qui ont rapporté que les DOMS présentaient un pic 48 h après un exercice excentrique des fléchisseurs du coude, quel que soit le niveau de perte FMV. Ces divergences pourraient être dues au grand nombre de modalités d'exercice, de groupes

musculaires et de designs expérimentaux inclus dans l'analyse de la présente revue, différant du modèle spécifique utilisé par Damas et coll. (2016). Cependant, il est difficile d'expliquer pleinement pourquoi le pic de DOMS est retardé après des dommages musculaires « sévères » en raison d'une étiologie complexe dans l'apparition de la douleur (Lewis et coll., 2012). Par exemple, l'inflammation (Paulsen et coll., 2012) et la pression intramusculaire due au gonflement musculaire (Crenshaw et coll., 1994) pourraient être différentes en fonction du niveau de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$, affectant différemment les cinétiques des DOMS. Nos résultats ont montré une faible augmentation de la circonférence des membres 24 h après l'exercice, alors qu'une augmentation importante du T_2 a été observée 24 à 96 h après l'exercice. Comme Damas et coll. (2016) ont rapporté qu'un exercice excentrique des fléchisseurs du coude induisait une augmentation de la circonférence des membres jusqu'à 120 h après l'exercice quel que soit le niveau de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$, on pourrait supposer que ce marqueur est plus sensible sur les membres supérieurs que sur les membres inférieurs. Nos résultats ont montré que l'amplitude de mouvement n'était pas impactée les jours après les exercices pour le cluster LOW, tandis qu'elle diminuait de manière importante 48 h après l'exercice pour les clusters MOD et HIGH. De plus, l'amplitude de mouvement était diminuée en quelques heures (< 6 h, 24 h) après l'exercice uniquement dans le cluster HIGH. Dans un contexte clinique ou sportif, des évaluations reproductibles, peu coûteuses, rapides et faciles à utiliser sont nécessaires afin de fournir un diagnostic rapide et quantitatif de l'état du muscle après l'exercice. Nos résultats suggèrent que l'évaluation de la circonférence des membres serait plus appropriée et pourrait donner plus d'informations sur le gonflement musculaire lorsque les dommages musculaires sont induits sur les membres supérieurs (Clarkson & Hubal, 2002; Damas et coll., 2016). De plus, il semblerait que les modifications de la raideur musculo-tendineuse et le gonflement du muscle représentés par la mesure de l'amplitude articulaire (Howell et coll., 1993) pourraient apparaître plus tôt (dans les heures qui suivent l'effort) et rester élevées plus longtemps (72 h) après des dommages musculaires « sévères » comparé à des dommages de moindre amplitude.

c. Marqueurs sanguins

Contrairement aux marqueurs mentionnés ci-dessus, les marqueurs sanguins fournissent une information systémique sur les dommages musculaires. En effet, lorsque les fibres musculaires sont endommagées ou que la perméabilité du sarcolemme est augmentée, des composants intramusculaires sont libérés dans l'espace extracellulaire et la circulation sanguine. Par conséquent, l'augmentation du niveau des marqueurs circulants a souvent été utilisée pour

quantifier les dommages musculaires (Brancaccio et coll., 2010; Warren et coll., 1999). Dans la présente étude, une augmentation des activités de la CK et du LDH et des concentrations de Mb a été observée les jours après les exercices, mais avec des évolutions temporelles différentes, comme déjà rapporté précédemment (Lippi et coll., 2018; Peake et coll., 2005). Étant donné que la CK est éliminée par le système réticulo-endothélial et que la Mb est éliminée par le foie et les reins (Muslimovic et coll., 2020), les différences de cinétiques pourraient être différentes entre ces marqueurs sanguins. De plus, Muslimovic et coll. (2020) ont rapporté un nouveau mécanisme de clairance par endocytose des cellules musculaires qui pourrait apporter un éclairage nouveau sur ce phénomène. Bien que nous ayons constaté que le pic d'activité de la CK n'était pas nécessairement plus important dans le cluster HIGH par rapport aux clusters LOW et MOD les heures suivant l'exercice, nous avons observé que l'activité de la CK atteignait un pic 24 h après l'exercice pour les clusters LOW et MOD, et 72 h après l'exercice pour le cluster HIGH. Même si la CK est largement utilisée dans la littérature et en pratique clinique, ce marqueur semble donc peu sensible aux dommages dans les premières heures après un exercice induisant des dommages musculaires. En accord avec Lippi et coll. (2018), la cinétique de la concentration de la Mb après des dommages musculaires « faibles » (cluster LOW) a montré une augmentation rapide et un retour aux valeurs initiales quelques heures (< 24 h) après l'exercice. Cependant, la concentration de la Mb pourrait rester élevée pendant plusieurs jours après un exercice induisant des dommages musculaires « modérés » à « sévères » (clusters MOD et HIGH). L'augmentation persistante des niveaux de Mb et de CK observée les jours suivant l'exercice dans le cluster HIGH pourrait s'expliquer, au moins en partie, par une libération secondaire de la CK et de la Mb contenues dans les myocytes vers la circulation. En effet, il a été rapporté que des dommages musculaires secondaires et une nécrose des fibres pourraient survenir en raison de la perte de l'homéostasie du Ca^{2+} et du processus inflammatoire (Lapointe et coll., 2002; Paulsen et coll., 2012). La cinétique des marqueurs sanguins pourrait donc informer sur l'état musculaire pendant les jours suivant l'exercice puisque le pic d'activité de la CK semble être retardé (de 24 h à 72 h) et la concentration de la Mb pourrait rester élevée après des dommages musculaires « sévères ». Il se pourrait que la récupération de l'intégrité du sarcolemme dépende du niveau de dommages musculaires. Cela a des implications pratiques pour le diagnostic des dommages musculaires après l'exercice puisqu'il pourrait être intéressant de s'intéresser non seulement à l'amplitude des marqueurs sanguins mais aussi à leur évolution dans le temps.

d. Recommandations

Des divergences existent en termes de cinétique d'apparition/récupération entre les marqueurs de dommages musculaires. Après des exercices induisant des dommages musculaires « sévères » (*i.e.*, un niveau important de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$), la concentration de la Mb présentait un pic 6 h après l'exercice, tandis que celui de l'amplitude de mouvement et des DOMS survenait à 48 h et celui de l'activité de la CK à 72 h après l'exercice. Cela suggère que la présence d'un niveau important de dommages musculaires devrait être mise en évidence par des marqueurs différents en fonction du temps de la mesure.

2. Facteurs affectant la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$

Nos résultats ont confirmé que le niveau d'entraînement était un facteur impliqué dans l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ (**Tableau 2**). En effet, cela est cohérent avec Ertel et coll. (2020) qui ont rapporté que les individus les moins entrainés présentaient des symptômes de dommages musculaires plus importants que les individus les plus entrainés. La présente étude a également montré que les contractions excentriques effectuées sur dynamomètre isocinétique entraînaient une perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ plus importante par rapport aux autres exercices. De même, nous avons constaté que les exercices mono-articulaires induisaient une perte $FMV_{24\text{-}48h}$ plus importante par rapport aux exercices poly-articulaires. Cela pourrait s'expliquer par la forte proportion d'exercices mono-articulaires réalisés à haute intensité et sur une large amplitude de mouvement lorsque l'exercice est réalisé sur dynamomètre isocinétique. En effet, il a été montré que l'intensité de l'exercice (Nosaka & Newton, 2002) et l'amplitude de mouvement de l'exercice (Fochi et coll., 2016; Sadacharan & Seo, 2021) sont des facteurs pouvant affecter l'amplitude des modifications des différents marqueurs de dommages musculaires (*e.g.*, la perte de FMV). Malheureusement, il était impossible de comparer l'intensité de tous les modèles d'exercice inclus dans la présente étude en raison de l'hétérogénéité des types d'exercice et du manque d'informations sur l'intensité de l'exercice dans certaines études. Nos résultats concernant les exercices mono-articulaires et poly-articulaires, sont en accord avec Paulsen et coll. (2012) qui ont rapporté que les contractions excentriques isolées entraînaient des altérations plus importantes de la fonction musculaire par rapport aux exercices excentriques plus fonctionnels (*e.g.*, la course en descente).

Le processus méthodologique de la présente étude a mis en évidence le manque d'informations concernant les caractéristiques des participants et du modèle d'exercice réalisé dans de nombreuses études. Plusieurs caractéristiques des participants telles que l'âge, le sexe,

la taille, le poids, le volume d'entraînement et le type d'exercice devraient être systématiquement et précisément rapportées. De même, plusieurs caractéristiques de l'exercice telles que l'intensité, la durée et le volume devraient être rapportées plus clairement. Dans les cas où cela est applicable, il est également important d'indiquer le mode et la vitesse de contraction musculaire, ainsi que l'angle articulaire et l'amplitude de mouvement auxquels la contraction a été effectuée. Une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans l'exercice pourrait être utile pour mieux anticiper l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$, et ainsi mieux adapter les stratégies de récupération et les charges d'entraînement des athlètes. Par exemple, plus le sujet est entraîné, plus les dommages musculaires sont faibles et plus le temps nécessaire pour rétablir la fonction musculaire est faible. Avec l'entrainement, le temps entre deux stimuli mécaniques peut donc être réduit.

3. Marqueurs de dommages musculaires associés avec la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$

Afin d'évaluer si les marqueurs de dommages musculaires pouvaient être utilisés comme indicateurs du déficit fonctionnel musculaire, nous avons comparé les réponses de ces marqueurs avec l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ en effectuant des méta-régressions. Nos résultats ont montré des associations significatives entre les modifications de $FMV_{24\text{-}48h}$ et celles d'autres marqueurs EIMD. Ces résultats suggèrent que certains marqueurs de dommages musculaires pourraient prédire, en partie, le déficit fonctionnel prolongé (*e.g*, Mb), alors que d'autres marqueurs pourraient être utilisés pour substituer la $FMV_{24\text{-}48h}$ (*e.g*., amplitude de la réponse évoquée, hauteur de saut).

a. Marqueurs de la capacité de production de force

Une corrélation significative a été trouvée entre la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ et les modifications de l'amplitude de la réponse évoquée mesurée 24, 48, 72 et > 96 h après l'exercice (**Tableau 3**), suggérant que l'amplitude de la réponse évoquée pourrait se substituer à la FMV, sans la nécessité d'effectuer des efforts maximaux. Une corrélation significative a également été observée entre la diminution de hauteur de saut mesurée 24 h après l'exercice et la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ ($r^2 = 0,40$), suggérant que la hauteur de saut pourrait être une alternative pratique et peu coûteuse pour évaluer l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ (*i.e*., l'amplitude des dommages musculaires). Cependant, les modifications précoces (< 6 h) de l'amplitude de la réponse évoquée et de la hauteur de saut étaient faiblement associés à la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ (**Tableau 3**). Il est probable que les mesures précoces de la fonction musculaire reflètent l'influence combinée de la fatigue métabolique et des dommages musculaires (Paulsen et coll., 2012),

expliquant ainsi la faible corrélation avec les modifications de $FMV_{24\text{-}48h}$. En effet, bien que nous ayons observé que la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ était mieux associée avec la réduction précoce (< 6 h) de la FMV, qu'avec les modifications précoces (< 6 h) de l'amplitude de réponse évoquée et la hauteur de saut, la mesure précoce de la FMV ne semblent pas entièrement expliquer la perte de la perte $FMV_{24\text{-}48h}$ (r^2 = 0,67), probablement en raison d'une fatigue métabolique et centrale. Nous avons constaté que la diminution du NAV mesurée dans les 6 heures suivant les exercices était associée à la perte de la perte $FMV_{24\text{-}48h}$, suggérant que l'incapacité à activer volontairement les unités motrices dans la phase précoce après l'exercice pouvait en partie prédire la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ (*i.e.*, l'amplitude des dommages musculaires). Cependant, la diminution précoce (< 6 h) du NAV est largement affectée par la fatigue musculaire (Gandevia, 2001), limitant l'utilisation de ce marqueur pour prédire l'amplitude de la perte de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$. La présence de DOMS, de gonflement des muscles et d'inflammation 48 h après l'exercice dans la présente étude pourrait également être impliquée dans la réduction du NAV observée 48 h après l'exercice, en raison de la sensibilité des fibres afférentes III-IV aux stimulus nociceptifs et mécaniques (pression) (Gandevia, 2001). Cependant, nos résultats ont montré que la diminution du NAV mesuré 48 h après l'exercice était faible, limitant son effet sur la diminution de la fonction musculaire à ce moment-là. Le RTD a été diminué dans les premières heures suivant les exercices (< 6 h), mais aussi 48 à 96 h après l'exercice. Parmi ces temps de mesure, une corrélation a été observée uniquement entre le RTD mesuré 96 h après l'exercice et la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Penailillo et coll. (2015a) qui montrent que le RTD mesuré sur l'intervalle 100-200 ms pouvait être utilisé comme marqueur précoce de dommages musculaires. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par les différentes méthodes utilisées pour évaluer le RTD (intervalles de temps : 0-50 ms, 100-200 ms, etc.). En résumé, la réduction de la hauteur de saut pourrait être une alternative pratique et peu coûteuse pour évaluer le déficit fonctionnel musculaire après des exercices pouvant induire des dommages musculaires. De plus, l'amplitude de la réponse évoquée pourrait se substituer à la mesure de la FMV et permettre d'évaluer la fonction musculaire sans forcément effectuer des efforts maximaux.

b. Douleurs musculaires, amplitude de mouvement, et gonflement du muscle

Nous avons observé que les douleurs musculaires (DOMS actifs/passifs et PPT) étaient faiblement associées à la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$, suggérant que l'évaluation des douleurs

musculaires ne devrait pas être utilisée pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires. Au contraire, nous avons montré une corrélation entre les modifications de l'amplitude de mouvement mesurée 48 h après l'exercice et l'amplitude de la perte $FMV_{24\text{-}48h}$, suggérant que l'amplitude de mouvement pourrait également être utilisée comme marqueur indirect permettant d'évaluer en partie l'amplitude des dommages musculaires à ce temps de mesure. Malgré la faible augmentation de la circonférence des membres, les modifications de la circonférence des membres étaient significativement associées à l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ à plusieurs temps de mesures après l'exercice (**Tableau 3**). Cela est cohérent avec les résultats de Damas et coll. (2016) qui montrent une corrélation entre la réduction de la FMV et la circonférence du bras après un exercice excentrique des fléchisseurs du coude. De plus, nous avons trouvé une association entre l'augmentation du T_2 mesurée 24-48 h après l'exercice et la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$. Ainsi, le T_2 pourrait en partie évaluer les dommages musculaires, mais uniquement au-delà de 24 h après l'exercice. Nos résultats doivent néanmoins être interprétés avec prudence car un faible nombre d'études ont évalué la circonférence des membres et le T_2 sur les membres inférieurs après des exercices induisant des dommages musculaires.

c. Marqueurs sanguins

Concernant les marqueurs sanguins, seule la concentration de la Mb semble être capable d'estimer précocement (< 6 h) l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ (**Tableau 3**). Bien que l'activité de la CK dans le sang soit le marqueur le plus souvent utilisé, cette mesure ne semble pas être capable de prédire avec précision l'amplitude de la $FMV_{24\text{-}48h}$. En effet, ce marqueur ne permet d'évaluer en partie l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ que lorsqu'il est évalué 72 h après l'exercice. De façon similaire, l'absence de corrélation entre les modifications d'activité du LDH et la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ suggère que la mesure du LDH n'est pas utile pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires, probablement en raison de la non-spécificité du LDH aux myocytes (Sorichter et coll., 1999). Malgré l'augmentation faible à modérée de la concentration d'IL-6 dans les jours suivant les exercices (**Figure 32**), ce marqueur n'était pas corrélé à l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$. Cela suggère que la concentration d'IL-6 ne permet pas d'évaluer l'amplitude des dommages musculaires. Ces observations sont cohérentes avec celles de Paulsen et coll. (2012) et de Reihmane et Dela (2014) qui ont rapporté que les variations divergentes des concentrations d'IL-6 entre les études s'expliquaient par les différents protocoles d'exercice et le statut d'entraînement des participants. De plus, cette grande

variabilité observée dans ce marqueur après un exercice excentrique pourrait être due aux différents rôles de l'IL-6 en réponse aux contractions musculaires (Fischer, 2006).

d. Recommandations

Parmi les marqueurs de dommages musculaires les plus couramment utilisés, la concentration de la Mb ou la FMV devraient être utilisées au cours des premières heures après l'exercice (< 6 h), même si ces marqueurs ne prédisent que partiellement la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$ en raison de la forte variabilité interindividuelle et de la fatigue métabolique. La perte de FMV devrait être utilisée au-delà de 24 h après l'exercice, cependant les réductions de la hauteur de saut et de l'amplitude réponse évoquée pourraient être des alternatives. Il est également important de noter que l'amplitude de mouvement pourrait être une alternative simple et peu coûteuse lorsque l'évaluation est réalisée 48 h après l'exercice. Enfin, l'évaluation de l'activité de la CK ne semble adaptée qu'à partir de 72 h après l'exercice pour rendre compte de l'état de la fonction musculaire.

4. Limites

Quelques points peuvent avoir influencé nos résultats et méritent d'être pris en compte. Premièrement, l'utilisation de valeurs de groupes plutôt que de valeurs individuelles pourrait limiter l'interprétation de la variabilité individuelle. Deuxièmement, l'évaluation des marqueurs de dommages musculaires n'a pas toujours été rapportée à tous les points de mesure, limitant l'interprétation des résultats, en particulier pour les marqueurs les moins fréquemment évalués. Comme nous avons évalué seulement les marqueurs présents dans au moins cinq études, nos résultats se limitent qu'aux marqueurs les plus couramment utilisés. Troisièmement, la majorité des études incluaient principalement des hommes (81 %), limitant l'interprétation des résultats actuels pour les femmes. En effet, il a été démontré que la fonction musculaire est moins affectée chez la femme que chez l'homme après un exercice excentrique (Temesi et coll., 2015). La plus faible sensibilité des femmes aux dommages musculaires pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs tels qu'une FMV plus faible (Hunter & Enoka, 2001) ou le rôle des hormones sexuelles (Komulainen et coll., 1999), mais d'autres études devraient être réalisées afin de clarifier ces différences.

F. Conclusion

La présente revue était la première à caractériser la cinétique d'apparition/récupération des marqueurs indirects de dommages musculaires les plus fréquemment rapportés pour

différents niveaux de perte de $FMV_{24\text{-}48h}$. Comme il existe une certaine divergence entre les cinétiques de ces marqueurs, différents marqueurs devraient être utilisés en fonction du moment où l'évaluation est effectuée. La concentration de la Mb ou la FMV devraient être utilisées pendant les premières heures après l'exercice (< 6 h), même si ces marqueurs ne prédisent que partiellement la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$. Les réductions de la hauteur de saut et de l'amplitude de la réponse évoquée pourraient être utilisées comme alternative à la perte de FMV. L'amplitude de mouvement pourrait être une alternative simple et peu coûteuse lorsque la mesure est réalisée 48 h après l'exercice, alors que l'évaluation de l'activité de la CK ne semble avoir un intérêt qu'à partir de 72 h après l'exercice pour rendre compte de l'état de la fonction musculaire. De plus, des facteurs tels que le statut d'entraînement et le type/modalité d'exercice (*e.g.*, exercice mono-articulaire, contractions excentriques réalisées sur dynamomètre isocinétique) pourraient affecter l'amplitude de la perte de $FMV_{24\text{-}48h}$, et donc affecter le temps pour récupérer la fonction musculaire.

À retenir :

- L'activité de la créatine kinase ne permet pas de prédire l'amplitude de la réduction prolongée de la FMV. Son évaluation ne semble avoir un intérêt qu'à partir de 72 h. Un pic d'apparition survenant après 24 h (*i.e.*, > 48 h) pourrait indiquer une atteinte fonctionnelle plus importante.
- La myoglobine pourrait être utilisée comme un marqueur permettant de prédire (partiellement) et de façon précoce l'amplitude de la perte prolongée de la FMV.
- La hauteur de saut semble être une alternative intéressante lorsque la mesure de la FMV n'est pas possible.
- Les exercices mono-articulaires et effectués de manière excentrique sur un dynamomètre isocinétique pourraient induire une réduction prolongée de la FMV plus importante que les autres types d'exercices.

Sous-partie 2. Évaluation des microARNs circulants et de la raideur musculaire mesurée par élastographie après des exercices induisant des dommages musculaires

La réalisation de la première étude de revue systématique avec méta-analyses (**étude 1**) nous a permis de confirmer le besoin de « nouveaux » marqueurs pour prédire l'altération prolongée de la fonction musculaire (*i.e.*, au-delà de 24 h), considérée comme le meilleur marqueur indirect pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires induits par l'exercice (Warren et coll., 1999). L'objectif principal de cette sous-partie était donc d'évaluer l'intérêt de « nouveaux » marqueurs de dommages musculaires pour prédire la réduction de la fonction musculaire : les microARNs circulants et la raideur musculaire mesurée par élastographie. Le second objectif était d'évaluer si ces marqueurs étaient sensibles au « *repeated bout effect* ».

Sous-partie 2.1. Évaluation des microARNs circulants après des exercices induisant des dommages musculaires

D’importants niveaux circulants de microARNs spécifiques du tissu musculaire (myomiRs) ont été observés chez les patients atteints de dystrophie musculaire et d'infarctus du myocarde lorsqu’ils sont comparés à ceux de sujets sains (Cacchiarelli et coll., 2011; D'Alessandra et coll., 2010). Dans l'organisme sain, une augmentation des myomiRs a été observée après une lésion musculaire toxique chez le rat (Siracusa et coll., 2016) et après des courses de marathon (Baggish et coll., 2014). De plus, il a été rapporté que la capacité des myomiRs à distinguer les muscles endommagés des muscles sains était supérieure à celle de la CK (Banzet et coll., 2013; Siracusa et coll., 2016), ce qui suggère que les myomiRs peuvent diagnostiquer plus précisément les dommages musculaires que la CK. Cependant, la relation entre les miARNs circulants et l’altération prolongée de la fonction neuromusculaire n’a, jusqu’à présent, jamais été évaluée. L’objectif principal de cette sous-partie était donc d’évaluer l’intérêt des myomiRs circulants comme marqueurs précoces de dommages musculaires, *i.e*., leur capacité à prédire la réduction de la fonction neuromusculaire mesurée au-delà de 24 h après l’exercice.

I. Étude 2 : Niveaux circulants des microARNs après un ultra-marathon de 24 heures de course à pied en relation avec les marqueurs de dommages musculaires chez des athlètes élites

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* (annexe 4) :

Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes. **Chalchat E**, Charlot K, Garcia-Vicencio S, Hertert P, Baugé S, Bourdon S, Bompard J, Farges C, Martin V, Bourrilhon C, Siracusa J. Scand J Med Sci Sports. 2021 Sep;31(9):1782-1795. doi: 10.1111/sms.14000. Epub 2021 Jun 7.

A. Résumé

Introduction : Les sports d'ultra-endurance gagnent en popularité mais peuvent être associés à des effets néfastes pour la santé. Ces sports peuvent par exemple induire des dommages musculaires pouvant conduire à des insuffisances rénales aiguës. Les microARNs circulants peuvent être utiles pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires. L'objectif principal de cette étude était donc d'évaluer la pertinence des microARNs circulants comme marqueurs de dommages musculaires.

Méthode : Onze athlètes élite ont participé aux championnats du monde des 24 heures de course à pied. La hauteur du *counter-movement jump* (CMJ), l'activité de la créatine kinase (CK), la concentration de la myoglobine (Mb), et les niveaux de microARNs spécifiques au muscle (myomiRs) ont été mesurés avant, immédiatement après, puis 24 et 48 h après la course.

Résultats : La hauteur du CMJ a été réduite immédiatement après la course (-84,0 ± 25,2 %, $p < 0,001$) et est restée diminuée 24 h après (-43,6 ± 20,4 %, $p = 0,002$). Nous avons observé que l'activité de la CK était élevée (53 239 ± 63 608 U/L, $p < 0,001$) immédiatement après la course et qu'elle restait élevée 24 h après ($p < 0,01$). Les niveaux des myomiRs circulants (miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b, miR-208a-3p, miR-208b-3p et miR-499a-5p) étaient élevés immédiatement après la course des 24 h (18 à 124 723 fois la valeur de base, $p < 0,001$) et significativement ($p < 0,05$) corrélés ou tendaient à être significativement ($p < 0,07$) corrélés avec la réduction de la hauteur du CMJ à 24 h. Nous n'avons trouvé aucune corrélation significative entre la réduction de la hauteur du CMJ à 24 h et les valeurs de l'activité de la CK ($p = 0,23$) ou de la concentration de la Mb ($p = 0,41$).

Conclusion : Les niveaux de myomiRs circulants pourraient être utiles pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires et semblent mieux prédire l'amplitude de la perte de fonction musculaire mesurée au-delà de 24 h après l'exercice que les marqueurs classiques comme la CK ou la Mb.

B. Problématiques et objectifs

Les épreuves d'ultra-endurance et d'ultra-marathon (> 42,195 km) ont connu un essor considérable ces dernières années, donnant lieu à des événements sportifs extrêmement difficiles. Une course à pied de 24 h est une forme d'ultra-marathon dont le but est de courir la plus grande distance en 24 h sur un circuit relativement court (400 – 2500 m). Les records du monde actuels sont de 309,3 km pour les hommes et de 270,1 km pour les femmes, correspondant à des vitesses de course moyennes de ~12,9 et ~11,3 $km.h^{-1}$, respectivement. La durée extrême et le nombre élevé de cycles d'étirement-raccourcissement effectués par les muscles pendant la course des 24 h induisent, entre autres, un niveau élevé de fatigue et de dommages musculaires (Martin et coll., 2010). Les dommages musculaires se manifestent par une réduction prolongée de la FMV, l'apparition de courbatures, la diminution de l'amplitude de mouvement articulaire, ainsi que l'augmentation des niveaux de CK et de Mb dans le sang.

Bien que la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire (i.e., au-delà de 24 h) soit considérée comme le meilleur marqueur indirect pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires induits par l'exercice (Warren et coll., 1999), une mesure précoce (*i.e.*, quelques heures après la fin de l'exercice) peut refléter une combinaison des dommages musculaires et de la fatigue musculaire plutôt que des dommages musculaires uniquement (Millet et coll., 2011b; Warren et coll., 1999). Ce marqueur ne semble donc pas adapté pour un diagnostic précoce des dommages musculaires. Pourtant, des contre-mesures rapides sont nécessaires pour adapter au mieux les stratégies de récupération et de gestion des charges d'entrainement.

Les niveaux de CK et de Mb sont les marqueurs les plus couramment utilisés pour diagnostiquer les dommages musculaires (Lippi et coll., 2018), mais leur interprétation est limitée en raison d'un manque de consensus dans les seuils diagnostics utilisés (CK : 1 000 à 10 000 U/L, Mb : 400 à 4 000 ng/mL) (Servonnet et coll., 2018; Stahl et coll., 2020). En effet, ces marqueurs sont affectés par une forte variabilité interindividuelle et ne reflètent pas nécessairement l'amplitude de la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire (Damas et coll., 2016). Il semble donc nécessaire de chercher de nouveaux marqueurs augmentant dans les premières heures après l'effort et permettant de prédire avec précision l'amplitude des dommages musculaires.

Les microARNs (miARNs), de petits ARNs non-codants impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes, peuvent potentiellement servir de marqueurs alternatifs de dommages musculaires (Baggish et coll., 2014; Banzet et coll., 2013). En effet, certains miARNs (miR-1, -133a, -133b, -206, -208a, -208b, et -499) ont été décrits comme étant

spécifiques/abondants au tissu musculaire (muscle cardiaque et squelettique). Parmi eux, deux se retrouvent spécifiquement dans le muscle squelettique (miR-133b et -206) et un dans le muscle cardiaque (miR-208a) (Siracusa et coll., 2016). Ces miARNs spécifiques/abondants (également appelés myomiRs) peuvent être libérés vers le milieu extracellulaire par des mécanismes passifs ou actifs, et peuvent donc être mesurés dans le sang. Des niveaux importants de myomiRs sériques/plasmatiques ont été retrouvés chez les patients atteints de dystrophie musculaire et d'infarctus du myocarde par rapport aux sujets sains (Cacchiarelli et coll., 2011; D'Alessandra et coll., 2010). Dans l'organisme sain, une augmentation de myomiRs a été observée après une lésion musculaire toxique chez le rat (Siracusa et coll., 2016) et après une course de marathon (Baggish et coll., 2014). De plus, il a été rapporté que la capacité des myomiRs à distinguer les muscles lésés des muscles sains était supérieure à celle de la CK (Banzet et coll., 2013; Siracusa et coll., 2016), ce qui suggère que les myomiRs peuvent diagnostiquer plus précisément les dommages musculaires que la CK. Bien qu'aucune étude n'ait étudié la relation entre les niveaux de myomiRs et la fonction musculaire squelettique, Corsten et coll. (2010) ont montré une bonne corrélation entre les niveaux de miR-499 et de troponine T chez les patients atteints d'infarctus du myocarde, ce qui suggère que les myomiRs pourraient être utiles pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires.

L'objectif de cette étude était donc d'évaluer la pertinence des miARNs circulants comme marqueurs des dommages musculaires, en évaluant leur capacité à prédire la réduction de la fonction neuromusculaire mesurée au-delà de 24 h après un ultra-marathon de 24 h.

C. Procédures expérimentales

1. Participants

Les athlètes sélectionnés par l'équipe de France pour participer aux championnats du monde de 24 h de course à pied en 2019 se sont portés volontaires pour participer à l'**étude 2**. L'équipe de France était composée de six femmes (âge : 43,8 ± 8,4, taille : 1,64 ± 0,05 m, poids : 55,0 ± 7,4 kg, indice de masse corporel : 20,4 ± 2,6 $kg.m^{-2}$, masse grasse : 17.6 ± 5,4 %) et de 5 hommes (âge : 48,2 ± 5,9, taille : 1,77 ± 0,07 m, poids : 68,3 ± 6,6 kg, indice de masse corporel : 21,7 ± 1,0 $kg.m^{-2}$, masse grasse : 8,7 ± 3,9 %). Les procédures expérimentales ont été approuvées et autorisées par le Comité de Protection des Personnes Ile-de-France 8 (France, numéros d'autorisation : 2019-A02445-52).

2. Protocole

Cette étude a été menée lors des championnats du monde IAU 24H 2019 qui se sont déroulés à Albi (France) du 26 au 27 octobre 2019. La course consistait à courir la plus grande distance possible pendant 24 h (départ de la course à 10h00 le premier jour) sur une boucle de 1,491 km, composée de bitume (~75 %) et de piste d'athlétisme (~25 %) (**Figure 35**). La hauteur de saut vertical (indicateur de la fonction musculaire) et les douleurs musculaires ont été évaluées 26 h avant (entre 7h00 et 9h00, PRE), dans l'heure suivant la fin de la course (POST), puis 24 et 48 h après la course (**Figure 35**). Des prélèvements sanguins ont été effectués aux mêmes moments pour les analyses biologiques. Les prélèvements ont été effectués le matin à jeun. Les apports alimentaires ont été suivis pendant la course (Lavoué et coll., 2020). Comme le personnel médical a déconseillé à certains participants d'effectuer le CMJ, un participant (POST), deux participants (24 h) et quatre participants (48 h) n'ont pas effectué le CMJ. Les participants avaient pour consigne d'éviter toute activité physique les deux jours suivant la course. L'activité de la créatine kinase, la concentration de la myoglobine et de la troponine cardiaque hautement sensible T (hs-cTnT), et les niveaux circulants des miARNs d'intérêt (*i.e.*, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR208b-3p, hsa-miR-378a-3p, and hsa-miR-499a-5p) ont été analysés à tous les temps de mesure.

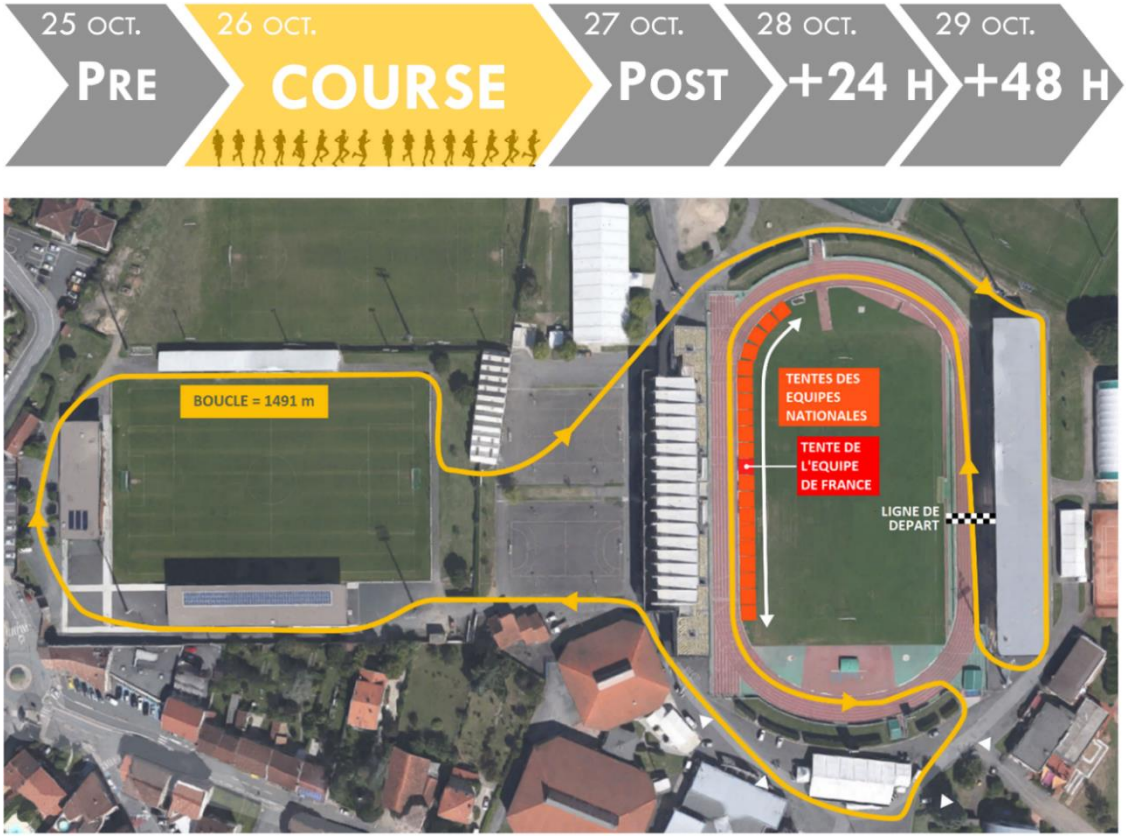


Figure 35. Design expérimental de l'étude 1 avec vue aérienne du parcours (boucle) de la course. *La vue aérienne a été extraite de ®Google Maps.*

3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées pour évaluer les changements entre les mesures PRE, POST et 24 h et 48 h après la course. En raison de la taille limitée de l'échantillon dans notre étude et de l'absence d'une distribution normale des données selon les tests de Shapiro-Wilk, nous avons effectué une analyse de variance de Friedman non-paramétrique. Les différences statistiques entre les temps de mesures ont été évaluées à l'aide du test de comparaisons multiples de Dunn. La statistique du test de Friedman χ^2 et la taille de l'effet (W de Kendall) ont été rapportées. La valeur du coefficient W de Kendall varie entre 0 (aucune relation) et 1 (relation parfaite). Les données manquantes ont été imputées à l'aide du package MissMDA R. Des corrélations ont été réalisées entre la perte de hauteur de saut (CMJ) à 24 h et les modifications des niveaux circulants de la CK, de la Mb, des miARNs et de douleurs musculaires mesurées immédiatement après la course. En effet, comme la diminution de la fonction musculaire (*i.e.*, la hauteur de saut lors d'un CMJ) à 24 h est considérée comme le meilleur marqueur indirect pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires induits par l'exercice (Warren et coll., 1999), toute corrélation significative suggère que la mesure associée pourrait être utile pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires. Le niveau d'association entre les paramètres a été évalué à l'aide du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ). Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$. Les analyses ont été effectuées à l'aide de GraphPad Prism (version 8.4.3, GraphPad Software, CA, Etats-Unis) et R (version 3.6.1, R Core Team (2017). R : A Language and Environment for Statistical Computing, disponible sur : https://www.R-project.org/). Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type.

D. Résultats

1. Hauteur de saut

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps sur la hauteur du CMJ ($P < 0,001$; $\chi2 = 28,64$; Kendall's W = 0,87). La hauteur de saut initiale était de 19,6 ± 3,7 cm. La hauteur du CMJ a été réduite d'environ 84 % (2,8 ± 4,1 cm ; $p < 0,001$) immédiatement après la course, cinq des participants étant incapables de sauter (**Figure 36**). La hauteur du CMJ est restée diminuée d'environ 44 % (10,9 ± 5,0 cm ; $p = 0,002$; **Figure 36a**) 24 h après la fin de la course. Bien qu'elle ne soit pas statistiquement différente des valeurs PRE ($p = 0,19$), la hauteur de saut était encore réduite d'environ 30% à 48 h (13,0 ± 4,6 cm ; **Figure 36a**).

2. Douleurs musculaires

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps sur les douleurs musculaires du quadriceps ($p < 0,001$; $\chi2 = 19,36$; W de Kendall = 0,587). Les douleurs musculaires des athlètes étaient significativement plus élevée immédiatement et 24 h après la fin de la course (**Figure 36b**).

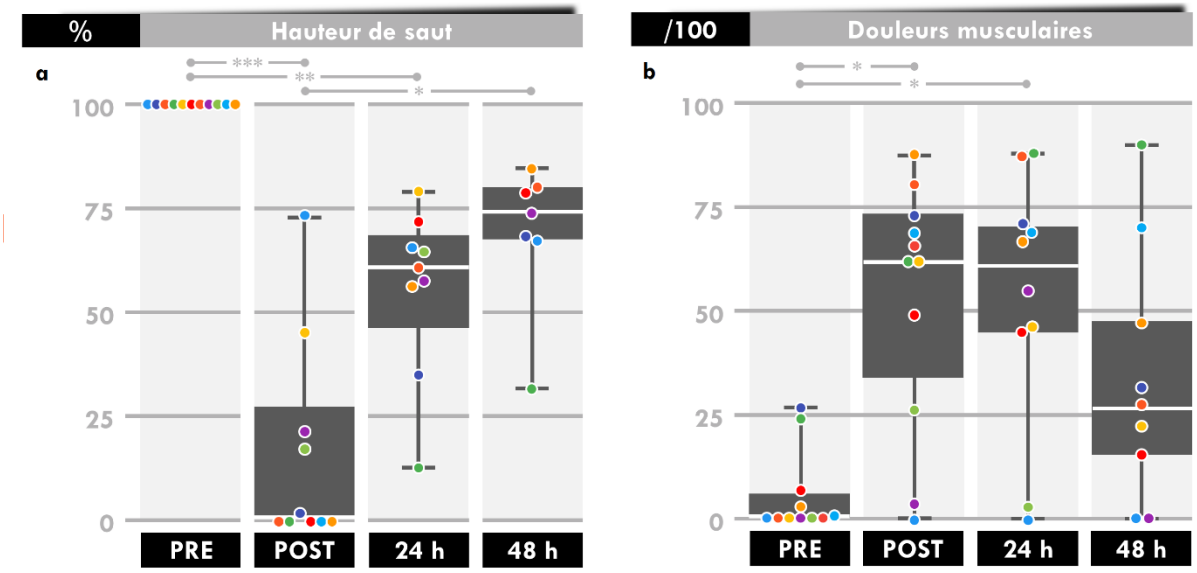


Figure 36. Modifications de la hauteur du saut (a) et des douleurs musculaires du quadriceps (b) après la course d'ultra-marathon de 24 h. *Les valeurs de hauteur de saut et de douleurs musculaires sont exprimées en pourcentage de la valeur initiale (PRE) et en mm (sur une échelle de 0 à 100 mm), respectivement. Les données sont exprimées par l'écart interquartile (25ème et 75ème percentiles ; rectangle gris), la médiane (barre blanche horizontale), le minimum-maximum (moustaches) et les valeurs individuelles (points). * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001.*

3. Marqueurs sanguins classiques de dommages musculaires

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps sur l'activité de la CK ($P < 0,001$; $\chi2 = 31,91$; Kendall's W = 0,97), la concentration de la Mb ($p < 0,001$; $\chi2 = 30,00$; Kendall's W = 1,0), et de la concentration de hs-cTnT ($p < 0,001$; $\chi2 = 28,90$; W de Kendall = 0,88). L'activité de la CK était significativement inférieure à PRE (137 ± 112 U/L) comparée à POST (53 239 ± 63 608 U/L ; $p < 0,001$) et 24 h (19 432 ± 20 947 U/L ; $p = 0,003$) mais il n'y avait aucune différence significative entre les valeurs PRE et 48 h (9 456 ± 13 767 U/L ; $p = 0,29$) (**Figure 37a**). La concentration de Mb était significativement inférieure à PRE (34 ± 19 ng/mL) comparée à POST (9 748 ± 7997 ng/mL ; $p < 0,001$) et 24 h (669 ± 585 ng/mL ; $p = 0,002$) mais n'était pas significativement différente des valeurs à 48 h (242 ± 255 ng/mL ; $p = 0,42$) (**Figure 37b**). Les valeurs de hs-cTnT étaient significativement plus élevées à POST (34,1 ± 18,3 ng/L) qu'à PRE (6,3 ± 2,3 ng/L ; $p < 0,001$) mais il n'y avait pas de différence significative

entre les valeurs PRE et les valeurs mesurées 24 h (14,6 ± 8,0 ng/L ; p = 0,06) ou 48 h (8,3 ± 6,9 ng/L ; p = 1,00) après l'exercice.

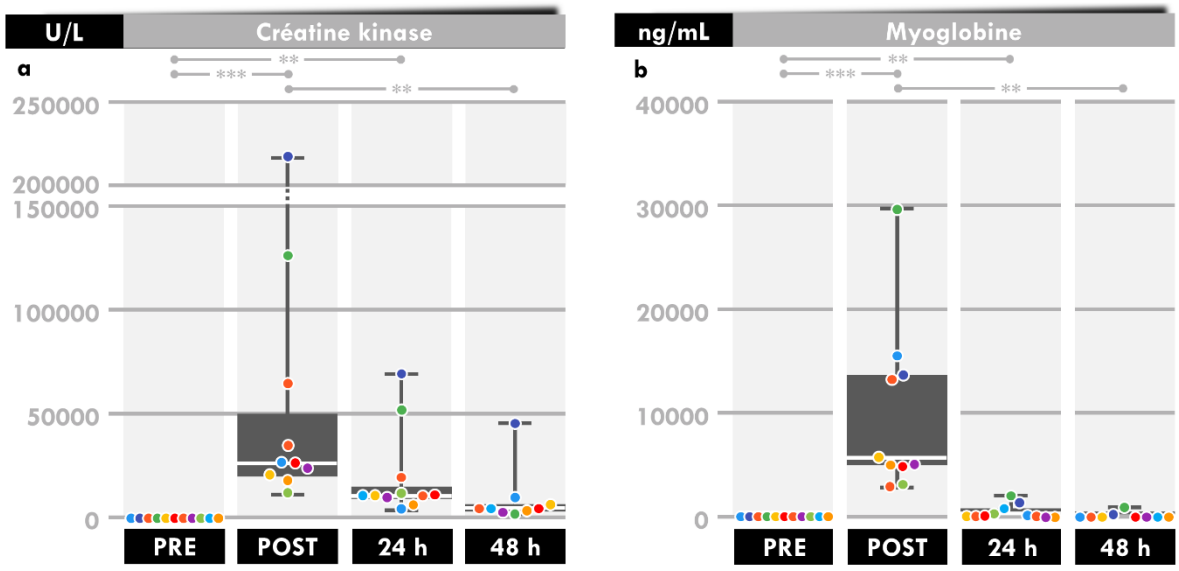
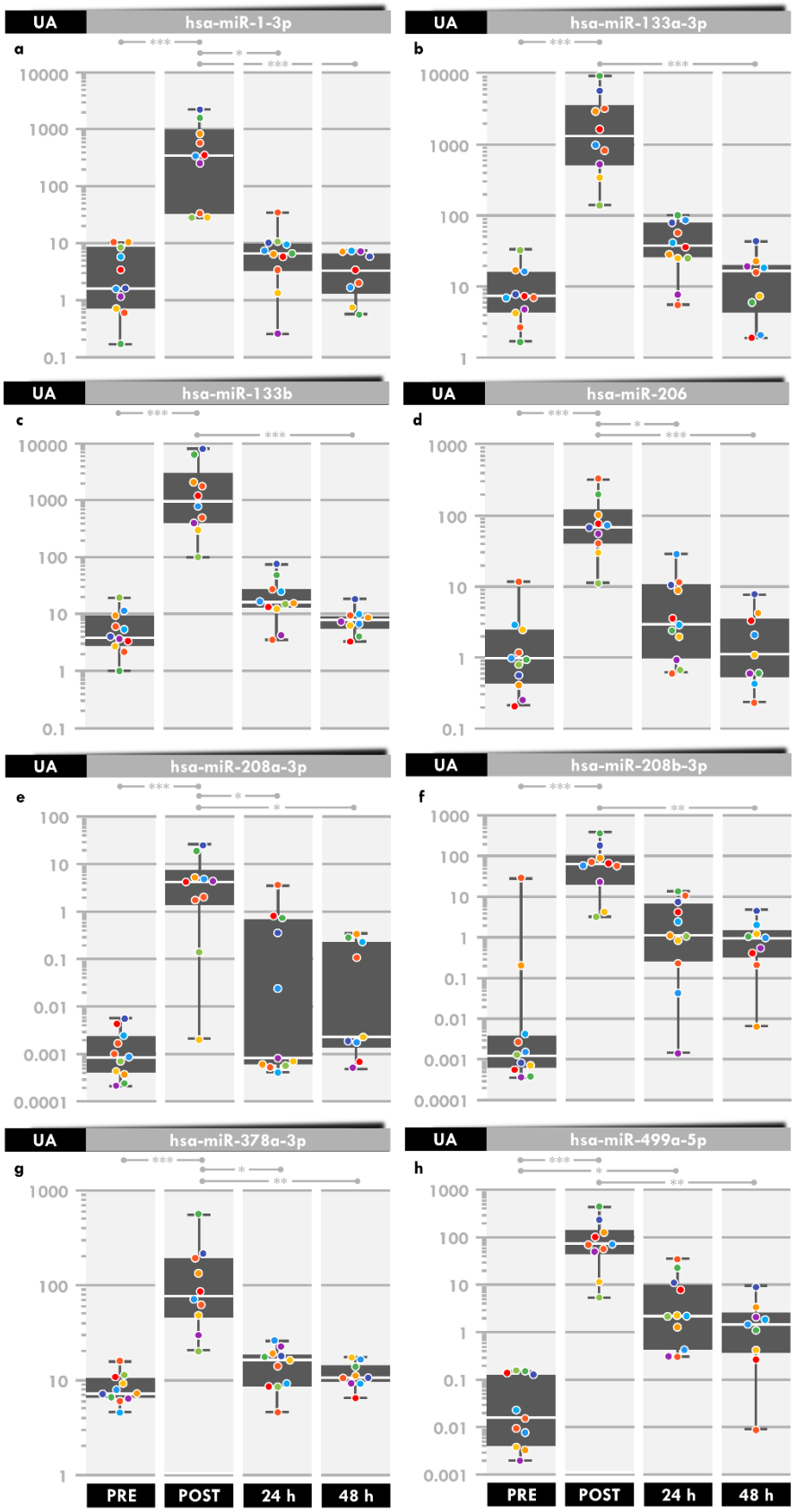


Figure 37. Modifications de l'activité de la créatine kinase (a) et de la concentration de myoglobine (b). *Les données sont exprimées par l'écart interquartile (25ème et 75ème percentiles ; rectangle gris), la médiane (barre blanche horizontale), le minimum-maximum (moustaches) et les valeurs individuelles (points). * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001.*

4. Niveaux circulants des miARNs

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps sur les niveaux de hsa-miR-1-3p (p < 0,001 ; $\chi 2 = 23,18$; W de Kendall = 0,70), hsa-miR-133a-3p (P < 0,001 ; $\chi 2 = 24,49$; W de Kendall = 0,74), hsa-miR-133b (P < 0,001 ; $\chi 2 = 24,05$; W de Kendall = 0,73), hsa-miR-206 (P < 0,001 ; $\chi 2 = 22,75$; W de Kendall = 0,69), hsa-miR-208a-3p (P < 0,001 ; $\chi 2 = 20,78$; W de Kendall = 0,63), hsa-miR-208b-3p (P < 0,001 ; $\chi 2 = 26,02$; W de Kendall = 0,79), hsa-miR-378-3p (P < 0,001 ; $\chi 2 = 21,87$; W de Kendall = 0,66), et hsa-miR-499a-5p (P < 0,001 ; $\chi 2 = 28,96$, ; W de Kendall = 0,88). Nous avons observé une augmentation significative des niveaux des miARNs circulants (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR- 208b-3p, hsa-miR-378-3p et hsa-miR-499a-5p) immédiatement après la course de 24 h (18 à 124 723 fois la valeur PRE ; p < 0,001 ; **Figure 38**). Les niveaux circulants de hsa-miR-499a-5p (p = 0,02) et hsa-miR-208b-3p (p = 0,08) sont restés élevés ou avaient tendance à rester élevés 24 h après la fin de la course (**Figure 38**).

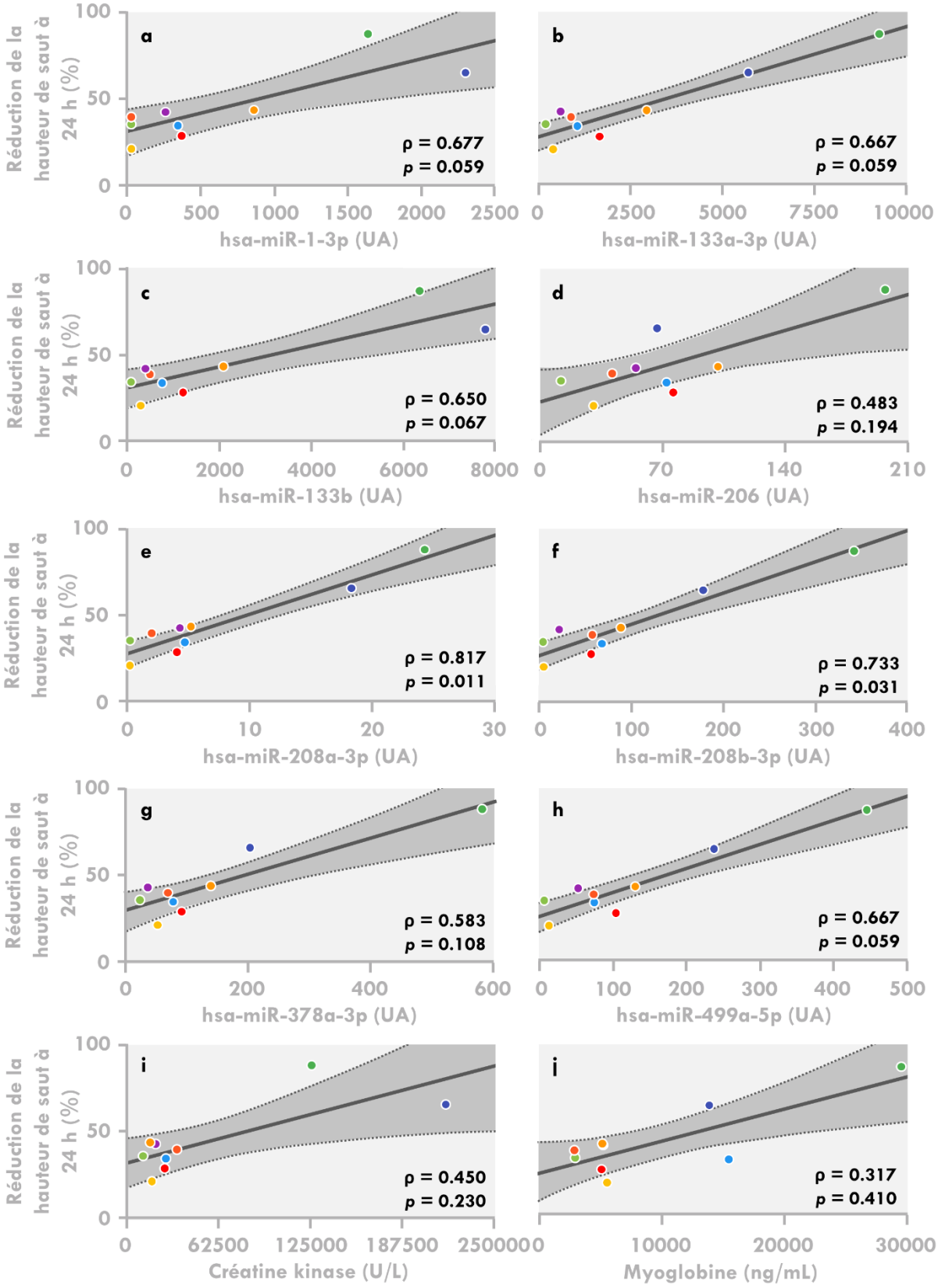
Figure 38. Modifications des niveaux plasmatiques de miARNs après la course d'ultra-marathon de 24 h pour l'homo sapiens (hsa)-miR-1-3p (a), hsa-miR-133a-3p (b), hsa-miR-133b (c), hsa-miR-206 (d), hsa-miR-208a-3p (e), hsa-miR-208b-3p (f), hsa-miR-378a-3p (g) et hsa-miR-499a- 5p (h). *Les données sont exprimées par l'écart interquartile (25ème et 75ème percentiles ; rectangle gris), la médiane (barre blanche horizontale), le minimum-maximum (moustaches) et les valeurs individuelles (points). UA : unité arbitraire (abondance relative). * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001.*



5. Corrélations avec la réduction de la hauteur de saut à 24 h

Les niveaux circulants de hsa-miR-208a-3p et hsa-miR-208b-3p mesurés immédiatement après la fin de l'ultra-marathon étaient significativement corrélés à la réduction de la hauteur de saut (CMJ) mesurée à 24 h ($p < 0,05$) et approchaient la significativité pour hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b et hsa-miR-499a-5p ($p < 0,07$) (**Figure 39**). Nous n'avons trouvé aucune corrélation significative entre la réduction de la hauteur du CMJ mesurée 24 h après l'exercice et les niveaux circulants de CK ($p = 0,23$) ou de Mb ($p = 0,31$) mesurés à la fin de l'ultra-marathon (**Figure 39**). Enfin, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre les niveaux de CK, de Mb, de cTnT, les douleurs musculaires et les niveaux myomiRs pour les différents temps de mesure.

Figure 39. Corrélations entre la réduction de la hauteur du saut mesurée 24 h après la fin de la course et les niveaux plasmatiques d'homo sapiens (hsa)-miR-1-3p (a), hsa-miR-133a-3p (b), hsa-miR-133b (c), hsa-miR-206 (d), hsa- miR-208a-3p (e), hsa-miR-208b-3p (f), hsa-miR-378a-3p (g), hsa-miR-499a-5p (h), créatine kinase (i), et myoglobine (j). *UA : unité arbitraire (abondance relative). Les valeurs du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) et de p sont affichées pour chaque corrélation.*



E. Discussion

L'objectif principal de cette étude était d'étudier la pertinence des niveaux de miARNs circulants comme marqueurs de dommages musculaires. Nous avons observé une augmentation du niveau de tous les miARNs spécifiques du muscle immédiatement après la fin de l'exercice. De plus, cette augmentation était souvent corrélée à la fonction musculaire mesurée 24 h après la fin de la course d'ultra-marathon. En revanche, les niveaux de CK et de Mb n'étaient pas corrélés à la fonction musculaire, confirmant l'hypothèse selon laquelle les niveaux des myomiRs pourraient être plus représentatifs des dommages musculaires que les marqueurs les plus couramment utilisés.

1. Modifications des marqueurs classiques de dommages musculaires

Dans notre étude, la fonction musculaire mesurée 24 h après la fin de l'exercice était réduite d'environ 40 % et était encore diminuée d'environ 30 % 48 h après l'exercice. A notre connaissance, une seule étude a décrit la récupération de la fonction musculaire des membres inférieurs dans les jours suivant une course d'ultra-marathon (Millet et coll., 2011b). Les auteurs (Millet et coll., 2011b) ont évalué la fonction musculaire différemment de notre étude et ont signalé une diminution plus faible de la fonction musculaire (une perte d'environ 10 à 15 % des moments de force des extenseurs du genou et des fléchisseurs plantaires 48 h après la course). Cette plus petite réduction de la fonction musculaire est cohérente avec la plus petite activité de la CK (~16 000 U/L *vs*. ~43 000 U/L) et la moindre concentration de la Mb (~1 400 ng/mL *vs*. ~9 700 ng/mL) mesurées immédiatement après un ultra-marathon de 166-km en montagne (Millet et coll., 2011b) par rapport aux résultats rapportés dans notre étude, ce qui suggère une amplitude de dommages musculaires plus importante dans notre étude. Tous nos participants présentaient une hyperCKémie (CK > 10 000 U/L) immédiatement après la course et 8 des 11 participants avaient encore des taux de CK supérieurs à 10 000 U/L 24 h plus tard. Les courses d'ultra-marathon de 24 h sont connues pour induire des dommages musculaires, cependant, les réponses de la CK et de la Mb étaient plus élevées dans notre étude que dans celle de Martin et coll. (2010) et Waśkiewicz et coll. (2012). La distance plus élevée parcourue par nos athlètes par rapport à ces études (Martin et coll., 2010; Waśkiewicz et coll., 2012) (~230 km *vs*. 150-170 km) pourrait expliquer l'activité de la CK plus élevée. En effet, la distance parcourue lors de l'exercice peut augmenter l'amplitude des dommages musculaires (Clarkson & Hubal, 2002). L'activité de la CK observée après la course dans notre étude est par ailleurs cohérente avec les valeurs rapportées après le *Spartathlon*, une course à pied de 246 km (Skenderi et coll., 2006).

D'autre part, malgré le niveau plus élevé des marqueurs de dommages musculaires observés après l'ultra-marathon de 24 h par rapport à ceux rapportés par Millet et coll. (2011b), nos participants ont rapporté un niveau similaire de douleurs musculaires, suggérant que les athlètes élites sont moins sensibles aux douleurs musculaires.

2. Modifications des niveaux circulants des miARNs

Dans cette étude, les niveaux de tous les miARNs plasmatiques ont augmenté de manière significative immédiatement après la course par rapport aux valeurs initiales, ce qui suggère que les niveaux des myomiRs sont sensibles aux exercices d'ultra-endurance. Cette réponse à l'exercice a déjà été observée dans diverses conditions d'exercice (Baggish et coll., 2011; Banzet et coll., 2013; Clauss et coll., 2016; Mooren et coll., 2014; Ramos et coll., 2018). Bien qu'aucune étude n'ait étudié les niveaux des myomiRs circulants après des courses d'ultra-endurance (connues pour être un bon modèle pour induire dommages musculaires (Martin et coll., 2010; Millet et coll., 2011b)), plusieurs études ont montré une augmentation des myomiRs après des marathons (Baggish et coll., 2011; Clauss et coll., 2016; Mooren et coll., 2014). De manière similaire à nos résultats, ces études ont décrit une augmentation des niveaux circulants de miR-1, miR-133a, miR-206, miR-208b et miR-499a immédiatement après l'exercice. Cependant, l'amplitude de l'augmentation était inférieure à celle rapportée dans notre étude. Cela pourrait s'expliquer par une durée d'exercice plus courte qui pourrait induire de moindres dommages musculaires et/ou une durée de libération dans la circulation plus courte. En effet, ces études (Baggish et coll., 2011; Clauss et coll., 2016; Mooren et coll., 2014) ont rapporté des réponses de l'activité de la CK plus faibles (~600 U/L ; ~4x la valeur de base ; ~2 000 U/L) que celles observées dans notre étude. Il a souvent été rapporté que les miARNs circulants avaient une demi-vie plutôt courte dans le sang, avec une élimination rapide de la circulation suite à une lésion tissulaire aiguë (*e.g.*, muscle squelettique/cardiaque, foie), possiblement par une élimination rénale (Cheng et coll., 2012) ou absorption/biodistribution tissulaire (Bala et coll., 2015). Cependant, les mécanismes de clairance des miARNs circulants sont mal compris et on ne peut pas exclure le fait que la vitesse de libération des miARNs dans le sang dépasse la vitesse de clairance après des dommages musculaires induits par un exercice prolongé de 24 h. Par ailleurs, toutes les études de la littérature qui ont étudié les réponses des miARNs après l'exercice n'ont pas forcément interprété les niveaux élevés de miARNs circulants comme indiquant des dommages musculaires. Par exemple, Mooren et coll. (2014) ont suggéré que les myomiRs pourraient être des marqueurs de la capacité aérobie à l'exercice. Ramos et coll.

(2018) ont montré que les niveaux circulants de miR-1 et de miR-133a étaient liés à l'intensité et à la durée de la course d'endurance, suggérant que les miARNs pourraient être impliqués dans l'adaptation physiologique à l'exercice. En effet, Guescini et coll. (2015) ont montré que les vésicules extracellulaires issues du muscle squelettique pouvaient être enrichies en myomiRs, lesquels sont connus pour être impliqués dans le maintien de l'homéostasie musculaire (Diniz & Wang, 2016).

Le design expérimental de notre étude ne permettait pas de savoir si les augmentations des miARNs circulants observés après l'exercice étaient dues à une sécrétion active ou passive. Cependant, l'amplitude des augmentations post-exercice rapportés dans les études précédentes (Baggish et coll., 2014; Mooren et coll., 2014; Ramos et coll., 2018) était considérablement inférieures à celles rapportées dans notre étude (18–124 723 fois la valeur de base). Ramos et coll. (2018) ont montré que les niveaux circulants de miR-1 et miR-133a pouvaient être jusqu'à 5 fois plus important après 90 min de course comparé aux valeurs de base et d'autres auteurs (Baggish et coll., 2014; de Gonzalo-Calvo et coll., 2015) ont montré que miR-1, miR -133a, mir-133b et miR-499 pouvaient présenter des niveaux jusqu'à 18,5 fois les valeurs de base après un marathon. Ainsi, il semble peu probable que les fortes augmentations des niveaux des miARNs circulants que nous avons observées soient uniquement dues à une sécrétion active induite par l'exercice (Ramos et coll., 2018) mais pourraient aussi provenir d'une libération passive des myocytes lésés (Banzet et coll., 2013). En effet, l'augmentation des niveaux circulants des miARNs observée après la course dans notre étude est supérieure à celle rapportée après une lésion musculaire toxique chez le rat (Siracusa et coll., 2016). Des niveaux élevés de miARNs circulants ont également été rapportés dans des études chez l'homme sur des lésions musculaires pathologiques (Cacchiarelli et coll., 2011; D'Alessandra et coll., 2010) et physiologiques (Banzet et coll., 2013). Banzet et coll. (2013) ont rapporté une augmentation du niveau de plusieurs myomiRs circulants dans le plasma après un exercice excentrique connu pour induire des dommages musculaires, mais pas après un exercice concentrique. Par ailleurs, une corrélation positive apparait entre les niveaux de miR-133a et de CK (Mooren et coll., 2014) et entre les niveaux de miR-1/miR-133a et de CK/troponine T (Clauss et coll., 2016), suggérant que ces myomiRs pourraient être utiles pour le diagnostic des dommages musculaires et du stress cardiaque. Bien qu'aucune corrélation entre les niveaux des myomiRs et de la CK/troponine T n'ait été observée dans notre étude, les corrélations positives observées entre le niveau de certains myomiRs et la perte de la fonction musculaire 24 h après la course suggèrent que les myomiRs circulants pourraient être représentatifs du niveau de dommages

musculaires. Cependant, il reste à déterminer si ces myomiRs ont été sécrétés activement ou passivement par les myocytes lésés.

3. Intérêt des marqueurs pour prédire la perte prolongée de la fonction musculaire

Dans cette étude, l'activité de la CK et la concentration de Mb mesurées immédiatement après la fin de l'exercice n'étaient pas corrélées avec la fonction musculaire mesurée 24 h plus tard, ce qui suggère que ces marqueurs ne reflètent pas l'amplitude des dommages musculaires induits par l'exercice. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Damas et coll. (2016), qui ont observé une forte variabilité interindividuelle de l'activité de la CK par rapport à l'amplitude de la réduction prolongée de la fonction musculaire après des contractions excentriques des fléchisseurs du coude. Nos résultats sont également cohérents avec l'absence de consensus dans les seuils utilisés pour l'activité de la CK (1 000 à 10 000 U/L) (Stahl et coll., 2020) et la concentration en Mb (400 à 4 000 ng/mL) (Servonnet et coll., 2018) pour diagnostiquer les dommages musculaires. Ainsi, bien que ces marqueurs couramment utilisés soient encore d'une grande utilité pour détecter la présence de dommages musculaires, leur capacité à quantifier l'amplitude des dommages semble limitée.

Nous avons observé des corrélations significatives ou qui tendaient à être significatives entre le niveau de la plupart des miARNs circulants mesurés immédiatement après l'ultra-marathon de 24 h et la fonction musculaire mesurée 24 h plus tard. Cependant, nous n'avons observé aucune corrélation entre la perte de fonction musculaire à 24 h et les niveaux de CK ou de Mb, ce qui suggère que les myomiRs pourraient être plus pertinents que la CK ou la Mb pour représenter l'amplitude des dommages musculaires dans notre étude (**Figure 39**). Bien que d'autres études soient nécessaires pour confirmer cette hypothèse, ces résultats sont cohérents avec ceux de Siracusa et coll. (2016), qui ont rapporté que la précision des myomiRs pour distinguer les muscles endommagés et non-endommagés chez les rats était meilleure que celle de la CK. De plus, nos résultats sont également concordants avec ceux d'une autre étude (Banzet et coll., 2013), qui a rapporté que les niveaux de myomiRs circulants sont capables de faire la distinction entre les exercices de marche en montée et en descente, alors que les niveaux de CK de Mb ne le permettaient pas, suggérant que les myomiRs pourraient être plus sensibles et spécifiques aux dommages musculaires que les marqueurs classiques.

De plus, miR-206, miR-208b-3p et miR-499a-5p peuvent présenter un intérêt supplémentaire en raison de leurs faibles niveaux circulants car ils sont souvent indétectables en l'absence de lésions musculaires (**Figure 38**) (Banzet et coll., 2013; Siracusa et coll., 2016).

En effet, il a été montré que hsa-miR-206 était indétectable après des dommages musculaires de faible amplitude (perte de ~15% de la fonction musculaire à 24 h) (Banzet et coll., 2013), alors qu'un niveau élevé était détecté après un marathon (Mooren et coll., 2014) et dans la présente étude. De plus, hsa-miR-208b-3p et hsa-miR-499a-5p semblent avoir une utilité supplémentaire par rapport aux autres myomiRs car leurs niveaux plasmatiques étaient encore élevés 24 h après la fin de l'ultra-marathon (**Figure 38**). Cependant, nous n'avons trouvé aucune corrélation significative entre les niveaux circulants de ces miARNs mesurés 24 h après la fin de l'ultra-marathon et la fonction musculaire, suggérant une utilité limitée pour suivre la récupération après une lésion musculaire (24 - 48 h). Des travaux antérieurs ont montré que certains myomiRs pouvaient rester élevés jusqu'à 24 h après une lésion tissulaire. Par exemple, le niveau de miR-1 était encore augmenté dans le sérum 24 h après un infarctus aigu du myocarde chez le rat (Cheng et coll., 2010). Des cinétiques similaires ont également été rapportées dans le plasma de rats suite à une lésion myotoxique aiguë puisque miR-208b est resté augmenté après 24 h (Siracusa et coll., 2016). Cependant, il ne semble actuellement pas y avoir d'explications solides permettant d'expliquer ces cinétiques. Les myomiRs semblent exercer divers rôles dans la biologie musculaire. Par exemple, miR-1 et miR-206 ciblent *Pax3* pendant le processus de myogenèse (Goljanek-Whysall et coll., 2011), tandis que miR-208b et miR-499 semblent avoir un rôle dans le maintien des myofibres lentes et la répression du phénotype des myofibres rapides (van Rooij et coll., 2009). Comme les niveaux circulants de tous les myomiRs étaient bien corrélés entre eux, la mesure simultanée des myomiRs ne semble pas forcément nécessaire dans la pratique clinique. Comme suggéré par Siracusa et coll. (2016), l'évaluation des miARNs spécifiques des muscles cardiaques et squelettiques (*i.e.* hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, and hsa-miR-133b or hsa-miR-206) pourrait fournir une information suffisante pour le diagnostic des dommages musculaires.

De façon surprenante, hsa-miR-208a-3p était corrélé à la fonction musculaire dans notre étude, alors que ce myomiR est spécifique au cœur (D'Alessandra et coll., 2010) et n'est pas détecté après une lésion musculaire toxique chez le rat (Siracusa et coll., 2016) ou une marche en descente chez l'homme (Banzet et coll., 2013). Il est possible que les sujets présentant des niveaux élevés de stress cardiaque soient également ceux qui ont subi un degré élevé de lésions musculaires. Les covariables, telles que l'intensité de l'exercice ou l'expérience d'entraînement, peuvent affecter à la fois les dommages musculaires (Ertel et coll., 2020) et le stress cardiaque (Gresslien & Agewall, 2016) et peuvent donc expliquer cette corrélation surprenante. Nous n'avons trouvé aucune corrélation significative entre les niveaux de hs-cTnT mesurés

immédiatement après la course et le CMJ mesuré 24 h plus tard, ce qui ne permet pas de vérifier cette hypothèse. De plus, aucune corrélation n'a été trouvée entre miR-208a, la troponine et les paramètres de la fonction cardiaque dans l'infarctus aigu du myocarde et les maladies coronariennes (Nabiałek et coll., 2013). Par conséquent, d'autres études sont nécessaires pour interpréter l'amplitude des modifications de marqueurs de dommages cardiaques après l'exercice.

4. Limites

Quelques limites peuvent être relevées dans cette étude. Premièrement, nous avons inclus un nombre relativement faible de participants en raison du nombre limité d'athlètes sélectionnés en Équipe de France, ce qui ne permettait pas de tester un potentiel effet du sexe. Cependant, Duttagupta et coll. (2011) ont montré que les myomiRs n'étaient pas mentionnés parmi les miARNs exprimés différemment entre les hommes et les femmes. Nielsen et coll. (2013) ont trouvé un effet du sexe sur l'expression de myomiRs (souris ; miR-133a et miR-133b) dans le muscle squelettique au repos en lien avec la testostérone, mais ces auteurs ont également montré que l'entraînement aérobie semble effacer les effets de la testostérone. Par conséquent, il semble que la différence potentielle d'expression de myomiRs dans le muscle squelettique ne semble pas se traduire par un niveau de myomiRs circulants différent. De plus, Siracusa et coll. (2016) ont trouvé des niveaux de myomiRs circulants similaires entre des rats femelles et mâles, même en réponse à des lésions musculaires. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les myomiRs circulants n'étaient probablement pas sensiblement affectés par le sexe dans notre étude. Deuxièmement, le groupe expérimental de cette étude était restreint à des athlètes élites dans un contexte de championnat du monde. D'une part, d'autres études sont nécessaires pour déterminer si les résultats des miARNs peuvent être reproduits et s'appliquer à une population plus large. D'autre part, comme ce type d'épreuve compétitive peut entraîner un stress physiologique important, des problèmes de santé peuvent survenir nécessitant un suivi médical rigoureux (Rojas-Valverde et coll., 2020). Dans ce contexte, l'évaluation des mesures scientifiques n'était pas forcément prioritaire, expliquant pourquoi certaines données sont manquantes. Troisièmement, les apports alimentaires n'étant pas contrôlés lors de la course du fait du cadre compétitif de l'épreuve d'ultra-endurance (Lavoué et coll., 2020), des différences interindividuelles pourraient avoir affecté les niveaux des miARNs circulants (Mantilla-Escalante et coll., 2019). Quatrièmement, malgré l'utilisation d'une technique de normalisation RT-qPCR fiable et reproductible (Faraldi et coll., 2018), il est impossible de comparer les

résultats des différentes études sans tenir compte des valeurs de base (*i.e.*, les valeurs des sujets sains au repos). Par conséquent, aucune recommandation clinique ne peut être fournie avec ce type de normalisation. Enfin, l'évaluation des niveaux plasmatiques des miARNs étant un processus long (~6 h ; extraction de l'ARN et RT-qPCR), ce marqueur n'est pas compatible avec un diagnostic précoce. Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour développer des méthodes analytiques plus rapides qui pourraient être plus appropriées au contexte clinique. De nouvelles techniques récemment développées (Anfossi et coll., 2018) pourraient, à l'avenir, permettre une utilisation plus répandue des miARNs circulants comme marqueurs de dommages musculaires.

F. Conclusion

La présente étude est la première à montrer que les niveaux circulants des miARNs spécifiques au muscle sont mieux associés à l'amplitude de la réduction prolongée de la fonction musculaire que les niveaux circulant de la CK et de la Mb, ce qui suggère que les myomiRs circulants pourraient être utiles pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires. L'évaluation des niveaux circulants des miARNs spécifiques aux muscles cardiaques et squelettiques tels que hsa-miR-208a, hsa-miR-208b et hsa-miR-133b ou hsa-miR-206 pourrait être une bonne approche pour diagnostiquer les dommages musculaires. Les myomiRs circulants pourraient avoir un intérêt futur aussi bien dans le diagnostic des dommages musculaires en médecine du sport que dans le suivi de l'activité physique. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes de libération des miARNs circulants et leurs rôles dans la communication intercellulaire.

À retenir :

- Les myomiRs circulants ont tous été augmentés de manière très importante après l'ultra-marathon.
- Les niveaux circulants des myomiRs étaient mieux associés à l'amplitude de la réduction prolongée de fonction neuromusculaire que les niveaux circulant de la CK et de la Mb.
- Comme les niveaux circulants de ces myomiRs étaient bien corrélés entre eux en réponse à un exercice d'ultra-marathon, il ne semble pas nécessaire de tous les évaluer.

II. Étude 3a : Niveau circulant des microARNs après des dommages musculaires induits par l'exercice et effet protecteur

Cette étude a fait l'objet d'une soumission dans l'*American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* le 29/04/2022 (annexe 5) :

Circulating microRNAs levels after exercise-induced muscle damage and the repeated bout effect. **Chalchat E**, Martin V, Charlot K, Bourrilhon C, Baugé S, Bourdon S, Gruel A, Lepetit B, Banzet S, Garcia-Vicencio S, Siracusa J.

A. Résumé

Introduction : Le système neuromusculaire est capable de s'adapter rapidement aux dommages musculaires induits par l'exercice, de sorte qu'il est moins affecté lorsqu'un même exercice est répété dans les semaines qui suivent. Ce phénomène connu sous le nom de « *repeated bout effect* » (RBE). Les niveaux circulants des microARNs spécifiques aux muscles (myomiRs) peuvent potentiellement prédire le déficit prolongé (> 24 h) de la fonction musculaire, un indicateur de dommages musculaires. L'objectif de la présente étude était d'étudier (1) comment les niveaux des myomiRs plasmatiques sont modifiés par le RBE et (2) si les myomiRs plasmatiques sont pertinents pour prédire la réduction prolongée du moment de FMV.

Méthodes : Dix-neuf participants ont effectué deux exercices identiques de marche en descente séparés de deux semaines (45 min à 4,5 $km.h^{-1}$; pente : -25 % ; charge : 30 % de la masse corporelle). Le moment de FMV, l'activité de la CK, la concentration de la Mb et les niveaux circulants des myomiRs ont été mesurés avant et jusqu'à 48 h après les exercices. Des corrélations et des régressions multiples ont été effectuées pour évaluer la capacité de ces marqueurs à prédire la plus grande perte de FMV au-delà de 24 h après l'exercice.

Résultats : Comme pour le moment de FMV, l'activité de la CK et la concentration de Mb, certains niveaux circulants des myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p) étaient moins affectés après le deuxième exercice par rapport au premier exercice. Les niveaux circulants de l'activité de la CK, de la concentration de la Mb et de plusieurs myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-206) étaient corrélés à la perte prolongée du moment de FMV. La régression multiple a montré que la meilleure combinaison de marqueurs pour prédire la perte prolongée de FMV comprenait certains myomiRs, la Mb et le CK.

Conclusion : Certains niveaux des myomiRs ont été moins augmentés après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1, montrant que ces marqueurs peuvent indiquer la présence d'un RBE. La mesure des niveaux circulants des myomiRs de manière concomitante aux niveaux de la concentration de Mb et de l'activité de la CK pourrait améliorer la prédiction du déficit prolongé de la fonction musculaire.

B. Problématiques et objectifs

Au cours de l'**étude 2**, nous avons montré qu'après un ultra-marathon de 24 h, les niveaux circulants des myomiRs pouvaient mieux représenter l'amplitude de la réduction de la hauteur de saut mesurée 24 h après la fin de l'exercice (*i.e.*, indicateur de l'amplitude des dommages musculaires) que les niveaux circulants de la CK et de la Mb. Cependant, on ne sait pas si ces observations issues d'un exercice d'ultra-endurance extrême peuvent être applicables au suivi de dommages musculaires moins sévères. En effet, de faibles différences de déficit de la fonction musculaire devraient pouvoir être discriminées pour adapter au mieux les stratégies de récupération et les charges d'entraînement en conséquence. Un modèle utilisant le RBE pourrait être adapté pour répondre à cette problématique. S'il est connu qu'un deuxième exercice excentrique peut entraîner une réduction des symptômes de dommages musculaires par rapport à un même exercice effectué les semaines précédentes, on ne sait pas si les niveaux des myomiRs circulants pourraient être réduits après un deuxième exercice par rapport à un premier exercice. Si les myomiRs sont de bons marqueurs des dommages musculaires, leurs niveaux circulants devraient (i) être réduits après le deuxième exercice par rapport au premier, et (ii) présenter une bonne corrélation avec la perte prolongée de FMV. L'objectif de la présente étude était donc d'évaluer les réponses des myomiRs circulants après deux exercices identiques de marche en descente pour évaluer (1) si les niveaux plasmatiques des myomiRs sont modifiés par le RBE et (2) si les myomiRs plasmatiques sont pertinents pour prédire la réduction prolongée du moment de FMV. Nous avons émis l'hypothèse que les niveaux de myomiR circulants seraient (1) moins augmentés après le deuxième exercice par rapport au premier et (2) mieux corrélée avec la réduction prolongée du moment de FMV que les marqueurs classiques (*i.e.*, l'activité de la CK, la concentration de Mb).

C. Procédures expérimentales

1. Participants

Dix-neuf hommes (âge : 31,3 ± 5,6 ans, taille : 1,80 ± 0,06 m, poids : 78,0 ± 10.7 kg, indice de masse corporel : 24,0 ± 2,3 $kg.m^{-2}$, masse grasse : 16,0 ± 5,1 %) se sont portés volontaires. Les participants pratiquaient une activité physique régulière (entre 3 et 8 h/semaines), n'ont pas souffert de blessures musculaires ou articulaires récentes (< 6 mois) et ne recevaient pas de traitement médicamenteux pouvant altérer la fonction neuromusculaire. Aucun des participants n'était engagé dans un entrainement visant à améliorer spécifiquement la fonction neuromusculaire (*i.e.*, musculation) ou dans une activité présentant une proportion

importante de marche et/ou de course en descente (*e.g.*, trail, randonnée) dans les 6 mois précédant l'expérimentation. Lors du déroulement de l'expérimentation, les participants ont été informés qu'ils ne devaient pas effectuer d'activités inhabituelles et d'interventions qui pourraient interférer avec la récupération comme les massages, l'utilisation de froid ou d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Chaque individu a participé à une session d'inclusion composée d'une visite médicale, du recueil des données anthropométriques et d'une familiarisation avec toutes les procédures expérimentales. Les procédures expérimentales ont été approuvées et autorisées par le Comité de Protection des Personnes Ile-de-France 8 (France, numéros d'autorisation : 2019-A01210-57).

2. Protocole

Les participants ont effectué deux exercices de marche en descente de 45 min séparés par deux semaines sur un tapis roulant (pulsar 3p 4.0, HP cosmos, Warwickshire, Royaume-Uni) en portant une charge équivalente à 30 % de la masse corporelle (gilet lesté : 10 % de la masse corporelle ; sac à dos : 20 % de la masse corporelle) (**Figure 17**). La pente du tapis roulant était de -25 %, la vitesse à 4,5 $km.h^{-1}$ et les participants avaient pour consigne de marcher de façon spontanée (longueur et fréquence de pas). Cinq participants n'ont pas pu terminer l'exercice et ont effectué le premier exercice jusqu'à épuisement (30,2 ± 8,6 min). Ces participants ont effectué la même durée d'exercice lors du deuxième exercice. Le moment de FMV (angle du genou = 90 ° ; 0 ° = extension complète) a été évalué sur le membre droit avant (PRE), immédiatement après (POST), 24 h et 48 h après les deux exercices. Les marqueurs sanguins ont été analysés à PRE, POST et 2 h, 6 h, 24 h et 48 h après les deux exercices. Un indice de protection a également été calculé pour le moment de FMV afin d'évaluer l'amplitude de l'effet protecteur conféré par le premier exercice.

3. Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été effectuées pour évaluer (1) les modifications entre PRE et POST, 2 h, 6 h, 24, 48 h pour les deux exercices, et (2) l'effet de l'exercice (comparaison exercice 1 - exercice 2). Comme les tests de Shapiro-Wilk ont montré l'absence de distribution normale, nous avons effectué une analyse de variance de Friedman non-paramétrique pour les niveaux circulants des miARNs, de l'activité de la CK et de la concentration de la Mb. Les différences statistiques entre les temps de mesure ont été évaluées à l'aide du test de comparaisons multiples de Dunn. Les résultats du moment de FMV ont été analysés à l'aide d'une ANOVA à deux voies (temps × exercice). Lorsqu'une interaction (temps × exercice) était

observée, des tests post-hoc de Holm ont été effectués pour tester les différences entre les moyennes.

Afin d'identifier la présence de toute adaptation à la suite de l'exercice 1, les valeurs PRE absolues de l'exercice 1 et de l'exercice 2 ont été comparées à l'aide d'un test de Wilcoxon. Afin d'étudier si les adaptations à long terme des niveaux de myomiRs pouvaient être impliquées dans la protection conférée par le premier exercice, des corrélations ont été effectuées entre les changements des niveaux des myomiRs de l'exercice PRE 1 à l'exercice PRE 2 et l'IP du moment de FMV. Afin d'étudier si les niveaux de myomiRs pouvaient être représentatifs des adaptations conférées par le premier exercice, des corrélations ont été effectuées entre les variations maximales des niveaux des myomiRs à partir de l'exercice PRE 1 (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a- 3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378a-3p et hsa-miR-499a-5p) et l'IP du moment de FMV.

Des corrélations ont été effectuées entre les variations maximales des niveaux de myomiRs et les variations maximales de l'activité de la CK et de la concentration de Mb (*i.e.*, les marqueurs de dommages musculaires classiques). Des corrélations ont également été réalisées entre la réduction prolongée de la FMV (> 24 h) et les niveaux des miARNs, de l'activité de la CK et de la concentration de la Mb mesurés à POST, 2 h et 6 h pour évaluer la capacité de ces marqueurs à prédire la réduction prolongée de la FMV. Le niveau d'association entre les paramètres a été évalué à l'aide du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ). Afin de déterminer si une combinaison de marqueurs circulants mesurés à POST, 2 h ou 6 h après les exercices pouvait améliorer la prédiction de réduction prolongée du moment de FMV, nous avons effectué des analyses de régression linéaire multiple en utilisant le logiciel IBM SPSS Statistics v26 (IBM Corp, New York, États-Unis). Les variables indépendantes utilisées dans les analyses étaient les niveaux circulants de hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b- 3p, hsa-miR-378a-3p et hsa-miR-499a-5p, de l'activité de la CK et de la concentration de Mb. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-types. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$. À l'exception de la régression linéaire multiple, les analyses ont été effectuées à l'aide de GraphPad Prism (version 8.4.3, GraphPad Software, CA, Etats-Unis).

D. Résultats

1. Valeurs initiales

Les analyses statistiques n'ont montré aucune différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 pour les valeurs PRE absolues de tous les paramètres (**Tableau 4**).

Valeurs PRE absolues	Exercice 1	Exercice 2	p
Moment de FMV (N.m)	312 ± 51	311 ± 67	0,98
hsa-miR-1-3p (UA)	7,9 ± 6,2	10,0 ± 10,9	0,83
hsa-miR-133a-3p (UA)	14,1 ± 13,0	11,3 ± 9,0	0,77
hsa-miR-133b (UA)	10,0 ± 10,4	10,6 ± 14,0	0,77
hsa-miR-206 (UA)	1,55 ± 2,78	1,09 ± 1,53	0,95
hsa-miR-208a-3p (UA)	0,02 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,83
hsa-miR-208b-3p (UA)	0,26 ± 0,86	0,12 ± 0,41	0,77
hsa-miR-378a-3p (UA)	24,1 ± 14,1	25,5 ± 18,6	0,99
hsa-miR-499a-5p (UA)	0,45 ± 1,27	0,34 ± 1,03	0,80
Créatine kinase (U/L)	200 ± 135	154 ± 52	0,40
Myoglobine (ng/mL)	72 ± 14	71 ± 20	0,42

Tableau 4. Valeurs absolues avant (PRE) l'exercice 1 et l'exercice 2. *FMV : force maximale volontaire ; hsa : homo sapiens ; UA : unité arbitraire (abondance relative).*

2. Moment de force maximale volontaire

L'ANOVA a montré une interaction significative (temps × exercice ; $p < 0,001$) pour le moment de FMV (**Figure 40**). Le moment de FMV a été diminué jusqu'à 48 h après l'exercice 1 alors qu'il n'a été diminué qu'à POST après le deuxième exercice (récupération plus rapide ; **Figure 40**).

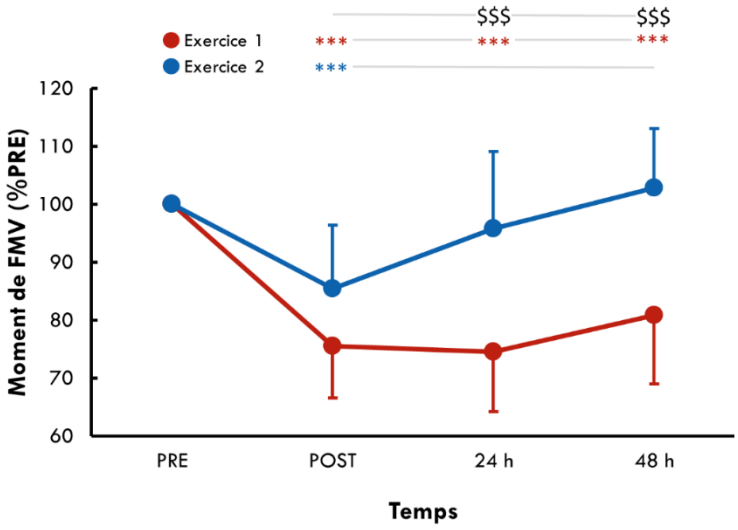
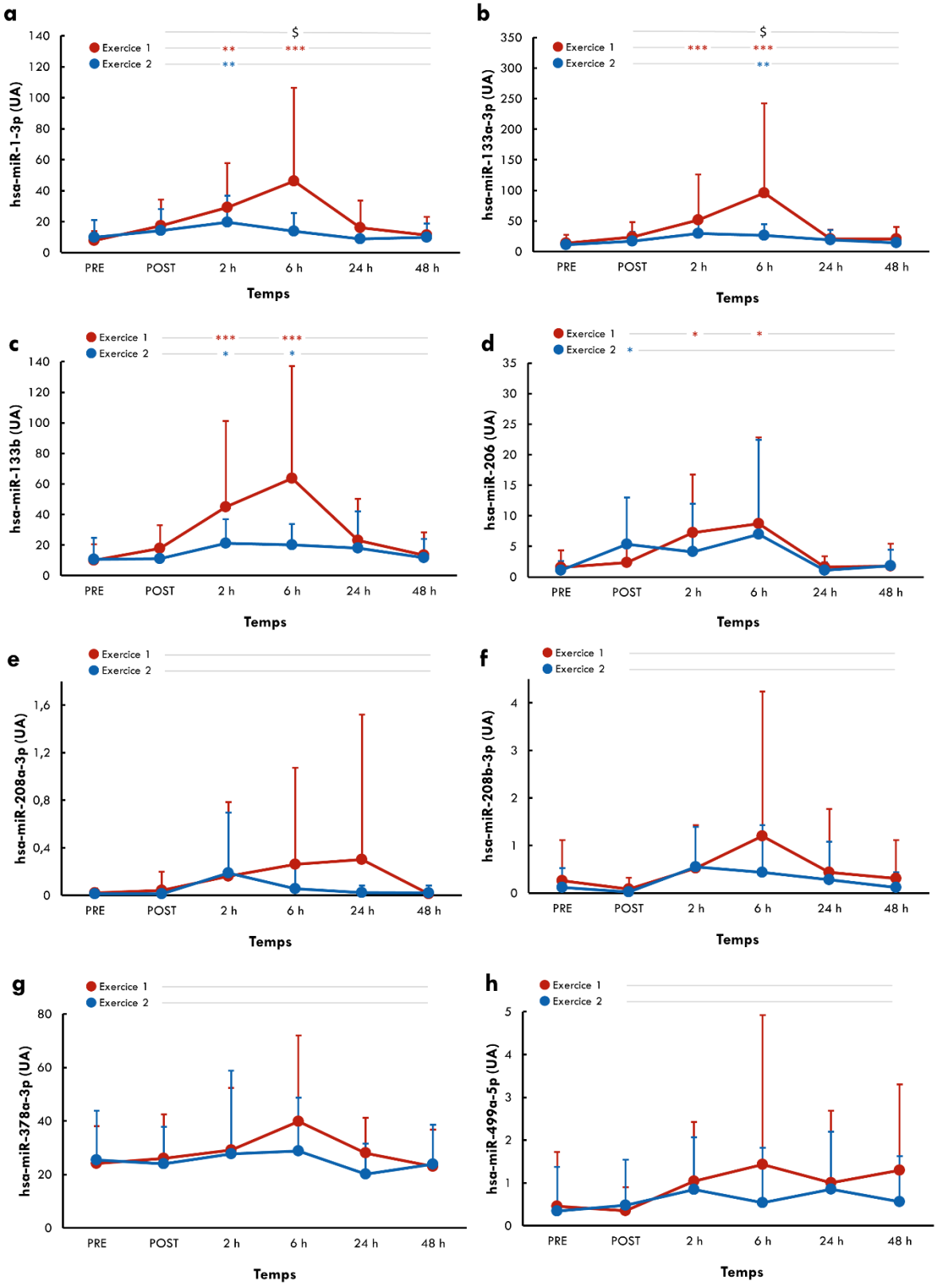


Figure 40. Cinétique du moment de force maximale volontaire (FMV) avant (PRE), après (POST), 24 h et 48 h après l'exercice 1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). **** : différent de PRE à $p < 0,001$; $$$: différent entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à $p < 0,001$.*

3. Niveaux circulants des miARNs

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps pour hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206 ($p < 0,001$) (**Figure 41a-d**) mais pas pour hsa-miR-208a-3p ($p = 0,583$), hsa-miR-208b-3p ($p = 0,481$), hsa-miR-378-3p ($p = 0,436$) et hsa-miR-499a-5p ($p = 0,053$) (**Figure 41e-h**). Après le premier exercice, les niveaux des miARNs ont été significativement augmentés à 2 h et 6 h pour hsa-miR-1-3p (**Figure 41a**), hsa-miR-133a-3p (**Figure 41b**), hsa-miR-133b (**Figure 41c**), et hsa-miR-206 (**Figure 41d**). Après le deuxième exercice, les niveaux des miARNs ont augmenté de manière significative à 2 h pour hsa-miR-1-3p (**Figure 41a**), hsa-miR-133b (**Figure 41c**) et hsa-miR-206 (**Figure 41d**) et à 6 h pour hsa-miR-133a-3p (**Figure 41b**) et hsa-miR-133b (**Figure 41c**). De plus, les niveaux des miARNs étaient significativement plus faibles 6 h après le deuxième exercice par rapport au premier pour hsa-miR-1-3p (**Figure 41a**) et hsa-miR-133a-3p (**Figure 41b**).

Figure 41. Cinétique de (a) home sapiens (hsa)- miR-1-3p, (b) hsa-miR-133a-3p, (c) hsa-miR-133b, (d) hsa-miR-206, (e) hsa-miR-208a-3p, (f) hsa-miR-208b-3p, (g) hsa-miR-378a-3p, (h) hsa-miR-499a-5p avant (PRE), après (POST) et 2 h, 6 h, 24 h et 48 h après l'exercice (1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). *UA : unité arbitraire (abondance relative). *, **, *** : significativement différent de la valeur PRE à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. $: Significativement différent entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,05.*



4. Activité de la créatine kinase

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps pour l'activité de la CK ($p < 0,001$). En effet, l'activité de la CK a été augmentée jusqu'à 48 h après les deux exercices. L'activité de la CK était significativement plus faible 6 h et 24 h après le deuxième exercice par rapport au premier (**Figure 42a**).

5. Concentration de la myoglobine

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps sur la concentration de la Mb ($p < 0,001$). En effet, la concentration de la Mb a été significativement augmentée jusqu'à 6 h après les deux exercices (**Figure 42b**). La concentration de Mb était significativement plus faible 2 h et 6 h après le deuxième exercice par rapport au premier (**Figure 42b**).

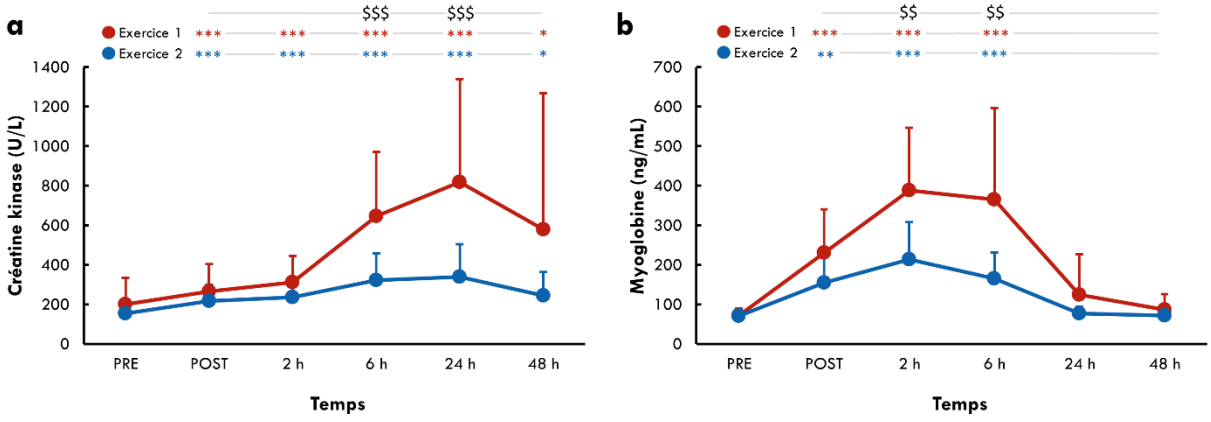


Figure 42. Cinétique (a) de l'activité de la créatine kinase et (b) de la concentration de la myoglobine avant (PRE), après (POST) et 2 h, 6 h, 24 h et 48 h après l'exercice (1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). **, **, *** : significativement différent de la valeur PRE à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement. $$ et $$$: Significativement différent entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à $p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement.*

6. Corrélations entre les modifications des myomiRs et l'indice de protection

Aucune corrélation n'a été trouvée entre les variations maximales des niveaux circulants des myomiRs après l'exercice 1 et l'IP pour le moment de FMV (**Tableau 5**). De même, aucune corrélation n'a été trouvée entre les modifications des niveaux de myomiRs de l'exercice PRE 1 à l'exercice PRE 2 et l'IP pour le moment de FMV (**Tableau 5**).

(a)

Valeur Pic	p	ρ
hsa-miR-1-3p (UA)	0.94	0.02
hsa-miR-133a-3p (UA)	0.48	0.17
hsa-miR-133b (UA)	0.58	0.14
hsa-miR-206 (UA)	0.46	0.04
hsa-miR-208a-3p (UA)	0.67	-0.11
hsa-miR-208b-3p (UA)	0.95	-0.02
hsa-miR-378-3p (UA)	0.74	0.08
hsa-miR-499a-5p (UA)	0.71	-0.09

(b)

PRE 1 vs PRE 2	p	ρ
hsa-miR-1-3p (UA)	0.26	0.27
hsa-miR-133a-3p (UA)	0.46	0.18
hsa-miR-133b (UA)	0.07	0.42
hsa-miR-206 (UA)	0.78	0.07
hsa-miR-208a-3p (UA)	0.82	-0.06
hsa-miR-208b-3p (UA)	0.80	0.06
hsa-miR-378-3p (UA)	0.78	0.07
hsa-miR-499a-5p (UA)	0.28	0.25

Tableau 5. (a) Corrélations entre l'amplitude maximale de modifications (Valeur Pic) des niveaux plasmatiques des miARNs après l'exercice 1 et l'indice de protection du moment de force maximale volontaire (FMV). (b) Corrélations entre la différence observée entre PRE 1 et PRE 2 (PRE 1 vs PRE 2) et l'indice de protection du moment de FMV. *UA : unité arbitraire (abondance relative). Les valeurs de p et du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) sont affichées pour chaque corrélation.*

7. Corrélations entre la CK, la Mb et les miARNs circulants

Les augmentations maximales de l'activité de la CK et de la concentration de Mb étaient significativement corrélées à celles de hsa-miR-1-3p (CK : $p < 0,001$, $\rho = 0,54$; Mb : $p = 0,005$, $\rho = 0,50$), hsa-miR-133a-3p (CK : $p < 0,001$, $\rho = 0,58$; Mb : $p = 0,048$, $\rho = 0,36$), hsa-miR-133b (CK : $p = 0,002$, $\rho = 0,50$; Mb : $p = 0,056$, $\rho = 0,35$), et hsa-miR-206 (CK : $p = 0,03$, $\rho = 0,35$; Mb : $p = 0,007$, $\rho = 0,48$).

8. Corrélations entre les marqueurs circulants et la réduction prolongée de la FMV

Aucune corrélation n'a été trouvée entre la réduction prolongée (> 24 h) du moment de FMV et l'activité de la CK (**Figure 43a et c**) ou les niveaux des miARNs mesurés à POST et 2 h après l'exercice, alors qu'une corrélation significative a été trouvée avec la concentration de Mb mesurée 2 h après l'exercice (**Figure 43b et d**). De plus, une corrélation significative a été trouvée entre la réduction prolongée (> 24 h) du moment de FMV et les mesures à 6 h après l'exercice de l'activité de la CK (**Figure 43e**), de la concentration de la Mb (**Figure 43f**), de hsa-miR-1-3p (**Figure 44a**), hsa-miR-133a-3p (**Figure 44b** ; tend à être significatif, $p = 0,053$) et hsa-miR-206 (**Figure 44d**). Cependant, aucune corrélation significative n'a été observée entre la réduction prolongée (> 24 h) du moment de FMV et les niveaux de hsa-miR-133b (**Figure 44c**), hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-378, hsa-miR-499a-5p (**Tableau 6**). Immédiatement après l'exercice (POST), la régression linéaire multiple a montré que la meilleure combinaison de marqueurs comprenait : la Mb, la CK, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133b et hsa-miR-206 (r^2 : 0,485 ; $p < 0,001$). La meilleure combinaison à 2 h post-exercice comprenait la Mb et la CK (r^2 : 0,440 ; $p < 0,001$), alors que la Mb et hsa-miR-1-3p (r^2 : 0,300 ; $p = 0,002$) était la meilleure combinaison à 6 h post-exercice.

Figure 43. Corrélations entre la plus grande réduction du moment de force maximale volontaire (FMV) mesurée au-delà de 24 h après les exercices et l'activité de la créatine kinase mesurée immédiatement après (POST ; a), 2 h (c), et 6 h (e) après l'exercice, et la concentration de la myoglobine mesurée immédiatement après (POST ; a), 2 h (c), et 6 h (e) après l'exercice. *Les valeurs de p et du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) sont affichées pour chaque corrélation.*

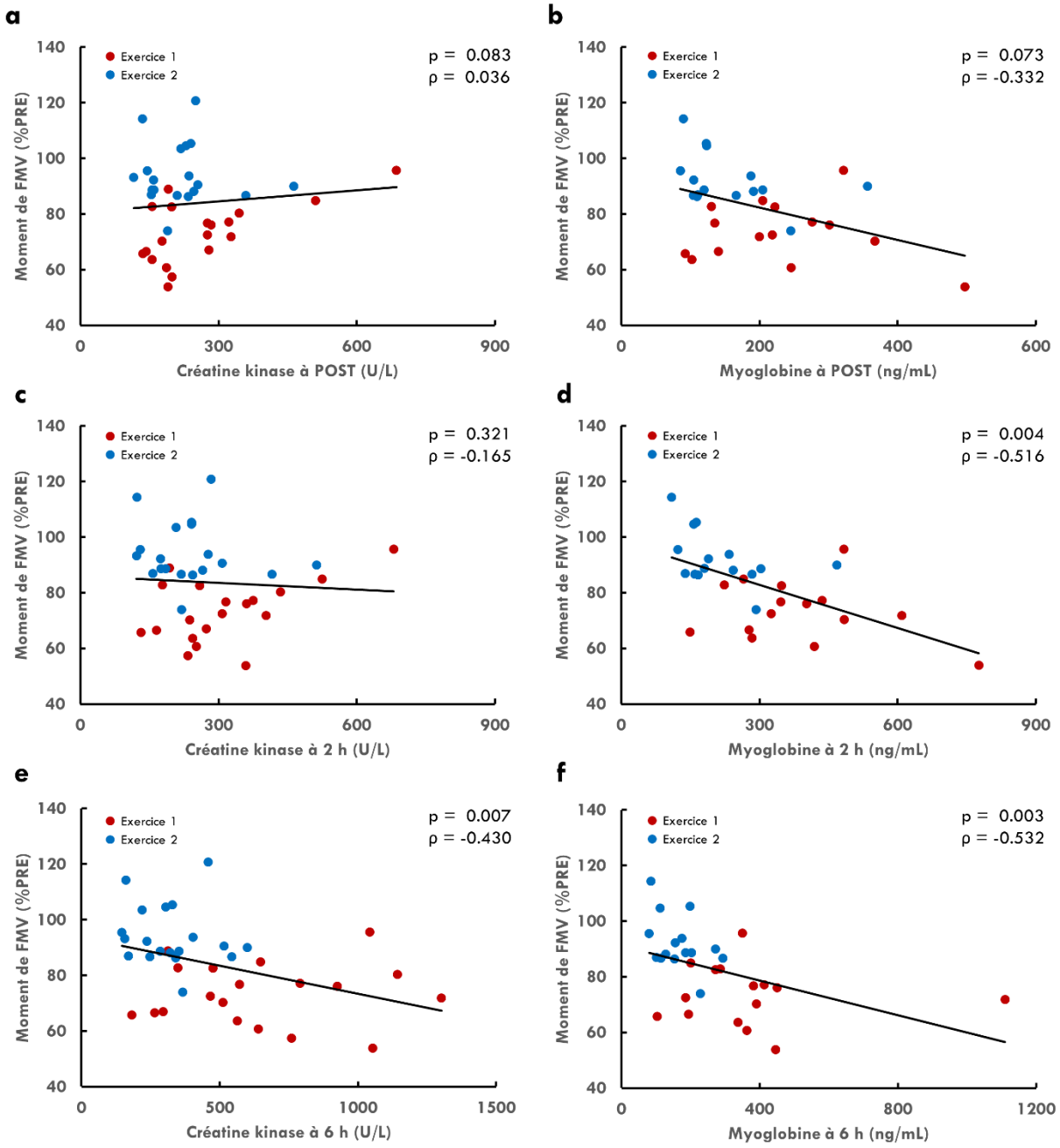


Figure 44. Corrélations entre la plus grande réduction du moment de force maximale volontaire (FMV) mesurée au-delà de 24 h après les exercices et les niveaux plasmatiques des miARNs mesurés 6 h après l'exercice. *Les corrélations sont représentées pour homo sapiens (hsa)-miR-1-3p, (b) hsa-miR-133a-3p, (c) hsa-miR-133b, et (d) hsa-miR-206. UA : unité arbitraire (abondance relative). Les valeurs de p et du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) sont affichées pour chaque corrélation.*

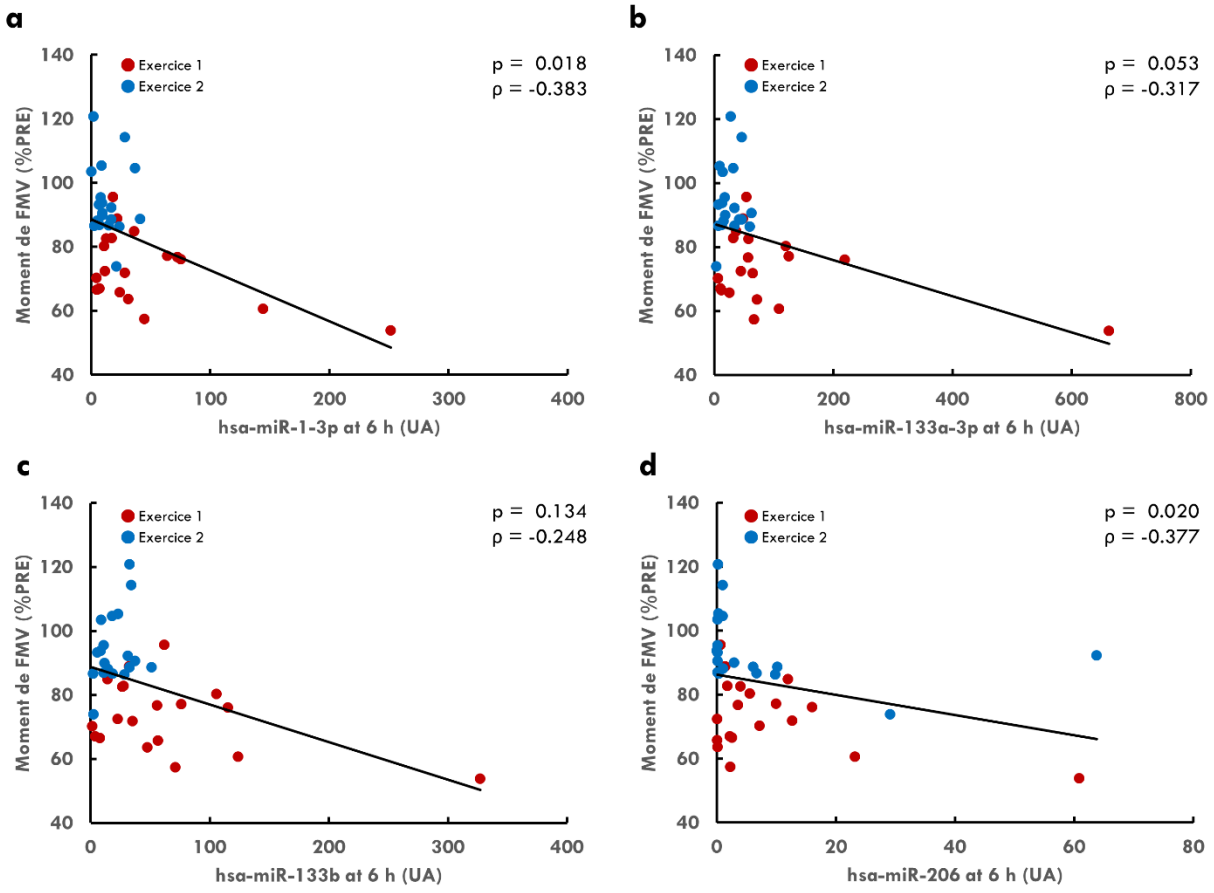


Tableau 6. Corrélations entre la plus grande réduction du moment de force maximale volontaire (FMV) mesurée au-delà de 24 h après les exercices et les niveaux circulants d'homo sapiens (hsa)- miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378-3p, hsa-miR-499a-5p, de l'activité de la créatine kinase et de la concentration de la myoglobine. *Les valeurs de p et du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) sont affichées pour chaque corrélation. Les résultats avec une valeur de p < 0,05 étaient considérés comme significatifs et sont affichés en gras.*

	POST		2 h		6 h	
	p	ρ	p	ρ	p	ρ
hsa-miR-1-3p (UA)	0,1426	-0,2424	0,0882	-0,2804	**0,0176**	**-0,3831**
hsa-miR-133a-3p (UA)	0,1609	-0,2321	0,1581	-0,2336	0,0528	-0,3166
hsa-miR-133b (UA)	0,1437	-0,2417	0,1022	-0,2692	0,1339	-0,2476
hsa-miR-206 (UA)	0,4619	0,1230	0,2375	-0,1963	**0,0197**	**-0,3767**
hsa-miR-208a-3p (UA)	0,7094	-0,0625	0,6809	0,0689	0,7007	-0,0645
hsa-miR-208b-3p (UA)	0,2831	-0,1787	0,9969	0,0007	0,7280	-0,0583
hsa-miR-378-3p (UA)	0,4367	-0,1318	0,9917	-0,0018	0,7285	-0,0590
hsa-miR-499a-5p (UA)	0,3134	-0,1680	0,8022	-0,0420	0,8108	0,0402
Créatine kinase (U/L)	0,8306	0,0359	0,3211	-0,1654	**0,0071**	**-0,4295**
Myoglobine (ng/mL)	0,0729	-0,3321	**0,0035**	**-0,5159**	**0,0025**	**-0,5315**

E. Discussion

L'objectif principal de cette étude était d'étudier (1) comment les niveaux plasmatiques des myomiRs étaient modifiés par le RBE et (2) si les myomiRs plasmatiques pouvait être pertinents pour prédire la réduction prolongée du moment de FMV (*i.e*. l'amplitude des dommages musculaires). Nous avons observé une augmentation des niveaux de plusieurs miARNs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b et hsa-miR-206) après l'exercice 1 et l'exercice 2. Certains niveaux des myomiRs (hsa -miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p) étaient moins affectés après le deuxième exercice par rapport au premier exercice, confirmant ainsi notre première hypothèse. Cependant, nous n'avons pas confirmé notre deuxième hypothèse selon laquelle les niveaux des myomiRs étaient mieux corrélés avec la réduction prolongée du moment de FMV que les marqueurs classiques comme la CK et la Mb.

1. Niveaux circulants en réponse aux exercices de marche en descente

Comme attendu, la répétition de l'exercice a induit un RBE : la réduction du moment de FMV était moins importante et la récupération était plus rapide après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1. De plus, l'activité de la CK et la concentration de Mb étaient moins augmentées après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1. Ceci est cohérent avec des études antérieures (Chen et coll., 2012a; Clarkson et coll., 1992; Maeo et coll., 2016) qui ont rapporté une atténuation de plusieurs symptômes de dommages musculaires après le deuxième exercice excentrique par rapport au premier. De manière intéressante, la présente étude montre des résultats originaux sur l'évolution des niveaux de miARNs après deux exercices excentriques.

a. Niveaux circulants en réponse au premier exercice de marche en descente

Nous avons observé que hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b et hsa-miR-206 étaient augmentés après l'exercice 1. Ces résultats sont cohérents avec plusieurs études (Baggish et coll., 2014; Banzet et coll., 2013; Chalchat et coll., 2021; Clauss et coll., 2016; Mooren et coll., 2014) qui ont montré une augmentation de ces myomiRs après des exercices de marche en descente, de marathon ou d'ultra-marathon. À l'inverse, nous n'avons pas observé d'augmentations significatives pour hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378-3p, hsa-miR-499a-5p dans la présente étude alors que leurs niveaux circulants étaient augmentés après une marche en descente à reculons (Banzet et coll., 2013), des marathons (Baggish et coll., 2014; Mooren et coll., 2014) et un ultra-marathon (Chalchat et coll., 2021). Des

différences entre les niveaux circulants des myomiRs suite à un exercice excentrique ont déjà été rapportées (Banzet et coll., 2013; Mooren et coll., 2014) et pourraient impliquer plusieurs facteurs. Une explication pourrait être due à la différence de niveaux circulants initiaux entre les miARNs, comme suggéré précédemment (Banzet et coll., 2013; Chalchat et coll., 2021). Dans la présente étude, nous avons montré que les niveaux circulants de certains myomiRs (hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p et hsa-miR-499a-5p) étaient trop faibles pour être détectés aux niveaux de base, mais aussi en réponse à l'exercice de marche en descente. Parmi les 228 échantillons (12 points temporels pour 19 sujets), les miARNs ont été détectés dans 223 échantillons pour hsa-miR-1-3p (97,8 %), 207 pour hsa-miR-133a-3p (90,8 %), 213 pour hsa-miR-133b (93,4 %), 188 pour hsa-miR-206 (82,5 %), 30 pour hsa-miR-208a-3p (13,2 %), 43 pour hsa-miR-208b-3p (18,9 %), 218 pour hsa-miR-378-3p (95,6 %) et 104 pour hsa-miR-499a-5p (45,6 %). Ceci est cohérent avec plusieurs études (Aoi et coll., 2013; Banzet et coll., 2013). Par exemple, Banzet et coll. (2013) ont montré de faibles niveaux de hsa-miR-208a-3p (non détectable), hsa-miR-208b-3p (non détectable chez 6 participants sur 9) et hsa-miR-499a-5p après 30 min d'un exercice de marche en descente. Cependant, nous avons récemment montré que ces myomiRs pouvaient augmenter considérablement après des dommages musculaires sévères induits par un exercice d'endurance extrême (course d'ultra-marathon de 24 h) (Chalchat et coll., 2021). Cela suggère que des différences importantes dans la durée de l'exercice et l'amplitude des dommages musculaires pourraient affecter différemment les niveaux de certains myomiRs circulants. Un deuxième facteur pourrait expliquer les différences entre les niveaux circulants des myomiRs après des exercices induisant des dommages musculaires : l'expression des myomiRs peut être différente selon le type de muscle (cardiaque *vs*. squelettique) ou le phénotype contractile des fibres musculaires squelettiques. En effet, hsa-miR-208a-3p est spécifique au muscle cardiaque, expliquant pourquoi nous n'avons pas trouvé d'augmentation significative de ce myomiR après les exercices de marches en descente, où un faible niveau de stress cardiaque est attendu. Fait intéressant, les deux participants qui ont montré une augmentation importante de hsa-miR-208a-3p dans la présente étude correspondent à deux des cinq participants qui ont effectué l'exercice jusqu'à l'épuisement, ce qui suggère que ce myomiR pourrait être un indicateur de stress cardiaque. Cependant, comme ce n'était pas le but de la présente étude, nous n'avons pas évalué de marqueur de la fonction ou du stress cardiaque. Il a précédemment été rapporté que hsa-miR-499a-5p était plus exprimé dans les fibres de type I que dans les fibres de type II (Siracusa et coll., 2016). Comme il a été montré que les fibres de type I sont moins sensibles aux dommages que les fibres de type II (Choi,

2014), cela pourrait expliquer en partie pourquoi hsa-miR-499a-5p n'a pas été augmenté après l'exercice de marche en descente dans la présente étude. Hsa-miR-378-3p n'a pas augmenté de manière significative après l'exercice dans la présente étude. Ce miARN n'est pas considéré comme un myomiR mais fait partie des miARNs les plus exprimés dans le tissu musculaire (Kavakiotis et coll., 2022; Ludwig et coll., 2016). Les augmentations de ce miARN dans le sang ont été régulièrement rapportées après une lésion musculaire toxique chez le rat (Siracusa et coll., 2016), après une course d'ultra-marathon (Chalchat et coll., 2021) et dans différents modèles animaux de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (Jeanson-Leh et coll., 2014; Roberts et coll., 2013; Vignier et coll., 2013). Comme hsa-miR-378-3p est déjà abondant dans le plasma en condition de contrôle (*e.g*., organismes sains au repos), on pourrait supposer que les dommages musculaires induits dans la présente étude n'étaient pas suffisants pour augmenter son niveau circulant au-dessus du « bruit de fond ».

b. Comparaison des niveaux circulants entre l'exercice 1 et l'exercice 2

Parmi les myomiRs augmentés après le premier exercice (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b et hsa-miR-206), seuls hsa-miR-1-3p et hsa-miR -133a-3p ont montré des niveaux différents, *i.e*. une augmentation plus faible après le deuxième exercice. Le fait que nous ayons observé différents profils circulants parmi les miARNs en réponse aux deux exercices excentriques est notable et pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs. De manière intéressante, nous avons observé que les variations maximales de l'activité de la CK et de la concentration de Mb étaient corrélées aux variations maximales de hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b et hsa-miR-206. Bien que cela reste spéculatif, ces relations suggèrent que ces myomiRs pourraient partager, au moins en partie, des mécanismes de libération similaires avec la CK et la Mb (*i.e*., une libération passive). Cependant, il est probable que cette hypothèse soit insuffisante pour expliquer pleinement les différences dans les profils circulants rapportés dans la présente étude. Premièrement, il ne peut être exclu que la première séance d'exercice excentrique ait entraîné des modifications de l'abondance des myomiRs dans le tissu musculaire squelettique, car ces myomiRs sont connus pour être impliqués dans l'homéostasie et la régénération musculaire (Kirby et coll., 2015; Siracusa et coll., 2018). Malgré le fait qu'aucune étude n'ait évalué l'effet aigu de l'exercice excentrique sur les niveaux de myomiRs musculaires, certains auteurs (Drummond et coll., 2008; Rivas et coll., 2014) ont montré qu'une séance de musculation pouvait réduire l'expression de miR-1, miR-133a et miR-133b dans le tissu musculaire squelettique 2 à 6 h après l'exercice. Cependant, on ne sait pas si ces

modifications sont transitoires ou persistent plus longtemps et si elles pourraient entraîner des variations de leurs niveaux circulants. Les niveaux circulants des membres de la famille des miARNs let-7, abondamment exprimés dans le tissu musculaire, ne sont pas élevés en réponse aux dommages musculaires (Coenen-Stass et coll., 2017; Roberts et coll., 2013; Siracusa et coll., 2018; Vignier et coll., 2013), ce qui suggère que des mécanismes de sécrétion actifs sont impliqués. Dans une revue récente, Coenen-Stass et coll. (2017) ont discuté de l'utilité clinique des miARNs extracellulaires en tant que marqueurs de la DMD, ainsi que de leur possible contribution à la physiologie musculaire. Ces auteurs ont proposé que la libération des miARNs en réponse à des dommages musculaires puisse être une combinaison d'une libération passive à la suite d'une nécrose des myocytes et de l'altération du sarcolemme, mais aussi d'un processus de sécrétion actif qui pourrait accompagner la différenciation et la régénération musculaire. Fait intéressant, des études *in vitro* pionnières ont montré que miR-133a, miR-133b, miR-206 et miR-378 sont activement libérés dans les vésicules extracellulaires par des myotubes (Forterre et coll., 2014) ou de cellules précurseurs myogéniques issues de la division des cellules satellites (Fry et coll., 2017) et pourraient réguler la différenciation des myoblastes et le remodelage de la matrice extracellulaire. De manière intéressante, ces mécanismes physiologiques ont été identifiés comme étant impliqués dans le RBE (Hyldahl et coll., 2017). Malgré un contexte différent, nous pensons que les dommages musculaires induits dans notre modèle expérimental peuvent partager certains de ces mécanismes de libération.

Pour tenter d'évaluer si l'amplitude des modifications des miARNs circulants après l'exercice pouvait être un indicateur des adaptations fonctionnelles induites par le RBE, nous avons corrélé les modifications de leurs niveaux circulant aigus (< 48 h) et à long terme (2 semaines ; PRE exercice 2) avec l'IP du moment de FMV. Cependant, aucune corrélation significative n'a été observée. Malgré ces résultats négatifs, il ne peut être exclu que les myomiRs circulants puissent être impliqués dans les adaptations du RBE car leur abondance dans la circulation sanguine dépend de facteurs complexes et interdépendants tels que la variation des demi-vies (Coenen-Stass et coll., 2019) et les mécanismes de libération. Ainsi, il ne peut être exclu que les myomiRs puissent jouer un rôle dans les adaptations du RBE, mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour étayer directement cette hypothèse.

2. Association entre les marqueurs de dommages musculaires sanguins et la réduction prolongée du moment de FMV

Nous avons montré que la réduction prolongée du moment de FMV était corrélée aux niveaux de hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p (tendance ; p = 0,053), hsa-miR-206, de l'activité de la CK et de la concentration de Mb mesurée 6 h après l'exercice. Cependant, nous n'avons pas vérifié l'hypothèse selon laquelle les niveaux des myomiRs étaient mieux corrélés à la réduction prolongée du moment de FMV que l'activité de la CK et la concentration de la Mb après des exercices induisant des dommages musculaires. Ces résultats ne sont pas cohérents avec les résultats de notre précédente étude (Chalchat et coll., 2021) qui montraient que les niveaux de myomiRs étaient mieux corrélés avec la réduction prolongée de la hauteur de saut que l'activité de la CK ou la concentration de la Mb après une course d'ultra-marathon de 24 h chez des athlètes élites. Ces divergences pourraient s'expliquer par des différences dans la durée et l'intensité de l'exercice, ainsi que dans le statut d'entraînement des participants entre les études (élites *vs.* modérément entraînés). De plus, nos résultats suggèrent également qu'une combinaison de plusieurs marqueurs, dont la Mb, la CK et certains myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133b et hsa-miR-206) pourrait améliorer la capacité à prédire la réduction prolongée de la fonction musculaire. Par conséquent, la mesure des niveaux circulants des myomiRs de façon concomitante aux mesures de la concentration de la Mb et de l'activité de la CK pourrait améliorer le diagnostic des dommages musculaires.

3. Limites

Quelques limites peuvent être mentionnées dans cette étude. Premièrement, nous n'avons inclus que des hommes, limitant les conclusions pour les femmes. Cependant, nos travaux antérieurs ont montré que les myomiRs augmentaient après une lésion musculaire toxique chez les rats femelles (Siracusa et coll., 2016) et après un ultra-marathon de 24 h chez les femmes (Chalchat et coll., 2021). Siracusa et coll. (2016) ont également rapporté des niveaux de myomiR circulants similaires entre les rats mâles et femelles dans des conditions de contrôle et en réponse à des lésions musculaires. Deuxièmement, comme Ramos et coll. (2018) ont montré que certains myomiRs circulants pouvaient être affectés par la durée et l'intensité de l'exercice, une différence sur ces paramètres entre les participants pourrait être une limite. Dans la présente étude, l'intensité relative et la durée de l'exercice pourraient être différentes entre les participants puisque cinq des dix-neuf participants ont effectué l'exercice jusqu'à l'épuisement et ont arrêté l'exercice avant la limite des 45 minutes. Cependant, tous les participants ont effectué le même exercice deux semaines plus tard, permettant de comparer les niveaux des myomiRs circulants après des conditions similaires. Troisièmement, comme l'évaluation des niveaux plasmatiques des miARNs est un processus long (~6 h ; extraction de

l'ARN et RT-qPCR), ce marqueur n'est pas encore compatible avec un diagnostic précoce. Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour le développement de méthodes analytiques plus rapides qui pourraient être appropriées au contexte clinique.

F. Conclusion

Plusieurs myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b et hsa-miR-206) ont vu leurs niveaux circulants augmenter en réponse à des exercices de marche en descente, connus pour induire des dommages musculaires. Certains de ces myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p) mesurés 6 h après l'exercice étaient moins augmentés après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1, suggérant que ces myomiRs circulants pourraient représenter les adaptations conférées par le RBE, bien que ces modifications n'aient pas été associées à des adaptations fonctionnelles du système neuromusculaire. Plusieurs myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p et hsa-miR-206), l'activité de la CK et la concentration de la Mb mesurés 6 h après les exercices étaient corrélés à la réduction prolongée du moment de FMV (*i.e.*, l'amplitude des dommages musculaires), ce qui suggère que les myomiRs n'étaient pas de meilleurs prédicteurs du déficit prolongé de la fonction musculaire que les marqueurs classiques (*e.g.*, CK et Mb). Enfin, la mesure combinée de certains myomiRs avec la myoglobine et la créatine kinase pourrait améliorer la prédiction du déficit prolongé de la fonction musculaire. Ces résultats confirment que RBE a un effet sur les niveaux circulants des myomiRs. Cependant, les mécanismes expliquant la libération réduite des miARNs après le deuxième exercice excentrique ainsi que la signification fonctionnelle de leur libération restent à identifier.

À retenir :

- Certains myomiRs circulants sont moins augmentés après un deuxième exercice excentrique par rapport au même exercice effectué deux semaines auparavant.
- La moindre augmentation observée lors du deuxième exercice n'est pas associée avec les adaptations fonctionnelles du système neuromusculaire.
- Certains niveaux de myomiRs plasmatiques pourraient partiellement prédire la réduction prolongée du moment de FMV après un exercice de marche en descente mais ces marqueurs ne semblent pas être de meilleurs prédicteurs que les marqueurs classiques (*i.e*, CK et Mb).
- La mesure combinée de certains myomiRs avec la myoglobine et la créatine kinase pourrait améliorer la prédiction de la réduction prolongée de la fonction musculaire.

Sous-partie 2.2 Évaluation de la raideur musculaire mesurée par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement après des exercices induisant des dommages musculaires

Les marqueurs circulants ne permettent qu'une évaluation systémique des dommages musculaires, alors qu'une localisation des dommages est également nécessaire afin d'adapter au mieux les stratégies de récupération et les modalités et charges d'entrainement. En effet, l'amplitude des dommages musculaires peut varier entre les groupes musculaires (Maeo et coll., 2017) et au sein d'un groupe musculaire (*i.e.*, entre les muscles) (Maeo et coll., 2018) selon les exercices réalisés. Lacourpaille et coll. (2017) ont montré une bonne corrélation entre l'augmentation de la raideur mesurée par élastographie dans la première heure après l'exercice et la perte de force mesurée 48 h après l'exercice, suggérant que l'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement pourrait être un outil intéressant pour quantifier l'amplitude des dommages musculaires. Cependant, cette raideur pourrait également être influencée par d'autres facteurs comme la fatigue ou des adaptations des propriétés mécaniques du muscle à la suite d'exercices pouvant induire des dommages musculaires. Les objectifs de cette sous-partie étaient donc d'évaluer (1) si la raideur musculaire mesurée par élastographie pouvait représenter le niveau de dommages musculaires après un exercice combinant dommages musculaires et fatigue métabolique, et (2) si un premier exercice excentrique pouvait induire une adaptation à long terme de la raideur musculaire, qui pourrait conférer une protection contre des dommages musculaires subséquents.

I. Étude 3b : Le module de cisaillement musculaire comme indicateur d'adaptations conférées par l'exercice excentrique

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Frontiers in physiology* (annexe 6) :

Muscle shear elastic modulus provides an indication of the protection conferred by the repeated bout effect. **Chalchat E**, Siracusa J, Bourrilhon C, Charlot K, Martin V, Garcia-Vicencio S. Front Physiol. 2022. April 29; 13:877485 Doi: 10.3389/fphys.2022.877485.

A. Résumé

Introduction : Le système neuromusculaire est capable de s'adapter rapidement aux dommages musculaires induits par l'exercice, de sorte qu'il est moins affecté lorsqu'un exercice similaire est répété. Ce phénomène est connu sous le nom de « repeated bout effect » (RBE). L'objectif de cette étude était de déterminer si les propriétés mécaniques du quadriceps évaluées par élastographie par ondes de cisaillement, étaient moins affectées lorsqu'un deuxième exercice d'exercice excentrique était effectué deux semaines plus tard. Nous avons fait l'hypothèse que le premier exercice conférerait une protection contre les dommages musculaires grâce à une adaptation de la raideur musculaire avant le deuxième exercice (*i.e.*, une raideur musculaire plus élevée).

Méthodes : Seize hommes ont effectué deux exercices identiques de marche en descente séparés de deux semaines (45 min à 4,5 $km.h^{-1}$; pente : -25 % ; charge : 30 % de la masse corporelle). Le module élastique de cisaillement (µ) au repos du *rectus femoris* (RF) et du *vastus lateralis* (VL) et les symptômes de dommages musculaires ont été mesurés avant et jusqu'à 7 jours après les deux exercices. Les modifications de la fonction neuromusculaire ont été évaluées par le moment de force maximal volontaire, le niveau d'activation volontaire, la réponse mécanique évoquée par une stimulation électrique simple et double (doublets à 10 et 100 Hz). Un indice de protection (IP) a été calculé pour les différents symptômes de dommages afin d'évaluer l'amplitude du RBE.

Résultats : Les symptômes de dommages musculaires étaient moins affectés après le deuxième exercice comparé au premier. Les valeurs du µ du RF et du VL ont augmenté ($p < 0,001$) seulement après le premier exercice. Le µ du RF était élevé jusqu'à deux semaines après la fin du premier exercice ($p < 0,001$) alors que le µ du VL n'était augmenté que jusqu'à 24 h. L'augmentation du µ observée deux semaines après la fin du premier exercice était corrélée avec l'IP, *i.e.* l'atténuation des altérations du µ musculaire, de l'amplitude du doublet 10 Hz et du taux de développement du moment de force après le deuxième exercice ($p < 0,05$).

Conclusion : Nous avons montré que le µ musculaire évalué par élastographie par ondes de cisaillement était sensible au RBE, avec un effet différent entre le VL et le RF. L'augmentation persistante du µ était associée à l'atténuation des altérations neuromusculaires observées après le deuxième exercice, suggérant que l'augmentation de la raideur musculaire pourrait être une adaptation « protectrice » rendant les muscles plus résistants à la contrainte mécanique associée aux contractions excentriques.

B. Problématiques et objectifs

Le système neuromusculaire est capable de s'adapter rapidement aux dommages musculaires induits par l'exercice, de sorte qu'il est moins affecté lorsqu'un exercice similaire est répété. Ce phénomène est connu sous le nom de « repeated bout effect » (RBE). L'apparition du RBE repose sur différentes adaptations au niveau cellulaire, nerveux, inflammatoire et mécanique qui pourraient fonctionner de manière indépendante ou concomitante pour conférer une protection contre les dommages musculaires (*e.g*., réduction des symptômes et récupération plus rapide) lorsqu'un deuxième l'exercice excentrique est réalisé (Hyldahl et coll., 2017). Des études antérieures ont suggéré que des adaptations nerveuses pourraient apparaitre au cours du deuxième exercice excentrique (Dartnall et coll., 2011; Duclay et coll., 2008; Howatson et coll., 2011). En effet, le système nerveux central pourrait ajuster ses stratégies de recrutement pour répartir le stress mécanique sur un plus grand nombre d'unités motrices, et ainsi protéger le muscle contre les dommages musculaires.

Au niveau périphérique, des modifications du comportement des fascicules (*e.g*., un moindre allongement) ou de la jonction musculo-tendineuse (*e.g*., un moindre déplacement) lors d'un deuxième exercice excentrique comparé à un premier réalisé auparavant ont été observées dans des précédentes études (Lau et coll., 2015; Penailillo et coll., 2015b). Ces modifications pourraient expliquer en partie les moindres dommages musculaires après le deuxième exercice. Hyldahl et coll. (2017) ont rapporté que le remodelage de la matrice extracellulaire du muscle squelettique pourrait augmenter la raideur passive du muscle dans les semaines suivant un exercice excentrique pour conférer une protection contre d'éventuels dommages lorsqu'un deuxième exercice excentrique est réalisé. Cette augmentation de raideur pourrait rendre les muscles plus résistants au stress mécanique lors du deuxième exercice excentrique. Cependant, il a également été démontré que le RBE peut se produire sans modification des propriétés mécaniques des muscles (Hoffman et coll., 2016). Ces divergences dans les résultats peuvent être associées au fait que les muscles sont étirés de manière hétérogène pendant l'exercice excentrique en raison de différences dans leurs propriétés anatomiques (*e.g*., les muscles mono- *vs*. bi-articulaires), entraînant une variabilité intermusculaire des dommages musculaires (Green et coll., 2012; Maeo et coll., 2018). Cela pourrait entraîner un comportement mécanique différent entre les muscles d'un même groupe musculaire après un deuxième exercice excentrique induisant une altération de la capacité de production de force.

L'élastographie par ondes de cisaillement étant un outil permettant de calculer un index de raideur (*i.e.*, le module élastique de cisaillement ; µ) au niveau des muscles individuels, elle a été utilisée pour évaluer l'effet des dommages musculaires induits par l'exercice sur les propriétés mécaniques musculaires (Ema et coll., 2021; Heales et coll., 2018; Lacourpaille et coll., 2014; Lacourpaille et coll., 2017). Récemment, Lacourpaille et coll. (2017) ont constaté que l'augmentation du µ musculaire était associée à l'amplitude de la réduction de force mesurée à 48 h, faisant du µ musculaire un indicateur de dommages musculaires. Des mécanismes tels que la perturbation de l'homéostasie du calcium due à une altération du sarcolemme (Proske & Morgan, 2001), ainsi que les modifications de volume musculaire dues à l'œdème exerçant une pression sur les tissus conjonctifs du périmysium et de l'épimysium (Whitehead et coll., 2001), pourraient être impliqués dans l'augmentation du µ musculaire après les dommages musculaires. Une étude rapporte également une augmentation du µ de repos jusqu'à 21 jours après un exercice excentrique des fléchisseurs du coude (Lacourpaille et coll., 2014). Cependant, on ignore si cette augmentation reflète une adaptation mécanique protectrice impliquée dans le RBE (Hyldahl et coll., 2017). En effet, aucune étude n'a, jusqu'à présent, évalué la sensibilité du µ musculaire de repos dans un contexte de RBE.

Par conséquent, cette étude avait pour objectif de déterminer si l'amplitude et la cinétique du µ de repos des muscles du quadriceps seraient différemment affectées après deux exercices identiques à forte composante excentrique chez des individus en bonne santé. Nous avons émis l'hypothèse que le µ de repos serait augmenté dans une moindre mesure et pour une durée plus courte après le deuxième exercice par rapport au même exercice effectué deux semaines plus tôt. Nous avons également fait l'hypothèse que le premier exercice pourrait conférer une protection contre les dommages musculaires par une adaptation de la raideur musculaire avant la répétition du deuxième exercice (*i.e.*, un µ de repos plus élevé). Enfin, nous avons émis l'hypothèse que l'amplitude de la réponse adaptative diffèrerait entre les muscles du quadriceps (*vastus lateralis vs. rectus femoris*) en raison de leurs propriétés anatomiques et architecturales différentes.

C. Procédures expérimentales

1. Participants

Parmi les dix-neuf participants ayant effectué l'expérimentation (*cf.* **étude 3a**), les données d'un sous-ensemble de seize hommes (âge : 31,5 ± 5,9 ans, masse corporelle : 77,1 ± 11,1 kg, taille : 1,80 ± 0,06 m, indice de masse corporelle : 23,9 ± 2,4 $kg.m^{-2}$ et masse grasse :

15,9 ± 5,4 %) ont été utilisées pour cette étude, en raison de valeurs manquantes pour certains paramètres.

2. Protocole

Comme pour l'**étude 3a**, les seize hommes ont effectué deux exercices de marche en descente de 45 min (pente : -25 % ; la vitesse : 4,5 $km.h^{-1}$) séparés par deux semaines sur un tapis roulant, en portant une charge équivalente à 30 % de la masse corporelle (gilet lesté : 10 % de la masse corporelle ; sac à dos : 20 % de la masse corporelle) (**Figure 17**). Cinq participants n'ont pas pu terminer l'exercice et ont effectué le premier exercice jusqu'à épuisement (30,2 ± 8,6 min). Ces participants ont effectué la même durée d'exercice lors du deuxième exercice. La fonction neuromusculaire (moment de force volontaire et évoqué ; angle du genou = 90 ° ; 0 ° = extension complète), la douleur musculaire des quadriceps, l'amplitude de mouvement du genou, l'architecture musculaire et le module élastique de cisaillement (μ) au repos des muscles VL et RF ont été évalués sur le membre droit avant (PRE), dans la première heure (POST) et les heures/jours (4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h) après les marches en descente (**Figure 17**). Des échantillons de sang ont été prélevés avant, immédiatement après (POST) et 2, 6, 24, 48, 72 et 168 h (7 jours) après les deux sessions d'exercice (**Figure 17**) pour analyser l'activité de la créatine kinase (CK) dans le sérum. Un indice d'augmentation du μ en fonction de l'angle articulaire a été calculé comme décrit précédemment par Lacourpaille et coll. (2017) afin de comparer l'augmentation du μ entre les muscles VL et RF quelle que soit leur longueur relative. Afin d'évaluer l'amplitude de l'effet protecteur conféré par le premier exercice, un indice de protection (IP) a également été calculé pour les symptômes de dommages musculaires (paramètres neuromusculaires, μ musculaire, activité de la CK, douleurs musculaires, PPT, circonférence de la cuisse). Cet IP a été calculé pour l'amplitude maximale des altérations (pics) et pour les valeurs à 7 jours.

3. Analyses statistiques

La normalité et l'homogénéité des données ont été testées à l'aide des tests de Shapiro-Wilk et de Levene, respectivement. Ensuite, les différences sur les valeurs absolues ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à une voie (effet temps) et à mesures répétées pour tous les paramètres. Une ANOVA à deux voies (temps × exercice) et à mesures répétées a été effectuée sur les valeurs relatives aux valeurs PRE pour tous les paramètres, à l'exception des paramètres d'imagerie (ANOVA à trois voies : temps × exercice × muscle). Lorsqu'aucune interaction (temps × angle × muscle) n'a été trouvée pour ces paramètres, des ANOVA à deux voies (effet

: temps × angle) et à mesures répétées ont été utilisées pour comparer les valeurs relatives aux valeurs PRE pour chaque muscle (*i.e.*, RF et VL). Lorsque l'ANOVA a révélé des effets significatifs ou des interactions entre les facteurs, des tests post-hoc de Holm ont ensuite été appliqués pour tester les différences entre les moyennes. Comme il n'est pas possible de comparer les valeurs PRE entre les conditions en utilisant les valeurs relatives aux valeurs PRE, nous avons utilisé un test t pour identifier les différences des valeurs absolues pour les valeurs PRE entre les conditions.

Lorsque les hypothèses de normalité et d'homogénéité n'étaient pas respectées, une analyse de variance de Friedman non-paramétrique a été effectuée plutôt qu'une ANOVA à une voie et à mesures répétées (NAV, douleurs musculaires, amplitude de mouvement et seuil de pression de la douleur). Comme l'ANOVA à mesures répétées à deux ou trois voies est inappropriée lorsque les hypothèses de normalité/homogénéité ne sont pas respectées, nous avons utilisé un test t pour tester la différence des valeurs relatives aux valeurs PRE entre les conditions (*i.e.*, l'exercice et le muscle). Dans ce cas, des corrections de Holm pour comparaisons multiples ont été utilisées. Enfin, le test de rang de Wilcoxon a été effectué plutôt que le test t lorsque les hypothèses de normalité/homogénéité n'étaient pas respectées.

Des corrélations ont été effectuées entre les valeurs relatives (*i.e.*, le pourcentage de la valeur initiale) du µ musculaire mesuré 14 jours après le premier exercice (*i.e.*, entre PRE exercice 1 et PRE exercice 2) et les deux IP des symptômes des dommages musculaires (paramètres neuromusculaires, µ musculaires, activité de la CK, douleurs musculaires, gonflement musculaire). Ces corrélations permettaient de déterminer si des changements à long terme (*i.e.*, 14 jours) des µ musculaires étaient impliqués dans le RBE. En effet, comme le RBE est caractérisé par une moindre altération et une récupération plus rapide des symptômes de dommages musculaires après le deuxième exercice (Chen et coll., 2012a; Hyldahl et coll., 2017), nous avons choisi de tester les corrélations en utilisant l'IP de l'amplitude des altérations (*i.e.*, l'amplitude de la réduction des symptômes de dommages musculaire) et l'IP des modifications à 7 jours (*i.e.*, l'amplitude de la réduction des symptômes de dommages musculaire à 7 jours). Le niveau d'association a été évalué à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson (r) ou à l'aide du coefficient de corrélation de rang de Spearman (ρ) lorsque les hypothèses de normalité et d'homogénéité n'étaient pas respectées.

Les résultats avec une valeur de $p < 0,05$ ont été considérés comme significatifs. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de Jamovi (The jamovi project (2020). jamovi (Version 1.2) [Computer Software]. Extrait de https://www.jamovi.org, Sydney, Australie). Les

données manquantes ont été imputées à l'aide du pack missMDA R. Les résultats présentés sont exprimés en moyenne ± écart-type.

D. Résultats

1. Valeurs initiales

Les analyses statistiques n'ont montré aucune différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 pour les valeurs absolues évaluées à PRE pour tous les paramètres, à l'exception du μ de RF et de l'angle de pennation du VL, qui étaient plus élevées avant l'exercice 2 (**Tableau 7**).

Valeurs absolues (PRE)	Exercice 1	Exercice 2	p
Moment de FMV (N.m)	314,3 ± 49,7	311,2 ± 70,3	0,81
NAV (%)	96,6 ± 2,4	96,4 ± 2,2	0,79
RTD (N.m/s)	1137 ± 261	1067 ± 277	0,27
Tw_P (N.m)	67,5 ± 14,7	65,8 ± 14,5	0,35
Db10 (N.m)	105,4 ± 22,9	103,0 ± 23,6	0,45
Db100 (N.m)	100,1 ± 19,6	99,3 ± 18,6	0,77
Db10/Db100	1,05 ± 0,13	1,06 ± 0,14	0,95
Créatine kinase (U/L)	185 ± 112	159 ± 53	0,43
Douleurs musculaires (cm)	0,2 ± 0,6	0,0 ± 0,9	0,69
PPT du RF (kPa)	415 ± 127	406 ± 129	0,30
PPT du VL (kPa)	451 ± 88	433 ± 91	0,07
ROM (°)	151 ± 11	151 ± 13	0,61
Circonférence (cm)	57,5 ± 3,7	57,3 ± 3,3	0,42
Épaisseur musc. du RF (cm)	2,46 ± 0,35	2,58 ± 0,38	0,29
Épaisseur musc. du VL (cm)	2,34 ± 0,41	2,43 ± 0,42	0,09
Angle de pennation de RF (°)	12,9 ± 2,7	13,8 ± 3,8	0,28
Angle de pennation de VL (°)	9,7 ± 2,7	12,2 ± 4,1	**0,02**
μ du RF (pente)	0,44 ± 0,26	0,57 ± 0,27	**<0,001**
μ du VL (pente)	0,18 ± 0,09	0,2 ± 0,09	0,33

Tableau 7. Valeurs initiales (PRE) absolues de l'exercice 1 et de l'exercice 2 pour tous les paramètres. *FMV : force maximale volontaire ; NAV : niveau d'activation volontaire ; RTD : taux de développement du moment de force ; Tw_P : amplitude de la secousse musculaire potentialisée ; Db10 : amplitude du doublet à 10 Hz ; Db100 : amplitude du doublet à 100 Hz ; Db10/Db100 : rapport entre le doublet à 10 Hz et le doublet à 100 Hz ; PPT : seuil de pression de la douleur ; RF : rectus femoris ; VL : vastus lateralis ; ROM : amplitude de mouvement ; μ : module élastique de cisaillement. Les résultats avec une valeur de p < 0,05 étaient considérés comme significatifs et sont affichés en gras.*

2. Fonction neuromusculaire

Comme attendu, l'ANOVA a révélé un effet du temps pour les valeurs absolues du moment de FMV, de la secousse musculaire, du Db10, du Db100 et du ratio Db10/Db100 après l'exercice 1 et l'exercice 2 (p < 0,001 ; **Figure 45**). De plus, des interactions significatives (temps × exercice) ont été trouvées pour le moment de FMV, le Db10 et le Db100. Le test de Friedman a également révélé un effet temps pour les valeurs absolues du NAV après l'exercice 1 (p < 0,001) mais pas après l'exercice 2 (p = 0,79).

Le moment de FMV était significativement diminué jusqu'à 72 h après l'exercice 1 alors qu'il était diminué uniquement jusqu'à 4 h après l'exercice 2 (**Figure 45a**). De plus, l'analyse

post-hoc a révélé une moindre diminution du moment de FMV après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1 à tous les temps de mesure (**Figure 45a**).

Le NAV était significativement diminué jusqu'à 72 h après l'exercice 1 alors qu'aucun changement significatif n'a été observé après l'exercice 2. De plus, des changements plus importants de NAV ont été observés après l'exercice 1 par rapport à l'exercice 2 à POST (-6,8 ± 4,8 % *vs.* -1,9 ± 3,7 % ; p = 0,010) et 48 h (-5,1 ± 4,1 % *vs.* +0,2 ± 2,5 % ; p < 0,001), mais pas 4 h (-4,3 ± 5,4 % *vs.* -0,7 ± 3,5 % ; p = 0,072), 24 h (-4,5 ± 4,4 % *vs.* -1,5 ± 2,5 % ; p = 0,099), 72 h (-1,3 ± 2,7 % *vs.* +0,3 ± 2,2 % ; p = 0,152) et 7 jours (+0,2 ± 2,5 % *vs.* +0,3 ± 1,9 % ; p = 0,913) après l'exercice.

Le RTD était significativement diminué jusqu'à 48 h après l'exercice 1 alors qu'il était diminué uniquement jusqu'à 4 h après l'exercice 2 (**Figure 45b**). De plus, la diminution moyenne du RTD pendant les jours suivant l'exercice était plus faible après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1 (**Figure 45b**).

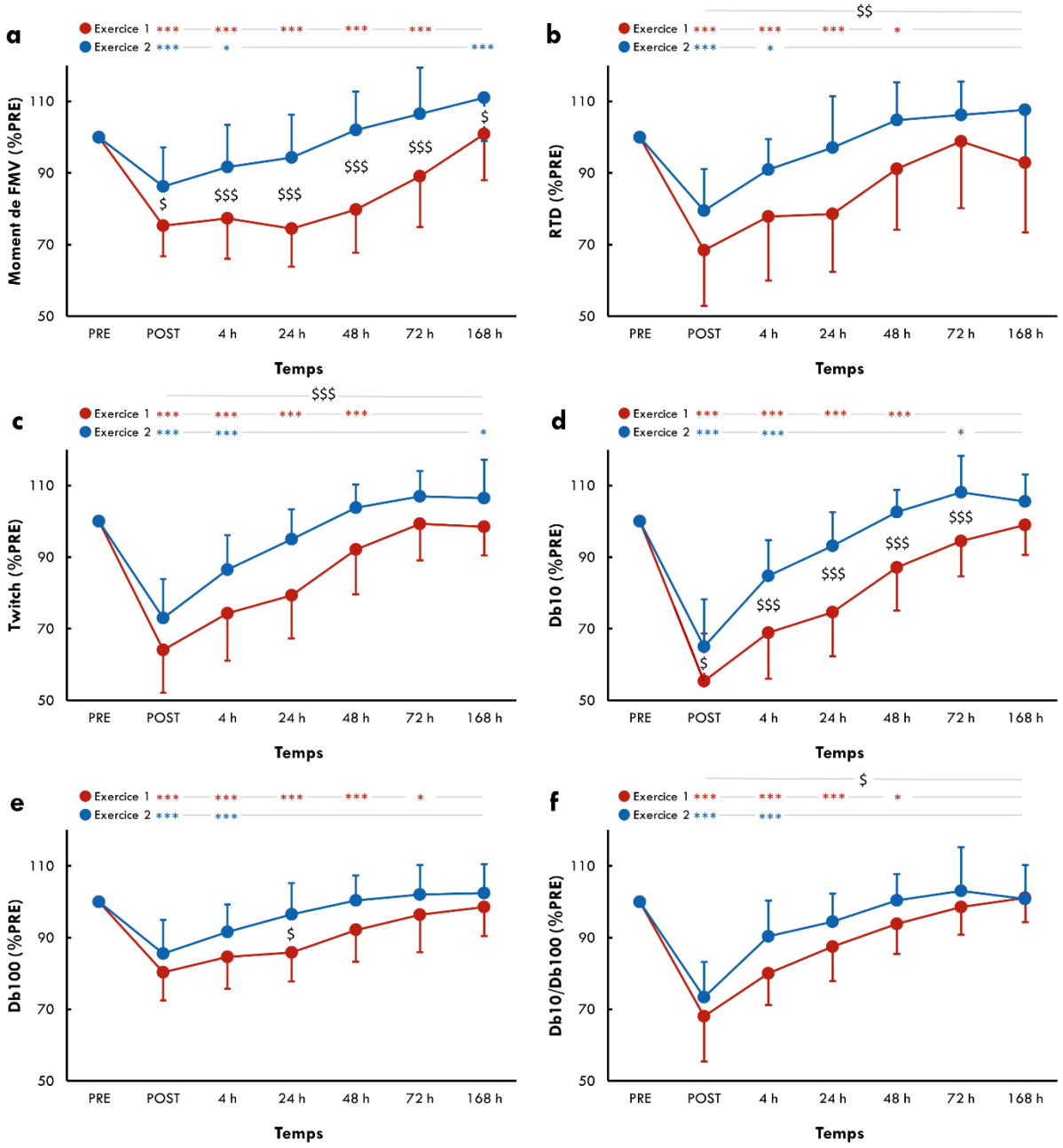
De même, l'amplitude de la secousse musculaire était significativement diminuée jusqu'à 48 h après l'exercice 1 alors qu'elle n'était diminuée que jusqu'à 4 h après l'exercice 2 (**Figure 45c**). De plus, la diminution moyenne de l'amplitude de la secousse musculaire pendant les jours suivant l'exercice était moindre après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1 (**Figure 45c**).

L'amplitude du Db10 était significativement diminuée jusqu'à 48 h après l'exercice 1 alors qu'elle n'était diminuée que jusqu'à 4 h après l'exercice 2 (**Figure 45d**). De plus, l'amplitude du Db10 était significativement moins diminuée après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1 entre POST et 72 h après l'exercice (**Figure 45d**).

L'amplitude du Db100 était significativement diminuée jusqu'à 72 h après l'exercice 1 alors qu'elle n'était diminuée que jusqu'à 4 h après l'exercice 2 (**Figure 45e**). De plus, l'amplitude du Db100 était significativement moins diminuée 24 h après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1 (**Figure 45e**).

Le ratio Db10/Db100 était significativement diminué jusqu'à 48 h après l'exercice 1 alors qu'il était diminué que jusqu'à 4 h après l'exercice 2 (**Figure 45f**). De plus, la diminution moyenne du ratio Db10/Db100 pendant les jours suivant l'exercice était moindre après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1 (**Figure 45f**).

Figure 45. Cinétique du moment de force maximale volontaire (FMV) (a), du taux de développement du moment de force (RTD) (b), de l'amplitude de la secousse musculaire (Twitch) (c), de l'amplitude du doublet à 10 Hz (Db10) (d) et à 100 Hz (Db100) (e) du rapport entre le doublet à 10 Hz et le doublet à 100 Hz (Db10/Db100) après l'exercice 1 (rouge) et 2 (bleu). **, ** et *** correspondent à une différence significative par rapport à la valeur PRE à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. $, $$ et $$$ correspondent à une différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement.*



3. Activité de la créatine kinase

L'ANOVA a révélé un effet du temps pour les valeurs absolues de l'activité de la CK après l'exercice 1 et l'exercice 2 ($p < 0,001$). L'activité de la CK a été augmentée respectivement jusqu'à 7 jours et 72 h après l'exercice 1 et l'exercice 2 (**Figure 46a**). De plus, un effet d'interaction significatif (temps × exercice) a été trouvé pour ce paramètre ($p < 0,001$). L'analyse post-hoc a révélé une moindre augmentation de ce paramètre après le deuxième exercice par rapport au premier exercice entre 6 h et 168 h (7 jours) après l'exercice (**Figure 46a**).

4. Douleurs musculaires par EVA

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps pour les douleurs musculaires après l'exercice 1 et l'exercice 2 ($p < 0,001$). Les douleurs musculaires ont augmenté jusqu'à 72 h après l'exercice 1 et l'exercice 2 (**Figure 46b**). De plus, une plus grande augmentation des douleurs musculaires a été constatée après l'exercice 1 par rapport à l'exercice 2 à POST, 24 h, 48 h et 72 h après l'exercice (**Figure 46b**).

5. Amplitude de mouvement

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps pour l'amplitude de mouvement articulaire après l'exercice 1 et l'exercice 2 ($p < 0,001$). L'amplitude de mouvement articulaire a diminué entre 24 et 72 h après l'exercice 1 et entre 24 h et 48 h après l'exercice 2 (**Figure 46c**). De plus, ce paramètre a moins diminué après le deuxième exercice par rapport au premier exercice à 48 h après l'exercice (**Figure 46c**).

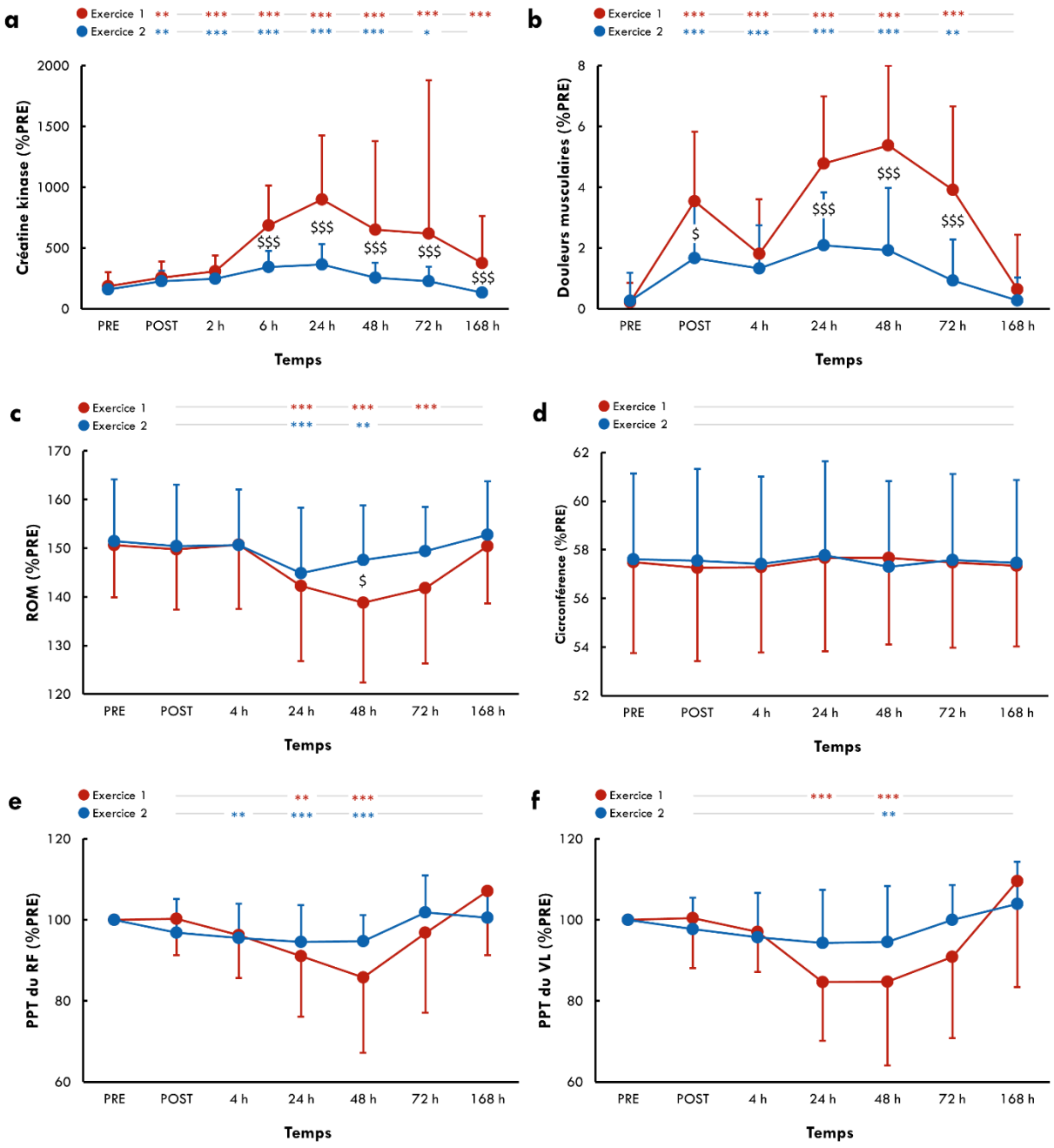
6. Circonférence de la cuisse

L'ANOVA n'a montré aucun effet significatif du temps ($p = 0,10$), de l'exercice ($p = 0,47$) ou de l'interaction (temps × exercice ; $p = 0,08$) pour la circonférence de la cuisse (**Figure 46d**).

7. Seuil de pression de la douleur musculaire

Le test de Friedman a montré un effet significatif du temps pour le seuil de pression de la douleur musculaire du RF et du VL après l'exercice 1 et l'exercice 2 ($p < 0,001$). Le seuil de pression de la douleur musculaire du RF était diminué 24 h et 48 h après l'exercice 1 et entre 4 h et 48 h après l'exercice 2 (**Figure 46e**), tandis que celui du VL a diminué 24 h et 48 h après l'exercice 1 et seulement 48 h après l'exercice 2 (**Figure 46f**). L'ANOVA à trois facteurs n'a montré aucun effet du muscle ($p = 0,451$)

Figure 46. Cinétique de l'activité de la créatine kinase (a), des douleurs musculaires (b), de l'amplitude de mouvement (ROM) (c), de la circonférence de la cuisse (d) et du seuil de pression de la douleur (PPT) pour le rectus femoris (RF) (e) et le vastus lateralis (VL) (f) pour les exercices 1 (rouge) et 2 (bleu). **, ** et *** correspondent à une différence significative par rapport à la valeur PRE à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement. $, $$ et $$$ correspondent à une différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,05, p < 0,01 et p < 0,001, respectivement.*



8. Épaisseur musculaire

L'ANOVA a révélé un effet du temps pour les valeurs absolues de l'épaisseur musculaire du RF après l'exercice 1 ($p < 0,001$) mais pas après l'exercice 2 ($p = 0,062$). De même, l'ANOVA a révélé un effet du temps pour les valeurs absolues de l'épaisseur musculaire du VL après l'exercice 1 ($p = 0,02$) mais pas après l'exercice 2 ($p = 0,431$). L'épaisseur

musculaire du RF a été augmentée jusqu'à 7 jours après l'exercice 1 (**Figure 47a**), tandis que celle du VL a été augmentée 24 h, 48 h et 7 jours après (**Figure 47b**). De plus, l'augmentation moyenne de l'épaisseur musculaire au cours des jours suivant l'exercice était plus faible après l'exercice 2 par rapport à l'exercice 1 pour le VL ($p = 0,009$; **Figure 47b**) mais pas pour le RF ($p = 0,094$; **Figure 47a**). L'ANOVA à trois facteurs a montré que l'épaisseur musculaire du RF était, en moyenne, plus augmentée que celle de VL ($p < 0,001$).

9. Angle de pennation

L'ANOVA a révélé un effet du temps pour les valeurs absolues de l'angle de pennation du RF après l'exercice 1 ($p = 0,006$) mais pas après l'exercice 2 ($p = 0,697$). De même, l'ANOVA a révélé un effet du temps pour les valeurs absolues du VL après l'exercice 1 ($p = 0,003$) mais pas après l'exercice 2 ($p = 0,758$). L'angle de pennation du RF était augmenté 4 h, 24 h et 48 h après l'exercice 1 (**Figure 47c**), tandis que celui du VL était augmenté 4 h et 24 h après (**Figure 47d**). L'ANOVA à trois facteurs n'a montré aucun effet du muscle ($p = 0,491$).

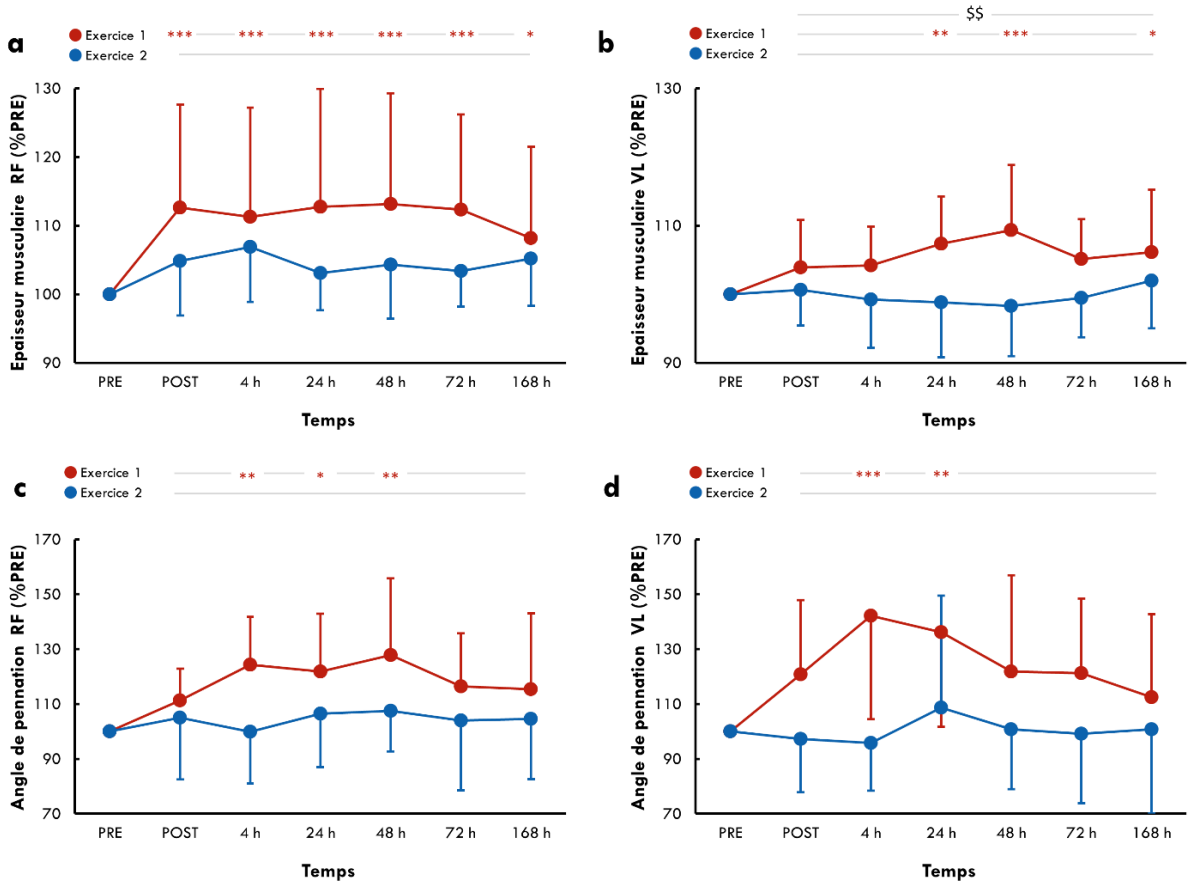


Figure 47. Cinétique de l'épaisseur musculaire du rectus femoris (RF) (a) et du vastus lateralis (VL) (b) et de l'angle de pennation du RF (c) et du VL (c) après l'exercice 1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). **, ** et *** correspondent à une différence significative par rapport à la valeur PRE à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement. $$: différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à $p < 0,01$.*

10. Module élastique de cisaillement (µ)

L'ANOVA a révélé un effet du temps pour les valeurs absolues du μ du RF après l'exercice 1 et l'exercice 2 ($p < 0,001$). De même, l'ANOVA a révélé un effet du temps pour les valeurs absolues du μ du VL après l'exercice 1 ($p < 0,001$) et l'exercice 2 ($p = 0,01$). Le μ du RF a été augmenté jusqu'à 7 jours après l'exercice 1 (**Figure 48a**). Le μ du VL a augmenté de manière transitoire jusqu'à 24 h après l'exercice 1, alors qu'aucun changement significatif n'a été observé après l'exercice 2 (**Figure 48b**). L'augmentation moyenne des valeurs relatives aux valeurs PRE du μ du RF au cours des jours suivant l'exercice était plus faible après l'exercice 2 comparé à l'exercice 1 (**Figure 48a**). Cependant, les valeurs relatives du μ du VL μ n'étaient pas significativement différentes entre les exercices (**Figure 48b**). Aucune interaction significative (temps × exercice) n'a été trouvée pour le μ des muscles RF et VL.

La valeur PRE absolue du μ du RF était significativement plus élevée pour l'exercice 1 par rapport à l'exercice 2 (**Figure 48c**). Aucune différence n'a été observée pour les valeurs PRE absolues du μ du VL entre l'exercice 1 et l'exercice 2 (**Figure 48c**). Les valeurs PRE absolues du μ étaient significativement plus élevées pour RF par rapport à VL pour les exercices 1 et 2 (**Figure 48c**). De plus, l'augmentation moyenne des valeurs relatives aux valeurs PRE du μ au cours des jours suivant l'exercice était inférieure pour le VL par rapport au RF après l'exercice 1 ($p = 0,04$) mais pas après l'exercice 2 ($p = 0,87$).

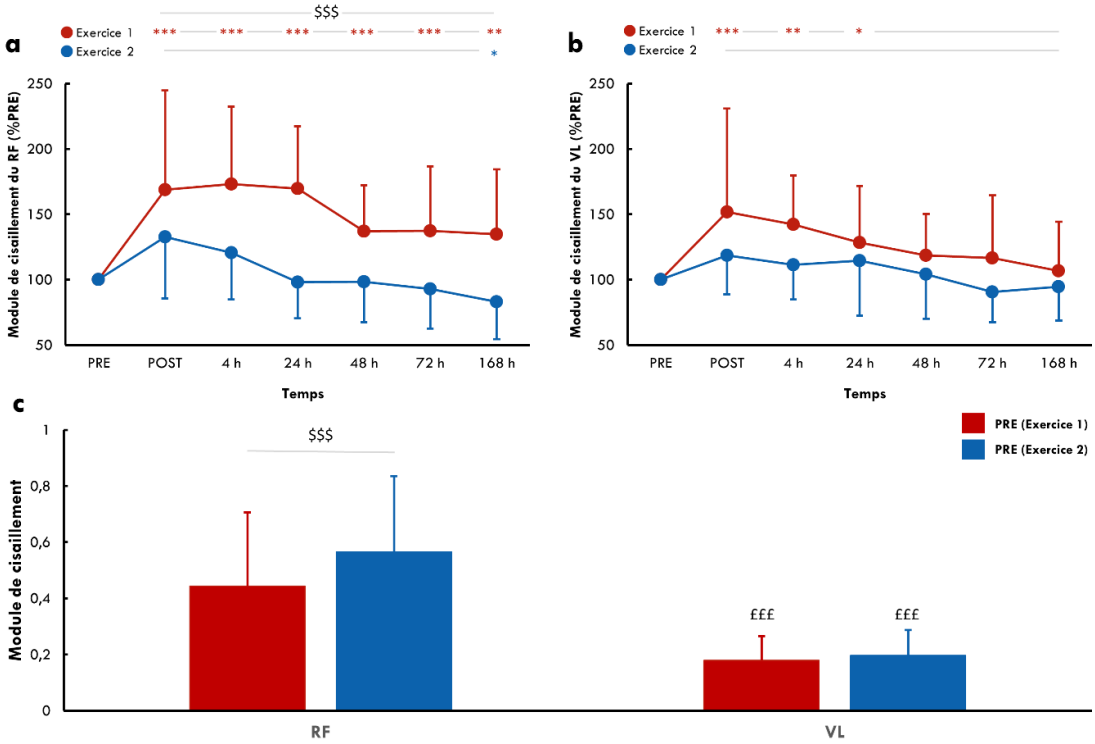


Figure 48. Cinétique du module de cisaillement du rectus femoris (RF) (A) et du vastus lateralis (VL) (B) pour les exercices 1 (rouge) et 2 (bleu), et les valeurs initiales (PRE) absolues du module de cisaillement des muscles RF et VL (pente) pour l'exercice 1 (rouge) et l'exercice 2 (bleu). **, ** et *** correspondent à une différence significative par rapport à la valeur PRE à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement. $$$: différence significative entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à $p < 0,001$, £££ : différence significative par rapport à la valeur du RF à $p < 0,001$.*

11. Corrélation entre le µ mesuré 14 jours après l'exercice 1 et l'indice de protection

Une corrélation a été trouvée entre les changements relatifs du µ du RF mesurés 14 jours après le premier exercice (*i.e.*, modifications entre les valeurs PRE de l'exercice 1 et de l'exercice 2) et les deux IP du µ du RF (**Figure 49a**). Plus l'augmentation du µ du RF mesurée 14 jours après le premier exercice était importante, plus l'augmentation du µ du RF après le deuxième exercice par rapport au premier épisode était faible (**Figure 49a**). De même, une corrélation a été trouvée entre les changements relatifs du µ du VL mesurés 14 jours après le premier exercice, et les deux IP du µ du VL (**Figure 49b**). Plus l'augmentation du µ du VL mesurée 14 jours après le premier exercice était importante, plus l'augmentation du µ du VL après le deuxième exercice par rapport au premier épisode était faible (**Figure 49b**).

Une corrélation a également été trouvée entre les changements relatifs du µ du RF mesurés 14 jours après le premier exercice et l'IP à 7 jours du Db10 mais aucune corrélation n'a été montrée avec l'IP pour l'amplitude des altérations du Db10 (**Figure 49c**). Plus l'augmentation du µ du RF mesurée 14 jours après le premier exercice était importante, plus la diminution du Db10 après le deuxième exercice par rapport au premier exercice était faible (uniquement pour les changements à 7 jours ; **Figure 49c**). Enfin, une corrélation significative a été trouvée entre les changements relatifs du µ du RF mesurés 14 jours après le premier exercice et les deux IP du RTD (**Figure 49d**). Plus l'augmentation du µ du RF mesurée 14 jours après le premier exercice était grande, plus la diminution du RTD après le deuxième exercice par rapport au premier épisode était faible (**Figure 49d**).

Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre les changements relatifs des µ des muscles RF et VL mesurés 14 jours après le premier exercice et les deux IP pour les paramètres neuromusculaires et les autres symptômes de dommages musculaires (activité de la CK, douleurs musculaires, circonférence de la cuisse).

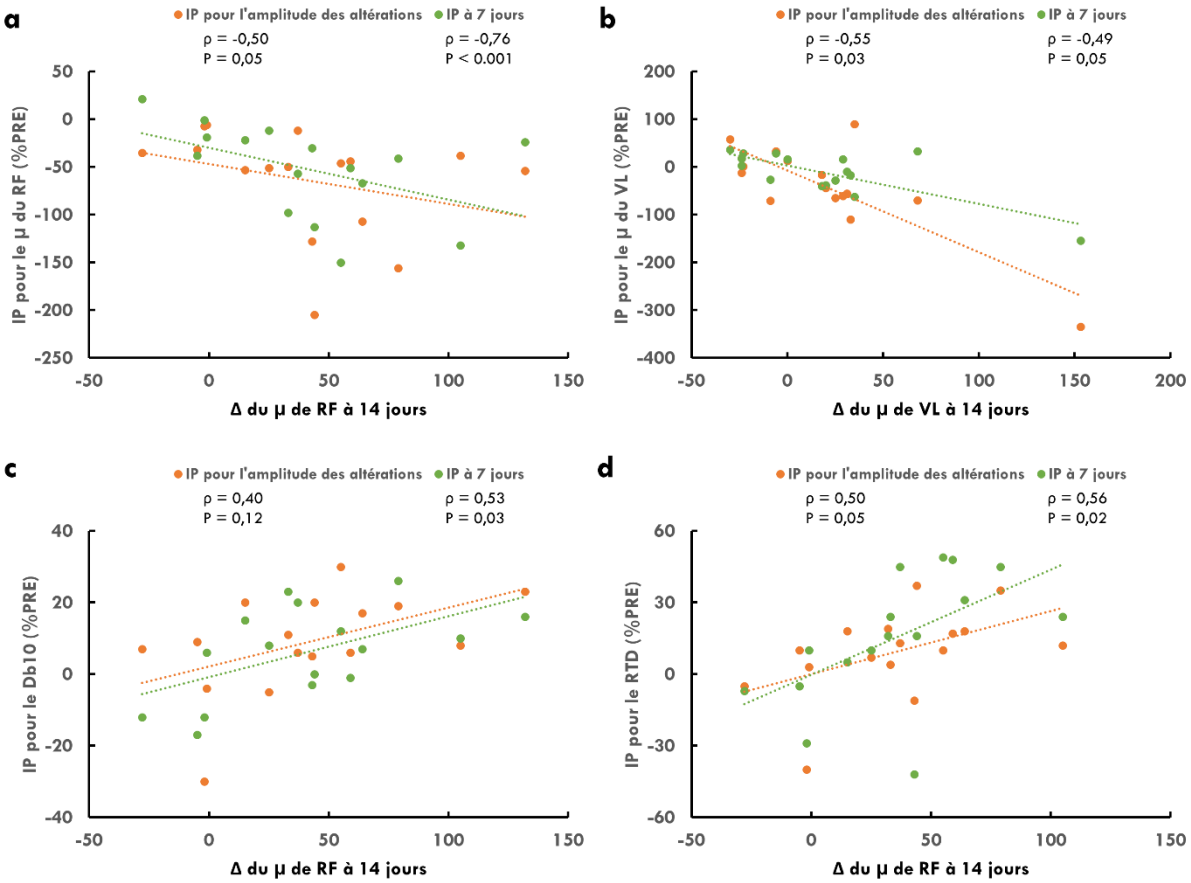


Figure 49. (a) Corrélation entre les modifications (Δ) du module élastique de cisaillement (μ) du muscle rectus femoris (RF) mesuré 14 jours après le premier exercice (i.e., modifications entre les valeurs PRE de l'exercice 1 et de l'exercice 2) et l'indice de protection (IP) pour l'amplitude des altérations (orange) et pour le taux de récupération à 7 jours (vert) du μ du RF. (b) Corrélation entre les Δ du μ du muscle vastus lateralis (VL) mesurés 14 jours après le premier exercice et l'IP pour l'amplitude des altérations (orange) et pour le taux de récupération (vert) du μ du VL. (c) Corrélation entre les Δ du μ du RF mesurés 14 jours après le premier exercice et l'IP pour l'amplitude des altérations (orange) et pour le taux de récupération à 7 jours (vert) de l'amplitude du doublet à 10 Hz (Db10). (d) Corrélation entre les Δ du μ du RF mesurés 14 jours après le premier exercice et l'IP pour l'amplitude des altérations (orange) et pour le taux récupération à 7 jours (vert) du taux de développement du moment de force (RTD).

E. Discussion

Cette étude avait pour objectif de déterminer si le μ de repos des muscles du quadriceps (muscles VL et RF) était sensible au RBE. Nous avons observé que le μ de repos augmentait dans une moindre mesure et pour une durée plus courte après le deuxième exercice de marche en descente par rapport au premier exercice effectué deux semaines plus tôt, confirmant ainsi l'hypothèse selon laquelle le premier exercice confère une adaptation de la raideur musculaire du RF. En effet, le μ du RF est resté élevé deux semaines après la fin du premier exercice (*i.e.*, avant le deuxième exercice), lorsque les autres symptômes de dommages musculaires ont disparu. Cependant, l'adaptation n'a pas été observée pour le μ du VL, confirmant l'hypothèse que la réponse adaptative diffère entre les muscles RF et VL. De plus, nous avons constaté que l'augmentation de la raideur musculaire du RF mesurée 14 jours après le premier exercice était corrélée à la protection fonctionnelle conférée par le RBE (*i.e.*, l'atténuation des altérations musculaires comme le μ, le Db10 et le RTD après le deuxième exercice).

1. Amplitude et cinétique des symptômes classiques de dommages musculaires

Comme attendu, la répétition d'un exercice de marche en descente a induit un RBE : les symptômes de dommages musculaires (*e.g.*, activité de la CK, douleurs musculaires, épaisseur musculaire, amplitude de mouvement) et les altérations neuromusculaires (moment de FMV, NAV, RTD, secousse musculaire, Db10, Db100, Db10/Db100) étaient moins importants et ont récupéré plus rapidement après l'exercice 2. Ceci est cohérent avec les résultats de précédentes études (Chen et coll., 2012a; Clarkson et coll., 1992; Souron et coll., 2018). La moindre diminution du NAV observée après le deuxième exercice par rapport au premier exercice suggère que la différence de réduction du moment de FMV entre les deux exercices pourrait s'expliquer en partie par des facteurs nerveux, ce qui est cohérent avec la littérature. En effet, Goodall et coll. (2017) ont montré que le RBE peut s'expliquer en partie par des modifications de la commande motrice au niveau cortico-spinal (*i.e.*, une moindre réduction après le deuxième exercice du NAV mesuré à l'aide de la stimulation du cortex moteur). Les moindres symptômes de dommages musculaires observés les jours suivant le deuxième exercice pourraient être associés à une activité réduite des afférences nociceptives III et IV, et à une diminution des altérations au niveau spinal et/ou supra-spinal qui pourraient avoir un impact sur le NAV (Behrens et coll., 2012). En accord avec Souron et coll. (2018), nous avons également constaté que des facteurs périphériques (*i.e.*, musculaires) étaient largement impliqués dans la réduction

de la perte de fonction neuromusculaire observée après le deuxième exercice. En effet, les amplitudes des réponses mécaniques évoquées (secousse musculaire, Db10 et Db100), et le ratio Db10/Db100 étaient moins affectés après le deuxième exercice par rapport au premier. Nous avons montré que le couplage E-C estimé par Db10/Db100 était plus affecté et pendant une durée plus longue après le premier exercice par rapport au deuxième exercice (48 h *vs*. 4 h), suggérant moins d'altérations de l'homéostasie du calcium après le deuxième exercice. Ceci est cohérent avec Janecki et coll. (2016) qui ont montré que la fatigue à basse fréquence était plus affectée 24 et 48 h après un premier exercice par rapport à un deuxième exercice excentrique des fléchisseurs du coude.

2. Amplitude et cinétique du µ musculaire

En accord avec les résultats rapportés dans la littérature (Lacourpaille et coll., 2014), nous avons constaté que les µ de repos des muscles VL et RF étaient significativement augmentés de POST à 24 h après le premier exercice. L'une des principales hypothèses expliquant l'augmentation du µ musculaire de repos après un exercice excentrique est la perturbation de l'homéostasie calcique (*i.e.*, l'augmentation de la concentration intramusculaire de calcium) (Lacourpaille et coll., 2014; Lacourpaille et coll., 2017) induite par l'altération des protéines musculaires structurelles (Paulsen et coll., 2012). En effet, l'augmentation de la concentration de calcium intramusculaire pourrait induire une augmentation du nombre de ponts actine-myosine formés au repos. Cependant, l'augmentation du µ du RF est présente au-delà de 48 h après le premier exercice, lorsque la fonction du couplage E-C (*i.e.*, Db10/Db100) est complètement rétablie. Ces résultats suggèrent que la perturbation de la régulation du calcium n'était pas le seul mécanisme impliqué dans l'augmentation du µ musculaire. Il est possible que cette augmentation tardive soit due à la présence d'œdème (Howell et coll., 1993). En effet, même si nous n'avons pas montré d'augmentation de la circonférence de la cuisse, nous avons montré une augmentation de l'épaisseur musculaire (pic : ~+10%) jusqu'à 7 jours pour le RF et 24 h, 48 h et 7 jours après l'exercice pour le VL, reflétant potentiellement le gonflement du muscle (Clarkson et coll., 1992). Sur la base de ces résultats, nous ne pouvons pas écarter l'effet de l'accumulation de liquide survenant dans les jours suivant un exercice excentrique sur la raideur musculaire. Il est important de noter que l'amplitude de mouvement articulaire (*i.e.*, la raideur à l'articulation du genou) était affectée différemment par l'exercice excentrique par rapport au µ de repos (*i.e.*, la raideur musculaire). En effet, l'amplitude de mouvement articulaire n'était augmentée qu'entre 24 h et 72 h. Ces écarts en termes de cinétique

d’évolution pourraient s'expliquer par le fait que l’amplitude mouvement articulaire représente une raideur articulaire globale alors que le μ musculaire représente des muscles individuels.

3. Augmentation à long terme du μ musculaire, une adaptation « protectrice »

Le μ du RF est resté élevé jusqu'à 14 jours après le premier exercice. Ce résultat est en accord avec Lacourpaille et coll. (2014) qui ont rapporté un μ de repos élevé jusqu’à 21 jours après un exercice excentrique des fléchisseurs du coude. Ces auteurs (Lacourpaille et coll., 2014) ont suggéré que les muscles devenaient plus raides en réponse à un exercice induisant des dommages musculaires pour protéger les muscles contre des dommages musculaires ultérieurs. Cependant, ces auteurs n’étaient pas en mesure de confirmer cette hypothèse en raison d'une récupération incomplète de la fonction musculaire 21 jours après l'exercice excentrique, suggérant que le μ de repos pourrait également être dû à des dommages persistants. Dans la présente étude, comme les symptômes de dommages musculaires avaient disparu (*e.g.*, réduction du moment de FMV) 14 jours après le premier exercice, il semble raisonnable de supposer que l'augmentation du μ du RF à cet instant pourrait refléter des adaptations des tissus musculaires et/ou conjonctifs.

Nous avons également montré que les augmentations du μ des muscles RF et VL observées 14 jours après le premier exercice (+28% et +10%, respectivement) étaient corrélées avec les IP pour l'amplitude des modifications et l’amplitude de la récupération. Ces corrélations confirment que le muscle pourrait devenir plus raide pour conférer une protection contre un exercice subséquent pouvant induire des dommages musculaires, comme suggéré par Hyldahl et coll. (2017). Ces auteurs ont rapporté que le remodelage de la matrice extracellulaire du muscle squelettique pourrait augmenter la raideur passive durant les semaines suivant un exercice excentrique. Nous avons également montré que l'augmentation du μ du RF observée 14 jours après le premier exercice était corrélée à la protection fonctionnelle conférée par le RBE (*i.e.*, l'atténuation des altérations du Db10 et du RTD après le deuxième exercice). Le fait que l'augmentation à long terme de la raideur musculaire conférée par un exercice excentrique affecte principalement la production de force sous-maximale est cohérent avec le fait que ces réponses sont plus sensibles aux changements des propriétés mécaniques (Maffiuletti et coll., 2016). D'un point de vue fonctionnel, les changements de raideur musculaire pourraient avoir un impact sur les tâches fonctionnelles sous-maximales qui impliquent un cycle étirement-raccourcissement comme la marche ou la course (Saunders et coll., 2004), où la raideur musculaire est un des déterminants de la performance.

4. Différences entre les réponses des muscles RF et VL

Nous avons émis l'hypothèse que l'amplitude de l'altération et la réponse adaptative seraient différentes entre les muscles du quadriceps (*i.e.*, RF *vs.* VL) car les muscles pourraient être étirés de manière hétérogène pendant l'exercice, en raison de leurs différences anatomiques (*i.e.*, muscles mono- et bi-articulaires) (Green et coll., 2012; Maeo et coll., 2018). Bien que le seuil de pression de la douleur musculaire des muscles RF et VL n'ait pas été affecté différemment après les exercices, l'épaisseur musculaire du RF était, en moyenne, plus augmentée que celle du VL. De plus, le μ du RF était plus augmenté et pour une durée plus longue par rapport au μ du VL après l'exercice 1 (jusqu'à 14 jours et 24 h, respectivement). Ces résultats sont cohérents avec les résultats des études précédentes montrant que le RF est plus affecté que les autres chefs musculaires du quadriceps après un exercice excentrique (Ema et coll., 2021; Heales et coll., 2018; Lacourpaille et coll., 2017; Maeo et coll., 2018; Xu et coll., 2019).

Le μ du RF a augmenté 14 jours après le premier exercice (*i.e.*, avant le deuxième exercice) alors qu'aucune augmentation du μ du VL n'a été observée à ce moment-là. Comme le μ du RF était plus affecté que le μ du VL en termes d'amplitude et de durée, il est possible que la contrainte mécanique induite par la marche en descente n'ait pas été suffisante pour induire un niveau important de dommages et une adaptation mécanique sur le muscle VL. En effet, Hyldahl et coll. (2017) ont rapporté que l'amplitude de l'effet protecteur est liée à l'intensité de l'exercice initial. De plus, nos résultats sont cohérents avec ceux d'Ema et coll. (2021) qui ont montré que le RBE était conféré pour le RF mais pas le VL après des contractions excentriques des extenseurs du genou.

5. Limites

Comme l'orientation des fascicules par rapport aux faisceaux d'ultrasons affecte la vitesse des ondes de cisaillement (Eby et coll., 2013), une modification différente de l'angle de pennation entre les muscles au cours du temps pourrait affecter différemment le μ selon les muscles (Lacourpaille et coll., 2012). L'augmentation de l'angle de pennation des muscles RF et VL observée entre 4 h et 48 h après le premier exercice pourrait diminuer la vitesse des ondes de cisaillement, ce qui pourrait contribuer à sous-estimer le μ des muscles RF et VL à ces instants. Après l'exercice 2, aucun changement de l'angle de pennation n'a été observé pour les muscles RF et VL. Par conséquent, l'angle de pennation ne devrait pas affecter le μ après le deuxième exercice. Comme μ pourrait être sous-estimé après l'exercice 1 mais pas après

l'exercice 2, l'amplitude de la différence de μ entre les deux exercices pourrait être sous-estimée. Si cet effet est présent, il est certainement faible. En effet, il convient de noter que les modifications de l'angle de pennation sont relativement faibles (< 5°) dans la présente étude, ce qui devrait avoir un effet très faible sur la vitesse des ondes de cisaillement.

F. Conclusion

Le μ de repos (*i.e.*, la raideur musculaire) a augmenté dans une moindre mesure et pendant une durée plus courte après un deuxième exercice excentrique par rapport au même exercice effectué deux semaines plus tôt, représentant les adaptations conférées par le RBE. Le premier exercice induisant des dommages musculaires a conduit à une augmentation persistante (*i.e.*, au moins deux semaines) de la raideur musculaire, reflétant potentiellement une adaptation mécanique impliquée dans le RBE. En effet, cette augmentation persistante du μ musculaire était corrélée à la protection fonctionnelle conférée par le RBE. L'adaptation mécanique est plus évidente sur le muscle qui a subi le plus d'altérations de raideur musculaire après le premier exercice (*i.e.*, RF). Il est possible qu'un certain niveau de stress mécanique soit nécessaire pour induire cette augmentation persistante du μ musculaire. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les modifications de la raideur musculaire après des exercices excentriques. L'activation musculaire et les comportements mécaniques musculaires devraient être étudiés au cours de l'exercice afin de mieux comprendre les différences de modifications des μ musculaires entre les muscles synergistes. D'autres études devraient également étudier les mécanismes impliqués dans les modifications aiguës et à long terme des propriétés mécaniques musculaires du muscle et leur implication dans le RBE.

À retenir :

- La raideur musculaire mesurée par élastographie semble augmenter dans une moindre mesure et sur une durée plus courte après un deuxième exercice excentrique par rapport au même exercice effectué deux semaines auparavant.
- L'augmentation à long terme (*i.e.*, deux semaines) de la raideur musculaire pourrait être une adaptation mécanique impliquée dans le RBE car elle est corrélée à la protection fonctionnelle conférée par le RBE.
- L'adaptation semble être plus importante sur le muscle ayant subi le plus d'altérations de la raideur musculaire après le premier exercice de marche en descente, suggérant qu'un certain niveau de stress mécanique est nécessaire pour induire des adaptations.

Sous-partie 3. Effet de l’angle articulaire sur les paramètres de la fonction neuromusculaire après un exercice excentrique

La recherche de nouveaux marqueurs de dommages musculaires permettant un diagnostic précoce est importante, afin de pouvoir adapter au plus vite les stratégies de récupération et d'optimiser les programmes d'entrainement. Cependant, aucun marqueur ne semble permettre de prédire de façon fiable les altérations prolongées de la fonction neuromusculaire. Une évaluation de la fonction neuromusculaire semble donc rester, à l'heure actuelle, le meilleur moyen évaluer l'état fonctionnel d'un groupe musculaire. Cependant, l'angle articulaire auquel est réalisée l'évaluation peut impacter les réponses neuromusculaires au repos et en réponse à un exercice induisant des dommages musculaires (Byrne et coll., 2001; Child et coll., 1998; Philippou et coll., 2003; Saxton & Donnelly, 1996). En effet, la force produite est dépendante de la longueur musculaire (**Figure 3**) (Rassier et coll., 1999), mais la relation force-longueur pourrait également être modifiée en réponse à l'exercice excentrique (Prasartwuth et coll., 2006). Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans cette modification de la dépendance à l'angle articulaire (*i.e*. la longueur musculaire) est donc cruciale d'un point de vue méthodologique (*e.g*., choix de l'angle articulaire, interprétation des résultats).

I. Étude 3c : Les propriétés contractiles sont moins affectées à grandes qu'à courtes longueurs musculaires après un exercice excentrique

Cette étude a fait l'objet d'une soumission dans l'*European Journal of Applied Physiology* le 21/03/2022 (annexe 7) :

Contractile properties are less affected at long than short muscle length after eccentric exercise. **Chalchat E**, Siracusa J, Bourrilhon C, Charlot K, Gennisson J-L, Garcia-Vicencio S, Martin V.

A. Résumé

Objectif : L'objectif de la présente étude était de déterminer si les réponses musculaires évoquées électriquement sont différemment affectées au cours du temps par l'angle articulaire du genou après des dommages musculaires induits par l'exercice. Nous avons émis l'hypothèse que les réponses évoquées à basse fréquence seraient moins affectées à grandes qu'à courtes longueurs musculaires, et que des mécanismes explicatifs seraient situés au niveau des tissus musculaires et tendineux.

Méthodes : Quinze hommes ont effectué un exercice de marche en descente (durée : 45 min ; vitesse : 4,5 $km.h^{-1}$; pente : -25 % ; charge : 30 % de la masse corporelle). Le moment de FMV, l'angle optimal pour la production de moment de force, le NAV, les doublets à 10 et 100 Hz, le RTD, la potentialisation post-activation (PAP), le module élastique de cisaillement musculaire (μ) et la raideur de l'aponévrose ont été évalués avant, après et 4, 24, 48, 72 et 168 h après l'exercice à un angle de genou de 40°, 90° et 120° (0° : extension complète).

Résultats : Le moment de FMV, le NAV et l'amplitude du Db100 ont été diminués de manière similaire pour les trois angles articulaires évalués, et l'angle optimal n'a pas été affecté. L'amplitude de la secousse musculaire et du Db10, le ratio Db10/Db100, la PAP et le RTD étaient moins affectés et le μ musculaire plus augmenté aux grandes longueurs musculaires par rapport aux longueurs plus courtes ($p < 0,05$), en particulier pendant les 24 premières heures après l'exercice.

Conclusion : Les réponses évoquées à basse fréquence étaient davantage préservées à grandes qu'à courtes longueurs musculaires durant les 24 premières heures après l'exercice, suggérant que l'angle articulaire devrait être systématiquement pris en compte pour évaluer les altérations musculaires après des exercices induisant des dommages musculaires. Cette dépendance à la longueur semble être associée à la plus grande sensibilité au Ca^{2+} et à l'augmentation plus importante de la raideur musculaire aux grandes longueurs musculaires par rapport aux longueurs les plus courtes.

B. Problématiques et objectifs

Les paramètres de la fonction neuromusculaire (FMV, NAV, secousse musculaire, Db10, Db100, RTD) sont généralement mesurés à une longueur musculaire spécifique (Warren et coll., 1999), car ils sont modifiés par la longueur musculaire (*i.e*, l'angle articulaire) (Rassier et coll., 1999). La dépendance à l'angle articulaire des réponses évoquées peut s'expliquer par le nombre de ponts actine-myosine formés (chevauchement des myofilaments), la sensibilité au calcium des myofilaments due aux modifications de l'espace entre les myofilaments, le bras de levier musculaire et le moment de force passif de l'ensemble musculo-tendineux (dû à la raideur des tissus) (MacIntosh, 2017; Rassier et coll., 1999).

Après des dommages musculaires induits par l'exercice, cette dépendance à la longueur peut être modifiée. Premièrement, il a été démontré que l'angle optimal pour la production du moment de force peut être déplacé vers les grandes longueurs musculaires après un exercice excentrique (Brockett et coll., 2001; Morgan & Allen, 1999). Ce déplacement vers la droite de la relation force-longueur entraîne une diminution plus importante du moment de FMV aux courtes qu'aux grandes longueurs musculaires (Child et coll., 1998; Philippou et coll., 2003; Saxton & Donnelly, 1996). Des altérations centrales (*i.e*. nerveuses) (Byrne et al. 2001 ; Prasartwuth et al. 2006 ; Skurvydas et al. 2010) plus importantes à courtes longueurs musculaires par rapport aux plus grandes peuvent aussi contribuer à cette dépendance à l'angle articulaire. Des facteurs périphériques peuvent également modifier cette dépendance à la longueur. En effet, Prasartwuth et coll. (2006) ont observé que la courbe force-angle articulaire avait tendance à plafonner aux grandes longueurs musculaires dans les heures et les jours suivant un exercice excentrique des fléchisseurs du coude, mais les mécanismes sous-jacents n'ont pas été identifiés.

Deux facteurs pourraient expliquer ce phénomène : (i) l'homéostasie du Ca^{2+} et (ii) les propriétés mécaniques de l'ensemble muscle-tendon. La libération de calcium est réduite après les dommages musculaires (Balnave & Allen, 1996), mais cette altération peut être compensée par l'augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} à grande longueur musculaire (Balnave & Allen, 1996) et par l'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ intracellulaire au repos. Comme les réponses à basse fréquence (*i.e*., secousse musculaire, doublet à basse fréquence) sont connues pour être plus sensibles (i) à la libération de Ca^{2+} et aux changements de sensibilité (Edwards et coll., 1977) et (ii) à la dépendance à la longueur de la sensibilité au Ca^{2+} (Roszek et coll., 1994) que les réponses à haute fréquence (*i.e*., doublet à haute fréquence), les réponses pourraient être mieux préservées à grande longueur musculaire. Cela peut également entraîner une réduction de la

fatigue à basse fréquence à grande longueur musculaire (Skurvydas et coll., 2010). De plus, cela pourrait affecter l'amplitude de la potentialisation en fonction de la longueur musculaire évaluée. Pourtant ces hypothèses ne sont, à l'heure actuelle, pas vérifiées.

Les propriétés mécaniques de l'ensemble muscle-tendon sont également modifiées après les dommages musculaires puisqu'il a été démontré que la raideur de l'ensemble muscle-tendon augmentait dans les jours suivant des contractions excentriques (Howell et coll., 1993). Dans les premières heures suivant l'exercice, cela semble être expliqué par une perturbation de l'homéostasie du Ca^{2+} due à l'altération du sarcolemme (Proske & Morgan, 2001), entraînant une augmentation de la [Ca^{2+}] intracellulaire au repos (Whitehead et coll., 2001). Dans les jours suivant un exercice induisant des dommages musculaires, le développement d'un œdème pourrait également augmenter la pression intramusculaire et modifier l'architecture musculaire (*e.g.*, angle de pennation, épaisseur musculaire) (Yu et coll., 2015), et perturber la mécanique contractile au niveau musculaire (*e.g.*, raccourcissement musculo-tendineux) (Ishikawa et coll., 2006). Cela entraînerait une augmentation de la raideur musculaire passive et active. L'œdème peut également exercer une pression sur les tissus comme le périmysium et l'épimysium, entraînant ainsi une augmentation de la raideur des tissus tendineux (Proske & Morgan, 2001; Whitehead et coll., 2001). La contribution relative des tissus musculaires et tendineux à l'augmentation du moment de force passif pourrait varier dans le temps et en fonction de la longueur musculaire après des dommages musculaires. Cependant, nos connaissances sur ces aspects sont actuellement limitées. Au niveau musculaire, Lacourpaille et coll. (2014) ont montré une augmentation du µ de repos à courte longueur musculaire 1 h après un exercice excentrique, mais aucune différence n'a été observée 2 et 21 jours après. A grande longueur musculaire, ces auteurs ont montré une augmentation plus importante et plus longue (jusqu'à 21 jours) du µ. On ignore actuellement dans quelle mesure les propriétés mécaniques du tissu tendineux (*e.g.*, la raideur) varient dans le temps et en fonction de la longueur musculaire après un exercice excentrique. En termes de production de moment de force actif, les changements intervenant au niveau des tissus musculaires et tendineux pourraient affecter les propriétés contractiles. Comme les réponses évoquées à basse fréquence (*i.e.*, secousse musculaire, doublet à basse fréquence) sont plus sensibles aux changements des propriétés mécaniques musculo-tendineuses que les réponses à haute fréquence (*i.e.*, doublet à haute fréquence), elles pourraient être « artificiellement » plus préservées à grande longueur musculaire en réponse aux dommages musculaires (Maffiuletti et coll., 2016). Par conséquent, l'évaluation des altérations neuromusculaires après des exercices induisant des dommages musculaires pourrait

être influencée par l'angle articulaire (*i.e.*, par la longueur de l'ensemble muscle-tendon), notamment pour les réponses à basse fréquence.

L'objectif de la présente étude était (1) de déterminer si les réponses musculaires évoquées électriquement (*i.e.*, Db10, Db100, Db10/Db100, RTD) sont affectées différemment au cours du temps par l'angle articulaire du genou après un exercice induisant des dommages musculaires, et (2) d'identifier les mécanismes sous-jacents associés. Nous avons émis l'hypothèse (i) que les réponses évoquées à basse fréquence seraient moins affectées à grandes qu'à courtes longueurs musculaires, et (ii) que des mécanismes situés au niveau des tissus musculaires et tendineux seraient impliqués, et que leurs contributions relatives pourraient varier dans le temps. Pour vérifier cette hypothèse, les moments de force volontaires et évoqués des extenseurs du genou ont été mesurés à différents angles de genou (longueur musculaire « courte », « neutre » et « grande ») avant, après et dans les heures/jours suivant un exercice induisant des dommages musculaires. L'élastographie par ondes de cisaillement et l'imagerie par ultrasons ultrarapides ont été utilisées pour mesurer les propriétés mécaniques des muscles et des aponévroses.

C. Procédures expérimentales

1. Participants

Parmi les dix-neuf participants ayant effectué l'expérimentation (*cf.* **étude 3a**), les données d'un sous-ensemble de quinze hommes (âge : 32,2 ± 5,8 ans, masse corporelle : 78,7 ± 11,5 kg, taille : 1,80 ± 0,06 m, indice de masse corporelle : 24,3 ± 2,4 $kg.m^{-2}$ et masse grasse : 15,6 ± 5,6 %) ont été utilisées pour cette étude, en raison de valeurs manquantes pour certains paramètres.

2. Protocole

Contrairement aux **études 3a et 3b**, uniquement les données issues de la première partie du protocole (*i.e.*, premier exercice) ont été utilisées (**Figure 17**). La fonction neuromusculaire (moments de force volontaire et évoqué), la douleur musculaire et les propriétés mécaniques musculo-tendineuses (raideur musculaire et aponévrotique) ont été évaluées sur le membre droit avant (PRE), dans la première heure (POST) et dans les heures/jours (4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h) suivant l'exercice de marche en descente. Les évaluations de la fonction neuromusculaire (moment de force volontaire et évoqué) ont été effectuées à trois angles articulaires (angles de genou : 40° : courte ; 90° : neutre ; 120° : grande ; 0 ° = extension complète).

3. Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été effectuées pour évaluer les changements par rapport aux valeurs de PRE et pour comparer les variations de PRE à chaque instant (POST, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 168 h) entre les angles articulaires. La normalité et l'homogénéité des données a été évaluée à l'aide des tests de Shapiro-Wilk et de Levene, respectivement. Une ANOVA à une voie a été utilisée pour comparer les valeurs PRE (absolues) entre les angles du genou (40 °, 90 °, 120 °). Une ANOVA à une voie et à mesures répétées a été utilisée pour évaluer les changements de l'angle optimal par rapport aux valeurs PRE. Lorsque les hypothèses de normalité et d'homogénéité n'étaient pas respectées, une analyse de variance de Friedman non-paramétrique a été effectuée. Une ANOVA à deux voies et à mesures répétées (effet : temps × angle) a été effectuée sur des valeurs absolues pour évaluer les changements par rapport aux valeurs PRE pour chaque temps de mesure. Une ANOVA à deux voies et à mesures répétées (effet : temps × angle) a également été effectuée sur les changements relatifs à PRE (*i.e.*, PRE = 100 %) pour tous les paramètres afin de comparer les variations à chaque temps de mesure entre les angles articulaires. Les résultats avec une valeur $p < 0,05$ ont été considérés comme significatifs. Les procédures statistiques ont été effectuées à l'aide de GraphPad Prism (version 8.4.3, GraphPad Software, CA, Etats-Unis). Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type.

D. Résultats

1. Douleurs musculaires

Les douleurs musculaires ont été significativement augmentées entre PRE (2 ± 7 mm) et POST (33 ± 22 mm ; $p = 0,002$), 24 h (46 ± 22 mm ; $p < 0,001$), 48 h (52 ± 29 mm ; $p < 0,001$) et 72 h (36 ± 29 mm ; $p = 0,001$). Aucune différence significative n'a été observée entre PRE et 4 h (18 ± 19 mm ; $p = 0,38$) ou 168 h (7 ± 19 mm ; $p = 0,99$).

2. Propriétés neuromusculaires

Les valeurs PRE (absolues) mesurées à 40°, 90° et 120° sont présentées dans le **Tableau 8**. Un effet de l'angle a été trouvé pour tous les paramètres, à l'exception du NAV (**Tableau 8**).

Valeurs PRE absolues	40° (courte)	90° (neutre)	120° (grande)
Moment de FMV (N.m)	191,7 ± 49,9	311,9 ± 52,9***	220,2 ± 35,0$^{\$\$\$}$
NAV (%)	96,0 ± 4,3	96,2 ± 3,7	96,8 ± 2,1
Tw_p (N.m)	42,3 ± 11,9	67,4 ± 15,1***	65,1 ± 12,8***
Db10 (N.m)	65,6 ± 17,7	107,0 ± 22,6***	103,9 ± 19,4***
Db100 (N.m)	69,6 ± 17,7	102,2 ± 19,2***	97,2 ± 16,5***
Db10/Db100	0,94 ± 0,13	1,05 ± 0,13*	1,07 ± 0,07**
Potentialisation (Tw_p/Tw)	1,69 ± 0,34	1,61 ± 0,16**	1,31 ± 0,09$^{\$\$\$}$
RTD ($N.m.s^{-1}$)	620 ± 215	1122 ± 277***	840 ± 164**,$^{\$\$\$}$
μ du RF (kPa)	4,6 ± 0,7	9,2 ± 2,6***	21,2 ± 7,3***,$^{\$\$\$}$
μ du VL (kPa)	4,5 ± 0,8	8,5 ± 2,3***	13,4 ± 4,0***,$^{\$\$\$}$
Raideur apo. du RF ($N.m.mm^{-1}$)	5,0 ± 1,7	14,1 ± 5,8***	15,3 ± 6,9***
Raideur apo. Du VL ($N.m.mm^{-1}$)	7,3 ± 3,8	16,1 ± 6,3***	13,1 ± 3,9**

Tableau 8. Valeurs initiales (PRE) absolues des propriétés neuromusculaires à 40° (courte), 90° (neutre), et 120° (grande) de flexion de genou (0° = extension complète). *FMV : force maximale volontaire ; Tw_p : secousse musculaire potentialisée ; Db10 : doublet à 10 Hz ; Db100 : doublet à 100 Hz ; Db10/Db100 : rapport entre le doublet à 10 Hz et le doublet à 100 Hz ; RTD : taux de développement de force ; μ : module de cisaillement ; RF : rectus femoris ; VL : vastus lateralis ; apo. : aponévrotique. *, **, *** ; significativement différent de 40° à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement. $, $$, $$$: significativement différent de 90° à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement.*

a. Moment de force maximale volontaire

Une interaction significative (temps × angle) a été trouvée pour le moment de FMV absolu (p = 0,004). Le moment de FMV était significativement diminué jusqu'à 72 h après l'exercice, quel que soit l'angle articulaire testé (**Figure 50**). Cependant, aucun effet significatif de l'angle articulaire (p = 0,554) ou d'interaction (temps × angle ; p = 0,054) n'a été trouvé pour les valeurs relatives.

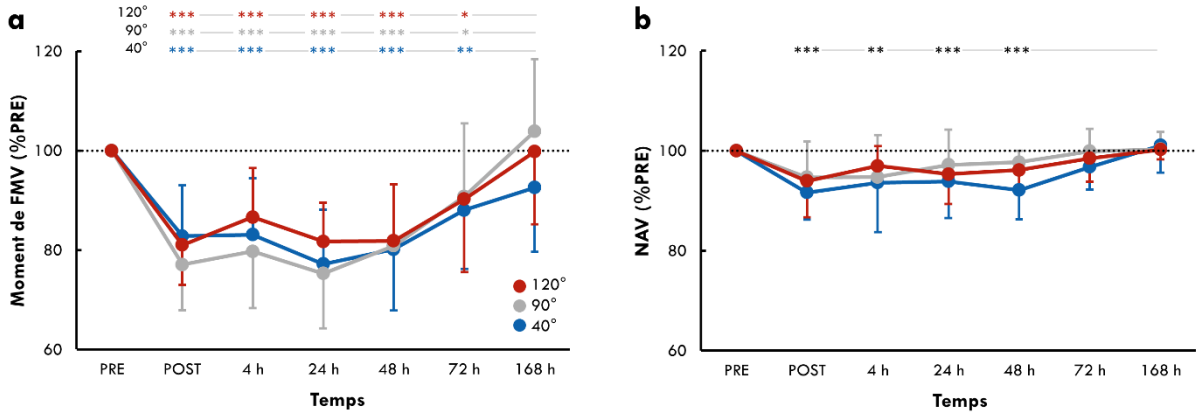


Figure 50. Cinétique (a) du moment de force maximal volontaire (FMV), et (b) du niveau d'activation volontaire (NAV) avant (PRE), immédiatement après (POST), et 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h après l'exercice à 40° (courte), 90° (neutre), 120° (grande) de flexion de genou (0° = extension complète). **, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement.*

b. Angle optimal

Aucun effet significatif du temps (p = 0,328) n'a été trouvé pour l'angle optimal (**Figure 51**).

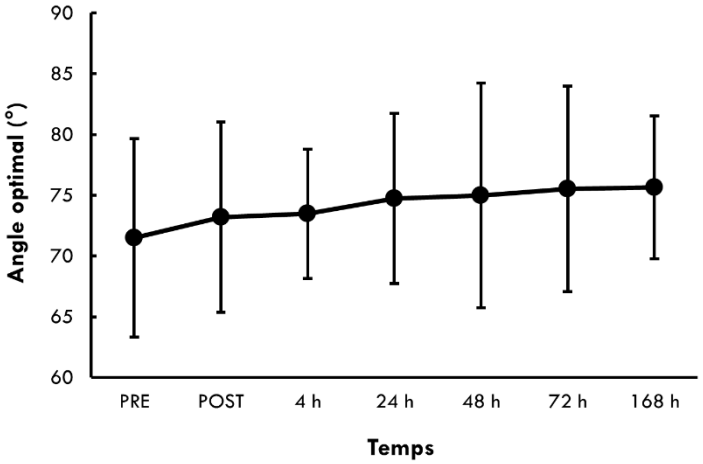


Figure 51. Cinétique de l'angle optimal de production de force maximale volontaire avant (PRE), immédiatement après (POST), et 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h après l'exercice (0° = extension complète).

c. Niveau d'activation volontaire

Le NAV était, en moyenne, significativement diminué jusqu'à 48 h après l'exercice (**Figure 50**). Cependant, aucun effet significatif de l'angle articulaire ou de l'interaction (temps × angle) n'a été trouvé pour les valeurs absolues (angle : p = 0,124 ; interaction : p = 0,515) ou relatives (angle : p = 0,217 ; interaction : p = 0,560).

d. Secousse musculaire

Aucune interaction significative (temps × angle) n'a été trouvée pour les valeurs (potentialisées) absolues (p = 0,081) ou relatives (p = 0,621) de la secousse musculaire. Cependant, un effet du temps (p < 0,001) a été observé sur les valeurs relatives. La secousse musculaire était, en moyenne, significativement diminuée jusqu'à 48 h après l'exercice (**Figure 52a**). Un effet significatif de l'angle articulaire (p < 0,001) a également été trouvé pour les valeurs relatives. La secousse musculaire était, en moyenne, moins diminuée à 120° qu'à 90° et 40°, et moins diminuée à 90° qu'à 40° (**Figure 52a**).

e. Potentialisation (Tw_P/Tw)

Des interactions significatives (temps × angle) ont été trouvées pour les valeurs absolues (p = 0,004) et relatives (p = 0,006) de PAP. Les résultats ont montré que la PAP était diminuée jusqu'à 4 h après l'exercice à 40°, jusqu'à 72 h après à 90° (sauf à 24 h) et jusqu'à 24 h après à

120° (**Figure 52b**). De plus, la PAP était moins diminuée à 120° qu'à 40° à POST et 4 h après l'exercice (**Figure 52b**). La PAP était également moins diminuée à 90° qu'à 40° à POST (**Figure 52b**).

f. Doublet à 10 Hz

Des interactions significatives (temps × angle) ont été trouvées pour les valeurs absolues ($p = 0,003$) et relatives ($p = 0,003$) du Db10. Les résultats ont montré que le Db10 était diminué jusqu'à 168 h après l'exercice à 40°, jusqu'à 48 h après à 90° et jusqu'à 24 h après à 120° (**Figure 52c**). Le Db10 était moins diminué à 120° qu'à 90° de POST à 24 h après l'exercice. De même, le Db10 était moins diminué à 120° qu'à 40° et à 90° qu'à 40° à POST (**Figure 52c**).

g. Doublet à 100 Hz

Pour les valeurs absolues du Db100, aucune interaction significative (temps × angle ; $p = 0,192$) n'a été observée, mais un effet temps ($p < 0,001$) a cependant été trouvé. Le Db100 était, en moyenne, significativement diminué de POST à 48 h après l'exercice (**Figure 52d**). Pour le Db100 relatif, aucun effet significatif de l'angle articulaire ($p = 0,075$) ou de l'interaction (temps × angle ; $p = 0,74$) n'a été trouvé.

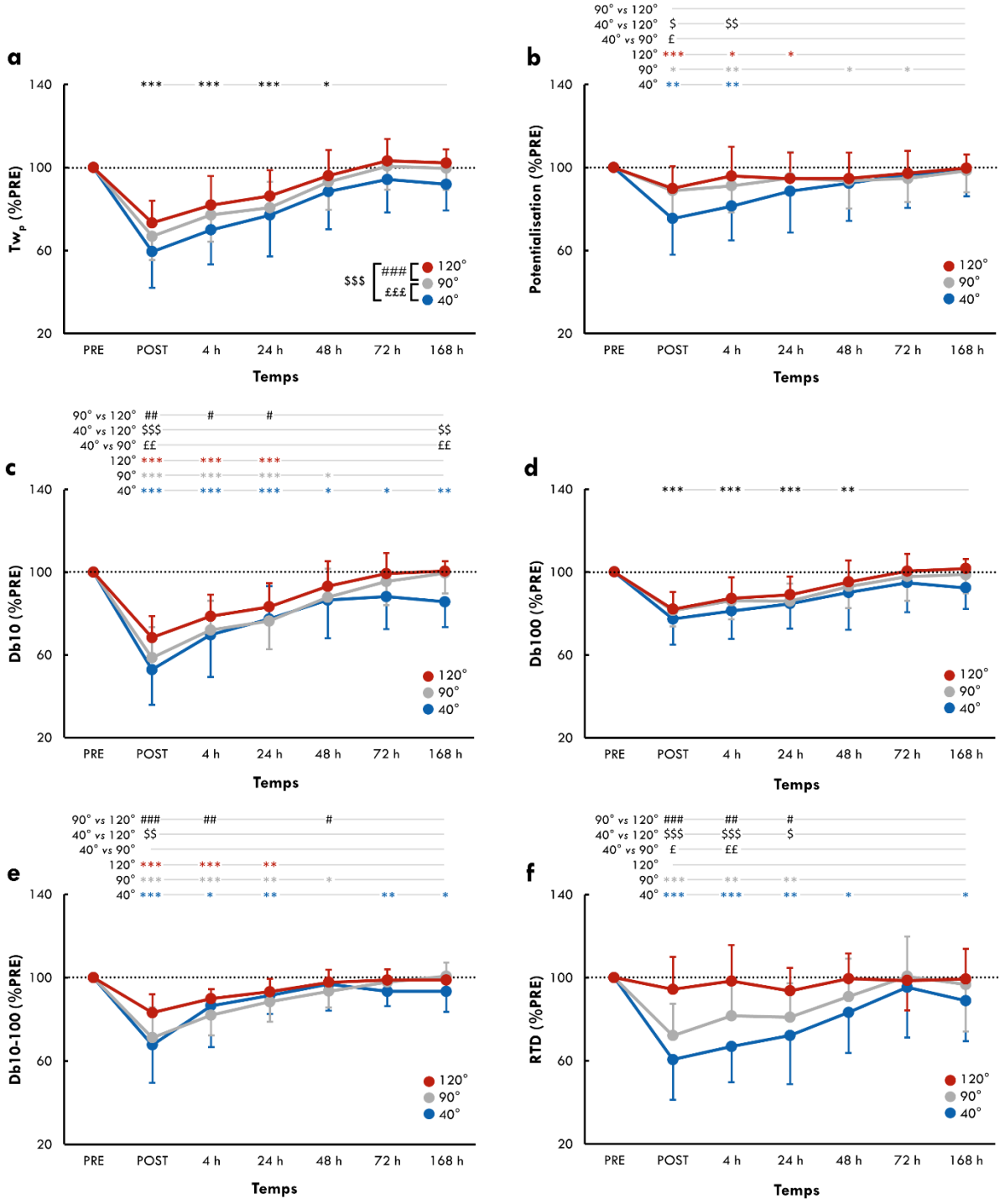
h. Fatigue basse fréquence (Db10/Db100)

Des interactions significatives (temps × angle) ont été trouvées pour les valeurs absolues ($p = 0,012$) et relatives ($p = 0,003$) du ratio Db10/Db100. Les résultats ont montré que le ratio Db10/Db100 était diminué jusqu'à 168 h après l'exercice à 40° (sauf à 48 h), jusqu'à 48 h après à 90° et jusqu'à 24 h après à 120° (**Figure 52e**). De plus, le ratio Db10/Db100 était moins diminué à 120° qu'à 40° à POST, et moins diminué à 120° qu'à 90° à POST, 4 h et 48 h après l'exercice (**Figure 52e**).

i. Taux de développement du moment de force

Des interactions significatives (temps × angle) ont été trouvées pour les valeurs absolues ($p = 0,011$) et relatives ($p = 0,006$) du RTD. Les résultats ont montré que le RTD était diminué jusqu'à 168 h après l'exercice à 40° (sauf à 72 h), jusqu'à 24 h après à 90°, et aucun changement significatif n'a été trouvé à 120° (**Figure 52f**). De plus, le RTD était moins affecté à 120° qu'à 40° et 90° de POST à 24 h après l'exercice. De même, le RTD était moins diminué à 90° qu'à 40° à POST et 4 h après l'exercice (**Figure 52f**).

Figure 52. Cinétique (a) de la secousse musculaire potentialisée (Tw_P), (b) de la potentialisation (Tw_P/Tw), (c) du doublet à 10 Hz (db10), (d) du doublet à 100 Hz (db100), (e) du rapport entre le doublet à 10 Hz et le doublet à 100 Hz (Db10/Db100), et (f) du taux de développement du moment de force (RTD) avant (PRE), immédiatement après (POST), et 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h après l'exercice (0° = extension complète). **, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. £, ££, £££ : différence significative entre 40° et 90° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. $, $$, $$$: différence significative entre 40° et 120° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement. #, ##, ### : différence significative entre 90° et 120° à $p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$, respectivement.*



3. Module de cisaillement musculaire

L'ANOVA à deux voies a montré une interaction (temps × angle ; $p < 0,001$) pour les valeurs absolues du µ du RF. Les résultats ont montré que le µ du RF était augmenté jusqu'à 168 h après l'exercice à 120°, jusqu'à 72 h après à 90° (sauf à 48 h), et seulement 4 h après l'exercice à 40° (**Figure 53a**). Le µ du RF était, en moyenne, davantage augmenté à 120° qu'à 40° et à 90° qu'à 40° (**Figure 53a**). Pour le µ du VL, l'ANOVA à deux voies n'a montré aucune interaction significative (temps × angle) pour les valeurs absolues ($p = 0,353$) et relatives ($p = 0,430$). Cependant, un effet du temps ($p = 0,045$) a été observé : le µ du VL était, en moyenne, significativement augmenté jusqu'à 48 h après l'exercice (**Figure 53b**). Un effet significatif de l'angle articulaire ($p = 0,004$) a également été trouvé pour les valeurs relatives : le µ du VL était, en moyenne, davantage augmenté à 120° qu'à 90 et 40° (**Figure 53b**).

4. Raideur de l'aponévrose

L'ANOVA à deux voies a montré une interaction (temps × angle ; $p = 0,039$) pour les valeurs absolues de la raideur de l'aponévrose du RF. Les résultats ont montré que la raideur de l'aponévrose du RF était diminuée jusqu'à 4 h après l'exercice à 90° et 120°, mais seulement à POST à 40° (**Figure 53c**). Aucun effet significatif de l'angle articulaire ($p = 0,342$) ou d'interaction (temps × angle ; $p = 0,200$) n'a été trouvé pour les valeurs relatives. Pour la raideur de l'aponévrose du VL, l'ANOVA à deux voies n'a révélé aucune interaction significative (temps × angle) pour les valeurs absolues ($p = 0,188$) et relatives ($p = 0,225$). Cependant, des effets du temps ($p < 0,001$) et de l'angle articulaire ($p < 0,001$) ont été observés. La raideur de l'aponévrose du VL était, en moyenne, significativement diminuée à POST, 4 h et 168 h après l'exercice (**Figure 53d**). La raideur de l'aponévrose du VL était, en moyenne, inférieure à 40° par rapport à 90° et 120°, et inférieure à 90° par rapport à 120° (**Figure 53d**).

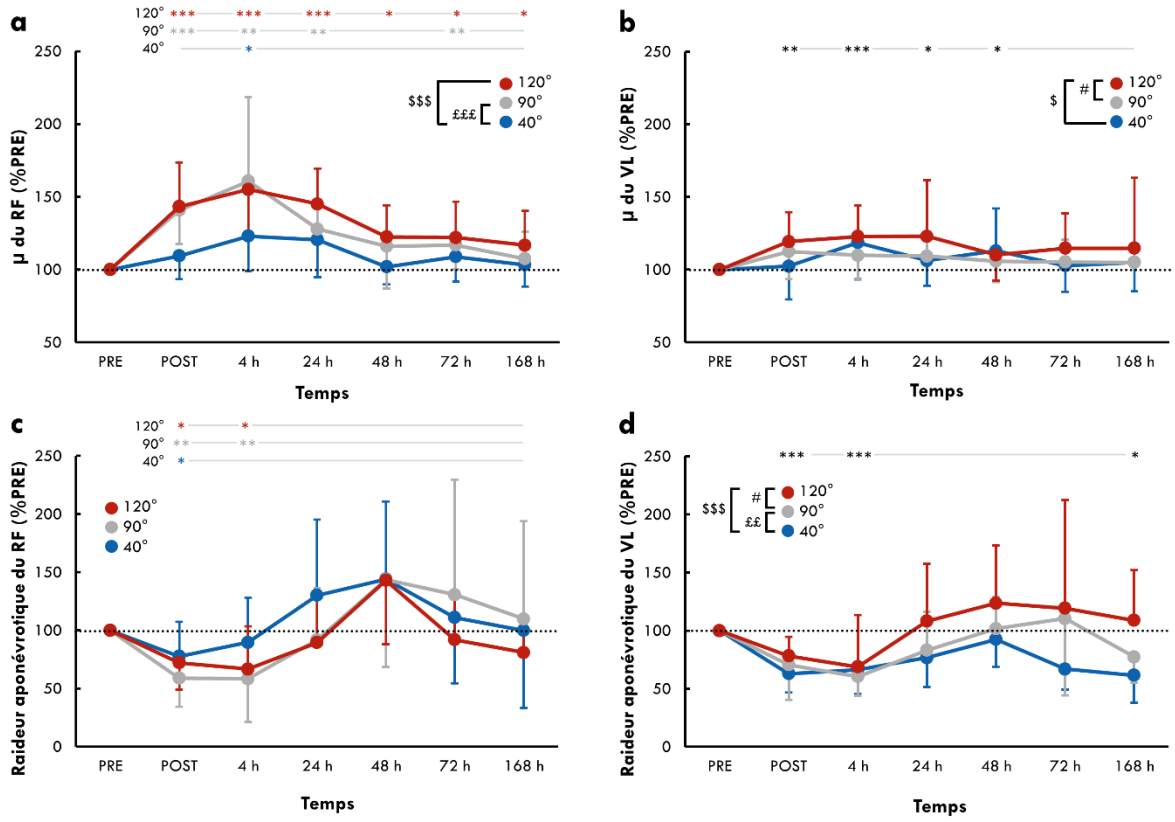


Figure 53. Cinétique du module de cisaillement (μ) du rectus femoris (VL) (a) et du vastus lateralis (VL) (b) et de la raideur aponévrotique du RF (c) et du VL (d) avant (PRE), immédiatement après (POST), et 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 168 h après l'exercice (0° = extension complète). **, ** et *** correspondent à des différences significatives entre la valeur initiale et le temps de mesure indiqué à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement. £, ££, £££ : différence significative entre 40° et 90° à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement. $, $$, $$$: différence significative entre 40° et 120° à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement. #, ##, ### : différence significative entre 90° et 120° à p < 0,05, p < 0,01, et p < 0,001, respectivement.*

E. Discussion

L'objectif de cette étude était (1) de déterminer si les réponses musculaires évoquées électriquement étaient différemment affectées au cours temps par l'angle articulaire après un exercice induisant des dommages musculaires, et (2) d'identifier les mécanismes sous-jacents associés. Conformément à notre hypothèse, nous avons observé que les réponses évoquées à basse fréquence (*i.e.*, secousse musculaire, Db10) étaient davantage préservées à grande qu'à courte longueur musculaire dans les 24 premières heures après l'exercice de marche en descente. À l'inverse, la réponse évoquée à haute fréquence (*i.e.*, Db100), le moment de FMV et le NAV n'étaient pas affectés différemment par l'angle articulaire après l'exercice. La dépendance à l'angle des réponses évoquées à basse fréquence ne s'explique pas par le décalage vers la droite de la relation force-longueur puisqu'aucun décalage d'angle optimal n'a été observé dans la présente étude. Par ailleurs, le RTD et la PAP étaient mieux préservés et la raideur musculaire augmentait davantage aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes, ce qui

suggère que des mécanismes liés à la transmission de la force et à la sensibilité au Ca^{2+}, situés au niveau de l'ensemble muscle-tendon, pourraient expliquer cette dépendance à la longueur.

1. Dépendance à la longueur du moment de FMV et des réponses évoquées à haute fréquence

Dans la présente étude, le moment de FMV n'était pas différemment affecté par l'angle articulaire après l'exercice de marche en descente. Ce résultat n'est pas en accord avec ceux de précédentes études (Byrne et coll., 2001; Philippou et coll., 2003; Saxton & Donnelly, 1996) qui ont montré une plus grande diminution du moment de FMV à courte qu'à grande longueur musculaire immédiatement après et dans les jours suivant un exercice induisant des dommages musculaires. Cette dépendance force-longueur a été attribuée à un déplacement de l'angle optimal vers une plus grande longueur (Proske & Morgan, 2001). Immédiatement après l'exercice, ce déplacement est considéré comme étant le résultat de la présence de sarcomères sur-étirés, tandis que le déplacement observé au-delà d'une semaine semble être le résultat de l'augmentation du nombre de sarcomères en série (Proske & Morgan, 2001). Contrairement aux études citées précédemment (Byrne et coll., 2001; Philippou et coll., 2003; Saxton & Donnelly, 1996) qui utilisaient des contractions musculaires mono-articulaires, nous n'avons pas trouvé de décalage de l'angle optimal. Cela pourrait expliquer l'absence de différences de diminution de FMV entre les angles articulaires dans la présente étude. L'absence de décalage dans l'angle optimal est cohérente avec d'autres études (Hoffman et coll., 2016; Pincheira et coll., 2018) dans lesquelles les participants ont effectué un exercice de marche en descente à reculons. Nous suggérons que ce type d'exercice n'induit pas de variation importante de la longueur musculaire, limitant ainsi la contrainte musculaire et les dommages musculaires associés. Cela pourrait expliquer le fait que l'angle optimal n'ait pas été modifié. En accord avec l'absence de différences entre les angles articulaires pour le moment de FMV, le NAV n'a pas été affecté par l'angle articulaire dans la présente étude. Enfin, le fait que le Db100 ne soit pas non plus affecté par l'angle articulaire confirme que la dépendance à la longueur n'affectait que les réponses évoquées à basse fréquence, qui sont particulièrement modulées par la sensibilité au Ca^{2+} et les propriétés mécaniques de l'ensemble muscle-tendon. Ces deux mécanismes peuvent expliquer la préservation relative des réponses évoquées à basse fréquence aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes.

2. Dépendance à la longueur des réponses évoquées à basse fréquence

    a. Effet de la sensibilité au Ca^{2+}

Lorsqu'un muscle est étiré, les filaments d'actine et de myosine se rapprochent. Cette proximité est connue pour augmenter la sensibilité au Ca^{2+} (MacIntosh, 2010). Par conséquent, toute augmentation de la longueur musculaire pourrait compenser la diminution de la sensibilité au Ca^{2+} induite par l'exercice excentrique (Allen et coll., 2008). Dans la présente étude, nous avons observé que les réponses évoquées à basse fréquence (*i.e.*, la secousse musculaire et le Db10) étaient mieux préservées aux grandes qu'aux courtes longueurs musculaires après l'exercice. Cette dépendance à la longueur n'a pas été observée pour la réponse à haute fréquence. Par conséquent, le ratio Db10/Db100 était plus préservé aux grandes qu'aux courtes longueurs musculaires. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Skurvydas et coll. (2010) qui ont trouvé qu'après un exercice excentrique des extenseurs du genou, le ratio entre les réponses à basses et hautes fréquences (20/100 Hz) diminuait moins à grande longueur musculaire par rapport à la plus courte. Comme les réponses à basse fréquence sont connues pour être plus sensibles aux modifications de libération et de sensibilité au Ca^{2+} (Edwards et coll., 1977) et à l'augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} à grande longueur (Roszek et coll., 1994) que les réponses à haute fréquence, cela pourrait expliquer que la fatigue à basse fréquence soit moins prononcée à grande longueur musculaire. L'évolution du RTD, connu pour être influencée par la sensibilité au Ca^{2+} (Maffiuletti et coll., 2016), est également cohérente avec cette hypothèse : la diminution plus faible de la sensibilité au Ca^{2+} aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes pourrait expliquer en partie pourquoi le RTD était davantage préservé aux grandes qu'aux courtes longueurs musculaires dans la présente étude. Enfin, la PAP était également moins affectée après l'exercice aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes, confirmant que l'augmentation de la longueur musculaire pourrait limiter les altérations de la sensibilité au Ca^{2+} survenant après un exercice à forte composante excentrique.

b. Effet des propriétés mécaniques de l'ensemble muscle-tendon

Nous avons observé que le module de cisaillement musculaire de repos (*i.e.*, la raideur musculaire) était plus augmenté aux grandes qu'aux courtes longueurs musculaires pour les muscles RF et VL après l'exercice de marche en descente. Ces différences pourraient être liées à (i) l'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ intracellulaire au repos qui pourrait entraîner une augmentation de la raideur musculaire en augmentant le nombre de ponts actine-myosine (Proske & Morgan, 2001), et (ii) la plus grande sensibilité au Ca^{2+} des myofilaments aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes (Roszek et coll., 1994). De plus, les présents résultats sont en accord avec ceux de Lacourpaille et coll. (2014; 2017) qui ont montré une augmentation

plus importante et plus durable du μ aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes. Cette augmentation de la raideur musculaire pourrait améliorer la transmission de la force et expliquer en partie que le RTD est mieux préservé à grande longueur musculaire (Maffiuletti et coll., 2016). Les résultats de la présente étude montrent également que la dépendance à la longueur du μ était particulièrement claire dans les 24 premières heures après l'exercice, comme nous avons pu le montrer pour les réponses à basse fréquence. Comme l'œdème est connu pour apparaître au-delà de 24 h (*i.e.*, 48-72 h) après l'exercice induisant des dommages musculaires (Clarkson & Hubal, 2002), nous suggérons que la dépendance à la longueur observée est due à des mécanismes liés au Ca^{2+} plutôt qu'à la contrainte exercée par l'œdème sur le périmysium et l'épimysium (Proske & Morgan, 2001; Whitehead et coll., 2001).

L'utilisation de l'imagerie ultrarapide a permis de caractériser les propriétés mécaniques de l'aponévrose lors d'une contraction évoquée (secousse musculaire). Cette approche originale a montré que la raideur de l'aponévrose était significativement diminuée au niveau des muscles RF et VL dans les premières heures après l'exercice, alors qu'aucune différence significative n'a été observée de 24 à 168 h après l'exercice. L'absence de différence significative de la raideur de l'aponévrose dans les jours suivant l'exercice semble écarter l'hypothèse selon laquelle la raideur des tissus tendineux augmente avec la tension induite par l'œdème sur le périmysium et de l'épimysium (Proske & Morgan, 2001; Whitehead et coll., 2001). De plus, la raideur de l'aponévrose semble faiblement influencée par l'angle articulaire, notamment dans les premières 24 h suivant l'exercice. Comme la dépendance à la longueur des réponses à basse fréquence survenait plutôt dans les 24 h suivant l'exercice, il semble peu probable que la raideur de l'aponévrose ait contribué à ces différences entre les grandes et courtes longueurs musculaires. De plus, comme suggéré par Maffiuletti et coll. (2016), compte tenu de l'importance de la masse musculaire par rapport aux tissus conjonctifs chez l'homme, on pourrait supposer que l'effet de la raideur musculaire aurait plus d'impact que la raideur des tissus tendineux sur le RTD. Par conséquent, cela pourrait expliquer pourquoi la raideur de l'aponévrose ne semble pas affecter la RTD.

3. Implications méthodologiques

Le fait que les altérations des réponses à basse fréquence (secousse musculaire, Db10, Db10/Db100, RTD) en réponse à l'exercice excentrique soient dépendantes de la longueur musculaire à laquelle l'évaluation est effectuée peut avoir d'importantes implications d'un point de vue méthodologique. L'évaluation des modifications de la fonction neuromusculaire par la

mesure des réponses mécaniques évoquées pourrait conduire à des résultats différents selon l'angle articulaire (*i.e.*, la longueur musculaire) considéré.

F. Conclusion

Les réponses évoquées à basse fréquence (*i.e.*, secousse musculaire, Db10, Db10/Db100, RTD) étaient davantage préservées aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes dans les 24 premières heures suivant l'exercice de marche en descente. À l'inverse, le moment de FMV, le NAV et la réponse évoquée à haute fréquence (*i.e.*, Db100) n'étaient pas affectés différemment par l'angle articulaire après l'exercice, en accord avec l'absence de décalage d'angle optimal. Comme la raideur de l'aponévrose était affectée de la même manière entre les angles articulaires au cours des premières 24 heures suivant l'exercice de marche en descente, la dépendance à la longueur des réponses évoquées à basse fréquence semble être associée à la sensibilité plus élevée au Ca^{2+} et à l'augmentation plus importante de la raideur musculaire aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes.

À retenir :

- Les réponses évoquées à basse fréquence étaient davantage préservées aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes dans les 24 premières heures suivant l'exercice de marche en descente.
- La dépendance à la longueur des réponses évoquées à basse fréquence semble être associée à la sensibilité plus élevée au Ca^{2+} et à l'augmentation plus importante de la raideur musculaire aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes.

Partie 4. Discussion générale

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'évaluer l'intérêt de « nouveaux » marqueurs (miARNs circulants et raideur musculaire mesurée par élastographie) pour prédire l'amplitude de la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire après des exercices induisant des dommages musculaires. Avant d'évaluer l'intérêt de « nouveaux » marqueurs, ce travail de thèse s'est attelé à caractériser de manière quantitative la réponse des marqueurs de dommages musculaires les plus couramment utilisés dans la littérature après des exercices intégrant une composante excentrique importante. Cet état des lieux avait pour objectif de mieux comprendre les divergences observées dans la littérature concernant ces marqueurs afin d'en tirer des recommandations sur leur utilisation et leur interprétation. Enfin, ce travail de thèse avait pour objectif méthodologique secondaire d'évaluer comment les paramètres de la fonction neuromusculaire pouvaient être affectés par l'angle articulaire auxquels ils sont évalués après un exercice induisant des dommages musculaires. Des différences entre les angles articulaires pourraient conduire à un diagnostic différent des altérations de la fonction neuromusculaire.

Les résultats de la revue systématique (**étude 1**) montrent une certaine divergence dans l'amplitude et la cinétique d'apparition/récupération des marqueurs de dommages musculaires après des exercices intégrant une composante excentrique importante. Si aucun des marqueurs couramment utilisés ne semble être en mesure de prédire la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire, certaines recommandations peuvent être données sur le(s) marqueur(s) à privilégier en fonction du moment où le diagnostic est effectué. Concernant les « nouveaux » marqueurs de dommages musculaires, à savoir les miARNs circulants et la raideur musculaire mesurée par élastographie, les résultats sont contrastés. Concernant les miARNs circulants, notre première étude (**étude 2**) montrait que ces marqueurs permettaient de mieux prédire la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire par rapport aux marqueurs classiques comme la CK ou la Mb. Cependant, cela ne semblait pas le cas lors de notre deuxième étude sur le sujet (**étude 3a**), même si la combinaison avec ces marqueurs classiques permettait d'améliorer le diagnostic. Lors de l'**étude 3b** portant sur la raideur musculaire mesurée par élastographie, les résultats montraient que cette raideur était moins augmentée et pendant une période moins importante après le deuxième exercice par rapport au premier. Cependant, une variabilité importante semble limiter l'utilisation de ce marqueur pour évaluer l'amplitude des dommages musculaires. La fatigue importante induite par les 45 min de marche pourrait être un facteur confondant, limitant la sensibilité/spécificité de ce marqueur. La raideur musculaire mesurée par élastographie pourrait cependant être un marqueur d'adaptation des propriétés

mécaniques du muscle. En effet, nos résultats ont montré une augmentation persistante (*i.e.*, d'au moins deux semaines) de la raideur musculaire. Cette augmentation persistante était corrélée à la protection fonctionnelle conférée par le RBE, suggérant que le muscle pourrait devenir plus résistant pour limiter les dommages musculaires lors d'un deuxième exercice excentrique.

Enfin, les résultats de l'**étude 3c** ont montré que les altérations des réponses évoquées à basse fréquence suite à l'exercice excentrique étaient moins affectées aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes. Cette modification de la dépendance à la longueur des réponses évoquées à basse fréquence en condition de dommages musculaires semble être associée à la sensibilité au Ca^{2+} plus élevée et à l'augmentation de la raideur musculaire plus importante aux grandes longueurs musculaires par rapport aux plus courtes. Une évaluation à grande longueur musculaire, où les filaments d'actine et de myosine sont proches et où la sensibilité au Ca^{2+} est accrue (MacIntosh, 2010), pourrait compenser la diminution de la sensibilité au Ca^{2+} induite par l'exercice excentrique (Allen et coll., 2008). D'un point de vue méthodologique, une évaluation à courte longueur devrait donc être effectuée si l'on veut investiguer les altérations d'homéostasie du calcium, alors qu'une évaluation à grande longueur devrait plutôt être effectuée si des altérations des mécanismes de transmission altérant la production de force sont recherchées.

I. Réponses des marqueurs à l'exercice excentrique

A. Marqueurs couramment utilisés

Si de nombreux marqueurs de dommages musculaires sont utilisés depuis de nombreuses années, leur utilité pour quantifier les dommages musculaires fait toujours l'objet de débats. Le travail de revue systématique avec méta-analyses (**étude 1**) a permis de caractériser les cinétiques d'apparition et de récupération des marqueurs indirects de dommages musculaires les plus fréquemment rapportés dans la littérature et de les associer avec la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire. Les résultats montrent qu'il existe une variabilité importante dans les cinétiques de ces marqueurs, et que leur association à l'altération de la fonction neuromusculaire varie en fonction du moment où ils sont mesurés.

Les résultats de l'**étude 1** ont montré que les pics de CK et Mb apparaissaient généralement 24 h et au cours des 6 heures suivant l'exercice, respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'**étude 3** où nous observons des pics de CK à 24 h et de Mb 2 h après l'exercice. Dans l'**étude 2**, le pic de CK a été mesuré immédiatement à l'arrêt la course

d'ultra-marathon. Cette observation est intéressante car les résultats de l'**étude 1** suggèrent que les exercices dans lesquels les pertes de FMV sont les plus importantes s'accompagnent généralement d'un décalage dans le temps (de 24 h à 72 h) du pic de détection de la CK. Ces divergences pourraient être expliquées par la durée particulièrement importante (*i.e.*, 24 h) de l'exercice dans l'**étude 2**. On peut formuler l'hypothèse d'une accumulation de la CK et de la Mb au cours de l'ultra-marathon, conduisant à des niveaux plus élevés que des exercices de courte durée (< 1 h) où les augmentations sont observées dans les premières heures suivant l'exercice (**étude 3** ; (Lippi et coll., 2018)). Malgré des processus de clairance différents entre la CK et la Mb (Muslimovic et coll., 2020), la durée extrême de la course d'ultra-marathon semble avoir induit une libération de ces protéines à un taux supérieur à celui de la clairance, conduisant à une accumulation dans la circulation sanguine. Cette accumulation de protéines circulante au cours des 24 h de course **(étude 2)** pourrait donc expliquer pourquoi (1) le pic d'apparition est plus précoce et (2) le niveau circulant est largement supérieur dans l'**étude 2** par rapport à l'**étude 3**. Les observations récentes de Temesi et coll. (2021) semblent cohérentes avec les nôtres. Ils ont en effet montré que l'activité de la CK était considérablement supérieure après des trails longs (~128 km ; ~26 h ; ~7000 U/L) par rapport à des trails courts (~ 49 km ; ~8 h ; ~1000 U/L). Il est intéressant de noter que Martin et coll. (2010) ont montré qu'au cours d'une course à pied de 24 h, l'activité de la CK semble augmenter plus rapidement au cours des 12 dernières heures qu'au cours des 12 premières. Les mécanismes sous-jacents à ces observations ne sont pas bien connus. Il est possible que l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} due à l'altération du sarcolemme induise une augmentation de la protéolyse, détériorant d'autant plus les éléments structurels et membranaires de la fibre musculaire quelques heures après le début de l'exercice (Paulsen et coll., 2012). Cela pourrait expliquer pourquoi l'activité de la CK augmente de manière plus importante en réponse à des exercices de longues durées (*e.g.*, > 12 h). La durée d'exercice devrait donc être prise en compte lors de l'interprétation des résultats. En effet, pour un niveau similaire d'activité de CK après deux exercices de durées différentes, l'interprétation qui peut être faite de ces mesures au regard du diagnostic des lésions musculaires peut être biaisée. Même si tous les marqueurs sanguins ne partagent pas les mêmes propriétés physico-chimiques ou les mêmes mécanismes de libération/clairance, il ne peut être exclu que l'hypothèse de la durée d'accumulation sur les niveaux détectables puisse s'appliquer à d'autres marqueurs libérés de façon passive du myocyte vers la circulation comme la Mb par exemple.

Lorsque la concentration de Mb est mesurée de façon précoce (< 6 h) après un exercice excentrique, elle pourrait prédire partiellement la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire (**étude 1**). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'**étude 3a** qui montrent que la concentration de la Mb est corrélée de façon précoce (*i.e.*, à partir de 2 h après l'exercice) à la réduction prolongée de la FMV. Ils sont cependant en désaccord avec ceux observés dans l'**étude 2**, où la concentration de la Mb mesurée immédiatement après la fin de la course d'ultra-marathon n'était pas corrélée à la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire. Ces divergences pourraient s'expliquer par les différences de protocoles d'exercice et de caractéristiques des participants. Comme évoqué précédemment, la durée extrême d'un ultra-marathon de 24 h (**étude 2**) pourrait conduire à une accumulation de Mb dans la circulation et ainsi modifier la relation avec la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire. Les résultats de l'**étude 1** montrent que la concentration de la Mb ne permet de prédire la perte prolongée de FMV que dans les premières heures (< 6 h) après l'exercice, probablement en raison d'une clairance rapide (Lippi et coll., 2018). Malgré la concentration importante de Mb observée immédiatement après l'ultra-marathon, il se pourrait qu'une partie importante de la Mb libérée dans la circulation ait été éliminée au cours de la course de 24 h, en raison de cette rapidité de clairance. Cette élimination rapide pourrait affecter la relation entre la Mb et la perte prolongée de FMV après un exercice de longue durée. Si la Mb peut être associée à la perte prolongée de FMV de façon précoce (< 6 h ; **étude 1**), il est important de souligner que l'activité de la CK n'est pas associée à la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire (**étude 1**). L'activité de la CK ne devient associée avec cette réduction qu'à partir de 72 h après l'exercice et dans de faibles proportions ($r^2 = 0,22$), ce qui limite son intérêt dans le diagnostic précoce des dommages musculaires. Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'**étude 2** où nous n'avons observé aucune corrélation entre la CK mesurée dans les 48 h suivant l'exercice et la perte prolongée de la fonction neuromusculaire. Ces résultats sont aussi en accord avec ceux de Damas et coll. (2016), où une forte variabilité interindividuelle de l'activité de la CK a été rapportée en réponse à un exercice excentrique. Cette variabilité de la CK semble d'ailleurs conduire, au moins en partie, à la difficulté d'établir des consensus sur les seuils d'hyperCKémie (1 000 à 10 000 U/L) (Stahl et coll., 2020). De nombreux facteurs comme le sexe, l'âge ou encore l'origine ethnique (Neal et coll., 2009) sont suspectés de participer à la variabilité interindividuelle. Par exemple, les hommes présentent une activité de la CK plus importante par rapport aux femmes au repos (Neal et coll., 2009) et en réponse à un exercice excentrique (Fernandez-Gonzalo et coll., 2014; Heavens et coll., 2014; Wolf et coll., 2012).

Ces différences pourraient notamment être dues à la masse musculaire proportionnellement plus importante chez les hommes que chez les femmes (Neal et coll., 2009). Neal et coll. (2009) ont également montré que l'origine ethnique pouvait influencer les niveaux de repos de la CK, notamment avec des valeurs supérieures observées pour les afro-américains en comparaison des caucasiens, hispaniques et asiatiques. L'âge pourrait également impacter légèrement les niveaux de CK après soixante ans, mais il n'existe pas de consensus (Brewster et coll., 2007; Tietz et coll., 1992). Par conséquent, les niveaux de CK devraient être interprétés en tenant compte de ses facteurs. Concernant la Mb, Anesi et coll. (2000) ont montré une concentration plus importante chez l'homme que chez la femme, mais aussi chez les sujets sains âgés (74-97 ans) en comparaison de sujets jeunes (25-31 ans). Les auteurs font l'hypothèse que ces différences s'expliquent par une moindre masse musculaire chez la femme par rapport à l'homme et par une diminution de la fonction rénale avec l'âge. Par ailleurs, Heavens et coll. (2014) ont montré que la concentration de la Mb n'était pas différemment affectée entre les hommes et les femmes en réponse à des exercices de musculation alors que l'activité de la CK était largement plus augmentée chez les hommes que chez les femmes. La concentration de la Mb souffre également d'une variabilité interindividuelle mais probablement dans une moindre mesure que la CK, expliquant pourquoi les résultats de l'**étude 1** montrent que la Mb permet de mieux prédire la perte prolongée de FMV que la CK.

Les résultats de la revue systématique (**étude 1**) ont montré que le NAV était diminué jusqu'à 48 h après les exercices excentriques. Le NAV mesuré 6 h et 72 h après l'exercice était également associé à la perte prolongée de la FMV, suggérant que les dommages musculaires sont associés à un déficit d'activation important après les exercices excentriques. Cela est cohérent avec les résultats de l'**étude 3b** qui montrent que le NAV était diminué jusqu'à 72 h après le premier exercice de marche en descente mais pas après celui effectué deux semaines plus tard. Les fibres afférentes III-IV, sensibles à la douleur et aux médiateurs de l'inflammation, pourraient induire des modulations au niveau spinal et/ou supra-spinal et diminuer le NAV après des exercices excentriques (Behrens et coll., 2012). Le NAV peut aussi être largement affecté après des exercices fatigants dès l'arrêt de l'exercice (Gandevia, 2001), limitant l'utilisation de ce marqueur pour prédire l'amplitude de la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire. A noter que le RTD, dont il a été montré que sa mesure sur l'intervalle 100-200 ms pouvait être utilisée comme un marqueur précoce de dommages musculaires (Penailillo et coll., 2015a), n'était pas associé à la perte prolongée de la FMV (**étude 1**). Cela s'explique probablement par la variété de méthodes utilisées pour évaluer le

RTD (intervalles de temps : 0-50 ms, 100-200 ms, etc.) dans les études incluses dans la méta-analyse. En effet, il semblerait que la phase précoce du RTD (*e.g.*, 0-100 ms) représente plutôt des mécanismes nerveux alors que la phase plus tardive (*e.g.* 100-200 ms) représente plutôt les mécanismes contractiles (Jenkins et coll., 2014; Penailillo et coll., 2015a). Par ailleurs, il semblerait que l'amplitude de mouvement pourrait être une alternative simple et peu coûteuse à la mesure de la FMV lorsque la mesure est réalisée 48 h après l'exercice (**étude 1**). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'**étude 3b** qui montrent que l'amplitude de mouvement est différemment affectée entre l'exercice 1 et l'exercice 2 uniquement lorsque la mesure est effectuée 48 h après l'exercice. Enfin, les résultats de **l'étude 1** confirment que l'évaluation de la hauteur de saut pourrait être utilisée comme une alternative à l'évaluation de la FMV.

Certains marqueurs de dommages musculaires couramment utilisés peuvent donc prédire partiellement la perte prolongée de la FMV lorsqu'ils sont évalués de manière individuelle. Cependant, ces marqueurs peuvent être plus ou moins performants selon le moment où ils sont évalués et peuvent être affectés par de nombreux facteurs comme le type d'exercice et les caractéristiques des individus. Si nos résultats ont permis d'évaluer de manière quantitative l'intérêt des marqueurs de dommages musculaires couramment utilisés, ils ont également permis de confirmer le besoin de « nouveaux » marqueurs pour améliorer le diagnostic. Ces résultats sont donc cohérents avec notre volonté initiale d'évaluer de « nouveaux » marqueurs de dommages musculaires.

B. MicroARNs circulants

Dans ce travail de thèse, les miARNs circulants ont été évalués en réponse à deux modèles d'exercice : un modèle d'ultra-endurance (24 h de course à pied ; **étude 2**) et un modèle de marche en descente avec port de charge (**étude 3a**). Si tous les miARNs d'intérêts étaient augmentés dans des proportions importantes en réponse aux 24 h de course à pied (18–124 723 fois la valeur de base), ce n'était pas le cas en réponse à l'exercice de marche en descente. En effet, seulement quatre des huit miARNs mesurés (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b et hsa-miR-206) ont augmenté après l'exercice de marche en descente. Les autres miARNs (hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378-3p, hsa-miR-499a-5p) étaient indétectables ou n'ont pas augmenté. Des différences entre les niveaux circulants des myomiRs suite à un exercice excentrique ont déjà été rapportées (Banzet et coll., 2013; Mooren et coll., 2014) et pourraient impliquer plusieurs facteurs. La différence de niveaux circulants au repos entre les miARNs mesurés dans ce travail de thèse et dans des travaux précédents (Aoi et coll.,

2013; Banzet et coll., 2013; Siracusa et coll., 2016) pourrait constituer une partie de l'explication. Nous avons montré que les niveaux circulants de certains myomiRs (hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p et hsa-miR-499a-5p) étaient trop faibles pour être détectés aux niveaux de base (**étude 2 et 3a**), et qu'un exercice de marche en descente ne semble pas suffisant pour induire une augmentation détectable de leurs niveaux circulant. Un certain niveau de dommage musculaire semble donc nécessaire pour induire une augmentation de ces miARNs. Si ce seuil reste à déterminer, ces miARNs semblent néanmoins augmenter après une course de marathon (Baggish et coll., 2014; Mooren et coll., 2014), un exercice qui devrait induire des niveaux de dommages musculaires intermédiaires à nos deux modèles. La différence de spécificité tissulaire des miARNs mesurés (*e.g.* muscle squelettique *vs*. cœur) pourrait également expliquer certaines de ces différences. C'est le cas en particulier pour hsa-miR-208a-3p, spécifique au muscle cardiaque, pour lequel nous n'avons pas observé d'augmentation significative après les exercices de marche en descente, où un faible niveau de stress cardiaque est attendu. Après la course de 24 h de course à pied, hsa-miR-208a-3p était augmenté de façon importante mais n'était pas corrélé avec les niveaux de hs-cTnT. Cette absence de corrélation entre miR-208a, la troponine et les paramètres de la fonction cardiaque avait également été observée en réponse à l'infarctus aigu du myocarde et de maladies coronariennes (Nabiałek et coll., 2013). Ces résultats sont néanmoins à tempérer car d'autres ont été en mesure d'identifier une corrélation significative entre miR-208a et la cTnT après une lésion cardiaque chez le rat (Glineur et coll., 2016). Si sa relation avec le stress cardiaque n'est pas établie, miR-208a pourrait toutefois être pertinent pour indiquer si les myomiRs exprimés à la fois dans le muscle cardiaque et strié squelettique (*e.g.*, miR-133a, mir-208b, miR-499) sont susceptibles d'être impactés par une libération issue du muscle cardiaque (*i.e.*, un témoin négatif). En effet, Siracusa et coll. (2016) n'ont observé aucune augmentation de miR-208a après une lésion toxique d'un muscle strié squelettique chez le rat, alors que les autres myomiRs étaient largement augmentés.

Dans la première étude portant sur les miARNs (**étude 2**), les résultats montraient des corrélations significatives ou qui tendaient à l'être entre le niveau de la plupart des miARNs circulants mesurés immédiatement après l'ultra-marathon et la fonction neuromusculaire mesurée 24 h plus tard. Cependant, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre la perte de fonction neuromusculaire à 24 h et les niveaux de CK ou de Mb, ce qui suggère que les myomiRs pourraient être plus pertinents que la CK ou la Mb pour représenter l'amplitude des dommages musculaires dans ce modèle. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'autres études

(Banzet et coll., 2013; Siracusa et coll., 2016) montrant que les myomiRs permettaient de mieux discriminer les conditions lésionnelles et non-lésionnelles que la CK. Cependant, les résultats issus de l'**étude 2** n'étaient pas en accord avec ceux de l'**étude 3a**. En effet, seulement trois (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-206) des huit miARNs d'intérêt mesurés 6 h après l'exercice étaient corrélés avec la réduction prolongée du moment de FMV, alors que la Mb mesurée 2 h et 6 h après l'exercice était corrélée avec cette même réduction. La CK mesurée à 6 h était également corrélée avec la réduction prolongée du moment de FMV. Par conséquent, l'hypothèse selon laquelle les niveaux des myomiRs seraient mieux corrélés à la réduction prolongée du moment de FMV que l'activité de la CK et la concentration de la Mb n'était pas vérifiée dans l'**étude 3a**. Cependant, la détection des myomiRs les moins abondants (hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-499a-5p) en plus des autres myomiRs pourrait être un indicateur indirect du niveau de dommage musculaire. En effet, même si le seuil du niveau de dommage musculaire reste à déterminer, la détection de ces miARNs ne semble possible que dans les situations les plus lésionnelles. La proportionnalité des miARNs circulants à la perte prolongée de la fonction neuromusculaire reste néanmoins à confirmer. Afin d'évaluer de manière plus robuste cette proportionnalité, les miARNs circulants pourraient être évalués en réponse à des exercices excentriques induisant différents niveaux de perte de FMV, avec un nombre beaucoup plus important de participants. L'utilisation d'un modèle relativement simple à mettre en place semble donc adaptée pour évaluer un grand nombre de participants. Les niveaux des miARNs circulant pourraient être évalués en réponse à un modèle d'exercice utilisant des séries de *drop jump* avec une cinétique restreinte (*e.g.*, immédiatement après, 2 h et 6h après l'exercice). Le contrôle du nombre de répétitions/séries dans les groupes expérimentaux permettrait d'induire différents niveaux de perte de FMV. Par ailleurs, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la libération et la clairance des miARNs circulants pourrait permettre d'en affiner l'utilisation en tant que marqueurs. Dans une revue de la littérature, Coenen-Stass et coll. (2017) ont discuté de l'utilité clinique des miARNs extracellulaires en tant que marqueurs de la DMD, ainsi que de leur possible contribution à la physiologie musculaire. Ces auteurs ont proposé que la libération des miARNs en réponse à des dommages musculaires puisse résulter de la combinaison d'une libération passive à la suite d'une nécrose des myocytes et de l'altération du sarcolemme, mais aussi d'un processus de sécrétion actif qui pourrait accompagner la différenciation et la régénération musculaire. Malgré un contexte physiopathologique différent, nous pensons que les dommages musculaires induits dans nos modèles expérimentaux peuvent partager certains de ces mécanismes de libération. Afin d'évaluer la pertinence de cette

hypothèse, les mécanismes de libération (passifs ou actifs) pourraient être étudiés en comparant les profils des myomiRs dans les fractions vésiculaires et non-vésiculaires du plasma au cours et à la suite d'exercices excentriques. En effet, les miARNs peuvent être libérés vers l'espace extracellulaire en étant encapsulés dans des VEs dont la taille peut varier de ~50 à ~1000 nanomètres (Mathieu et coll., 2019). Les miARNs vésiculaires peuvent être captés par des cellules réceptrices localement (communication autocrine et paracrine) ou à distance (communication endocrine), afin d'y induire des modifications phénotypiques (Mathieu et coll., 2019). Par exemple, Guescini et coll. (2015) ont montré que les vésicules extracellulaires issues du muscle squelettique pouvaient être enrichies en myomiRs, ceux-ci ayant des rôles connus dans le maintien de l'homéostasie musculaire (Diniz & Wang, 2016). Nous pouvons formuler l'hypothèse que les niveaux des miARNs contenus dans les VEs pourraient être différents des niveaux non-vésiculaires en réponse à l'exercice excentrique. Une différence dans les profils des miARNs entre les fractions vésiculaires et non-vésiculaires après l'exercice pourrait suggérer que ces miARNs aient un rôle biologique (*e.g.*, régénération) en réponse à l'exercice excentrique.

C. Raideur musculaire mesurée par élastographie

Nos résultats ont montré que les μ de repos des muscles VL et RF étaient significativement augmentés de manière aiguë (jusqu'à 24 h) après l'exercice de marche en descente (**étude 3b**). L'une des principales hypothèses expliquant l'augmentation du μ musculaire de repos après un exercice excentrique est la perturbation de l'homéostasie calcique, *i.e.*, l'augmentation de la concentration intramusculaire de calcium (Lacourpaille et coll., 2014; Lacourpaille et coll., 2017) induite par l'altération des protéines musculaires structurelles (Paulsen et coll., 2012). En effet, l'augmentation de la concentration de calcium intramusculaire pourrait induire une augmentation du nombre de ponts actine-myosine formés au repos. Par ailleurs, si l'augmentation du μ était moindre et sur une période plus courte après le deuxième exercice par rapport au premier, nous n'avons observé aucune corrélation entre le μ et la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de précédents travaux (Heales et coll., 2018; Lacourpaille et coll., 2017) qui ont montré que l'augmentation précoce (< 1 h) du μ des muscles du quadriceps pouvait prédire en partie l'amplitude de la perte prolongée de FMV après des exercices purement excentriques (*i.e.*, exercices sur dynamomètre isocinétique). Ces divergences pourraient s'expliquer par le modèle d'exercice utilisé dans nos travaux (*i.e.*, marche en descente), pouvant induire une fatigue

métabolique importante. En effet, plusieurs mécanismes pourraient affecter la raideur musculaire après un exercice de marche en descente. Comme il a été mentionné auparavant, la perturbation de l'homéostasie du calcium pourrait augmenter la raideur musculaire immédiatement après l'exercice (Proske & Morgan, 2001). Cependant, la raideur peut également augmenter en réponse à la fatigue métabolique (Akagi et coll., 2017; Akagi et coll., 2019). En effet, la diminution de la concentration en ATP dans le cytoplasme des fibres musculaires avec la fatigue métabolique pourrait conduire à un moindre détachement des ponts actine-myosine et ainsi augmenter la tension de repos (Gong et coll., 2003; Spudich, 2001). À l'inverse, plusieurs études, dont deux issues de notre laboratoire ont montré que la fatigue pouvait aussi induire une diminution de la raideur musculaire mesurée par élastographie (Chalchat et coll., 2020; Morel et coll., 2019; Siracusa et coll., 2019), probablement en raison de l'augmentation de la température intramusculaire après l'exercice (Marshall et coll., 2015). En effet, il a été montré que l'augmentation de la température intramusculaire était associée à une diminution de la raideur tissulaire (Sapin-de Brosses et coll., 2010). L'exercice excentrique pouvant produire une quantité importante de chaleur (Lindstedt et coll., 2001), la raideur musculaire pourrait également en être impactée dans les premières heures suivant l'exercice. Par conséquent, les différents mécanismes pouvant être impliqués dans les modifications du µ de repos immédiatement après l'exercice semblent avoir des effets antagonistes, dans des proportions qui restent à déterminer, ce qui pourrait expliquer les divergences de résultats entre les études sur la fatigue et les dommages musculaires (Andonian et coll., 2016; Chalchat et coll., 2020; Heales et coll., 2018; Lacourpaille et coll., 2014; Lacourpaille et coll., 2017; Morel et coll., 2019; Siracusa et coll., 2019). Les mécanismes impliqués dans les modifications de raideur après l'exercice excentrique restent donc à déterminer. L'effet de l'accumulation intracellulaire du Ca^{2+} sur la raideur pourrait être investigué en réalisant des biopsies musculaires avant et dans les heures/jours après un exercice excentrique. La concentration intracellulaire de Ca^{2+} peut être, par exemple, analysée à l'aide du marqueur fluorescent fura-2. Les modifications de ce marqueur pourraient ensuite être associées aux modifications de raideur musculaire mesurées par élastographie. Nous pouvons formuler l'hypothèse d'une relation positive entre ces variables, suggérant que l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} aurait un rôle dans l'augmentation de la raideur musculaire de repos. Cependant, une telle étude nécessite un nombre important de biopsies, invasives et pouvant induire des dommages musculaires supplémentaires. Chez l'animal, la concentration intracellulaire en Ca^{2+} peut être estimée *in vivo* en extériorisant le muscle *spinotrapezius* comme précédemment rapporté par

Takagi et coll. (2021). La concentration intracellulaire en Ca^{2+} pourrait donc être évaluée avant et après des contractions musculaires induites par électrostimulation et mise en relation avec la raideur musculaire mesurée par élastographie. Une autre approche permettant d'évaluer les effets du Ca^{2+} sur la raideur musculaire serait d'utiliser des substances favorisant ou inhibant la libération de Ca^{2+} (*e.g.*, caféine, gadolinium).

D. Approche combinée

Dans ce travail de thèse, nous avons montré qu'aucun marqueur actuel, mesuré seul, ne permet de prédire de façon fiable la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire, possiblement en raison d'une variabilité interindividuelle importante. Une des façons d'améliorer le diagnostic pourrait donc être de combiner les marqueurs, comme cela a pu être proposé pour le diagnostic de l'insuffisance rénale aiguë (Meisner et coll., 2016). Les résultats de l'**étude 3a** ont montré que la combinaison de plusieurs marqueurs circulants (CK, Mb, myomiRs) pouvait améliorer la capacité à prédire la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire. Comme la multiplication des mesures peut complexifier le diagnostic, le développement de techniques permettant de mesurer plusieurs molécules simultanément et de manière simple et rapide est souhaitable. Afin d'évaluer l'intérêt de cette approche, nous avons effectué une analyse de régression linéaire multiple intégrant les différents marqueurs évalués (variables indépendantes) dans l'**étude 3** afin d'identifier la meilleure combinaison de marqueurs permettant de prédire la réduction prolongée de la FMV (variable dépendante). Les variables indépendantes utilisées dans l'analyse étaient la valeur pic sur l'intervalle POST-6 h de tous les marqueurs présentés dans l'**étude 3a** et **3b.** Les résultats montrent que la meilleure combinaison intègre : le moment de FMV, la hauteur de saut (CMJ), l'activité de la CK, les niveaux de hsa-miR-206 et hsa-miR-208a-3p, la secousse musculaire, le doublet à 100 Hz, et le rapport entre le doublet à 10 Hz et le doublet à 100 Hz ($r^2 = 0,654$; $p < 0,001$). Ce modèle a été construit en intégrant les paramètres de la fonction neuromusculaire évalués à un angle de genou de 90°. Même si la plupart de la littérature évalue à un angle proche de 90°, le modèle pourrait être testé avec des évaluations à plus courtes longueurs musculaires, qui apparaissent comme étant plus sensibles aux altérations induites par l'exercice excentrique (**étude 3c**). Par ailleurs, la mesure d'un nombre aussi important de marqueurs est susceptible de complexifier grandement le diagnostic. Si la mesure du moment de FMV et de l'activité de la CK semble un peu moins performante pour prédire la perte prolongée de FMV ($r^2 = 0,591$; $p <0,001$), cette combinaison semble plus applicable. Il est surprenant de noter que les modèles combinant les

différents marqueurs n'intègrent pas les miARNs les plus corrélés à la perte prolongée de FMV. Ces résultats sont toutefois préliminaires et sont à prendre avec précaution car ils s'appliquent uniquement à notre modèle d'exercice : le modèle devrait être testé dans d'autres études. Afin de développer et valider une combinaison de marqueurs, il est généralement recommandé d'inclure deux groupes dans l'étude : le premier pour développer le modèle et le second afin d'évaluer la performance ce modèle (validation) (Moons et coll., 2015). Brièvement, un exercice excentrique devrait être effectué dans deux groupes expérimentaux. Un ensemble de marqueurs (*e.g.*, CK, Mb, myomiRs, moment de FMV ; variables indépendantes) devrait être évalué dans les heures suivant l'exercice, ainsi que la perte prolongée de moment de FMV (*e.g.*, 24 h) (variable dépendante). Une fois développé dans le premier groupe et validé dans le deuxième, le modèle devrait ensuite être testé sur des modèles d'exercices variés (études supplémentaires) pour une validation externe permettant d'utiliser le modèle plus largement.

II. « Nouveaux » marqueurs et « *repeated bout effect* »

A. MicroARNs circulants

Dans ce travail de thèse, les résultats montrent une augmentation des niveaux de plusieurs miARNs dans le plasma après l'exercice de marche en descente. Nous avons également montré que les niveaux de certains myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p) étaient moins augmentés après le deuxième exercice par rapport au premier exercice. Par ailleurs, les modifications de ces miARNs circulants n'étaient pas corrélées à la protection conférée par le RBE, suggérant que ces modifications ne sont pas impliquées dans le RBE. Cependant, il ne peut être exclu que les myomiRs circulants puissent être impliqués dans les adaptations du RBE car leur abondance dans la circulation sanguine dépend de facteurs complexes et interdépendants tels que les demi-vies variables selon les myomiRs (Coenen-Stass et coll., 2019) et les mécanismes de libération. Des études pionnières réalisées dans des modèles *in vitro* permettent toutefois d'apporter quelques éléments de compréhension aux rôles potentiels des miARNs dans les adaptations du RBE. Il a par exemple été montré que miR-133a, miR-133b, miR-206 et miR-378 étaient activement libérés dans les vésicules extracellulaires par des myotubes (Forterre et coll., 2014) ou de cellules précurseurs myogéniques issues de la division des cellules satellites (Fry et coll., 2017) et pourraient réguler la différenciation des myoblastes et le remodelage de la matrice extracellulaire. Ces mécanismes physiologiques étant impliqués dans les adaptations du RBE, un rôle des miARNs dans ces modifications est plausible (Hyldahl et coll., 2017). Afin d'investiguer le rôle des

myomiRs dans ces adaptations, il pourrait être pertinent de comparer leurs profils circulants vésiculaires en réponse à un modèle de RBE (*i.e.*, deux exercices excentriques répétés). Des profils différents entre les deux exercices pourraient témoigner d'une adaptation de la réponse à l'exercice excentrique. Une étude récente suggère par ailleurs que l'étude du microenvironnement des fibres musculaires pourrait permettre d'approfondir la compréhension de ces adaptations. Watanabe et coll. (2021) suggèrent en effet que la majorité des VEs libérées par le muscle s'accumulent majoritairement au niveau local, plutôt que dans la circulation sanguine. Les auteurs ont également suggéré que ces vésicules issues du muscle pouvaient être impliquées dans la myogénèse par la suppression de l'expression de de *Pax7*. Une accumulation locale, comme observée par Watanabe et coll. (2021) pourrait être impliquée dans la régénération et dans les adaptations induites par la réalisation d'un exercice excentrique. Pour vérifier cette hypothèse, des biopsies musculaires pourraient être effectuées dans un modèle de RBE (*i.e.*, deux exercices excentriques). Comme précédemment montré par Watanabe et coll. (2021), les tissus conjonctifs du muscle sont ensuite digérés avec de la collagénase et de la dispase II. Les VEs peuvent ensuite être isolés et leur contenu en miARNs quantifié. La comparaison des profils des miARNs entre les deux exercices pourrait permettre d'identifier ceux qui seraient potentiellement impliqués dans les adaptations conférées par le premier exercice. Le recours à des inhibiteurs de synthèse des miARNs, les antagomiRs, comme cela a été réalisé dans certains modèles animaux (van Solingen et coll., 2009), pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. Nous pourrions par exemple étudier la diminution ou non des adaptations du RBE après l'inhibition de miARNs précédemment identifiés comme pouvant avoir un rôle dans la régénération ou les adaptations conférée par le RBE.

B. Raideur musculaire mesurée par élastographie

Les résultats de ce travail de thèse ont montré que la raideur musculaire mesurée par élastographie a augmenté dans une moindre mesure et pendant une durée plus courte après le deuxième exercice de marche en descente par rapport au même exercice effectué deux semaines plus tôt, représentant les adaptations conférées par le RBE. Le premier exercice a conduit à une augmentation persistante (*i.e.*, au moins deux semaines) de la raideur musculaire, reflétant potentiellement une adaptation mécanique impliquée dans le RBE. Ce résultat est en accord avec Lacourpaille et coll. (2014) qui ont rapporté que le μ de repos était augmenté jusqu'à 21 jours après un exercice excentrique des fléchisseurs du coude. Nous avons égalemement montré que l'augmentation du μ de repos observée 14 jours après le premier exercice était corrélée

avec la protection fonctionnelle conférée par le RBE. Cela suggère que le muscle pourrait devenir plus raide pour conférer une protection contre les dommages musculaires pouvant survenir lors d'un exercice subséquent, comme proposé par Hyldahl et coll. (2017).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'adaptation mécanique est plus importante sur le muscle ayant subi le plus d'altérations de raideur musculaire après le premier exercice de marche en descente (*i.e.*, RF). Il se pourrait qu'un seuil minimal de stress mécanique soit nécessaire pour induire une augmentation de la raideur musculaire sur le long terme. En effet, Hyldahl et coll. (2017) ont rapporté que l'amplitude de l'effet protecteur est liée à l'intensité de l'exercice initial. L'activation musculaire et les comportements mécaniques musculaires devraient être étudiés à l'aide d'un modèle d'exercice permettant d'induire un RBE, afin de mieux comprendre les différences de modifications de raideur musculaire entre les muscles synergistes. Bien que nous ayons implémenté ce type de mesure dans notre protocole de marche en descente (**étude 3**), nous avons fait le choix de ne pas les présenter dans la partie « contribution personnelle » de ce manuscrit de thèse. Nous pouvons toutefois évoquer quelques résultats préliminaires. Nous avons montré que l'activation du muscle VL était similaire au cours des deux exercices (**Figure 54** ; **Figure 55**). À l'inverse, l'activation du muscle RF était plus importante au cours du premier exercice de marche en descente qu'au cours du second (**Figure 54** ; **Figure 55**). Ces différences d'activation au niveau du muscle RF pourraient être le reflet d'adaptations nerveuses (*e.g.*, meilleure synchronisation des unités motrices) ou liées à une meilleure efficience mécanique en raison d'adaptations de la raideur musculaire. Une augmentation de la raideur musculaire et/ou des tissus conjonctifs après le premier exercice pourrait améliorer l'efficience de la transmission de la force de l'ensemble muscle-tendon au cours du deuxième exercice. Afin de mieux comprendre l'origine de ces différences, il serait intéressant d'investiguer la relation entre les modifications de la raideur musculaire (*e.g.*, mesurée par élastographie), du comportement mécanique du muscle (*e.g.*, élongation des fascicules ; mesuré par échographie) et de l'activation musculaire (mesurée par EMG) au cours de l'exercice. Ces analyses restent donc à être effectuées à partir des données recueillies dans ce travail expérimental.

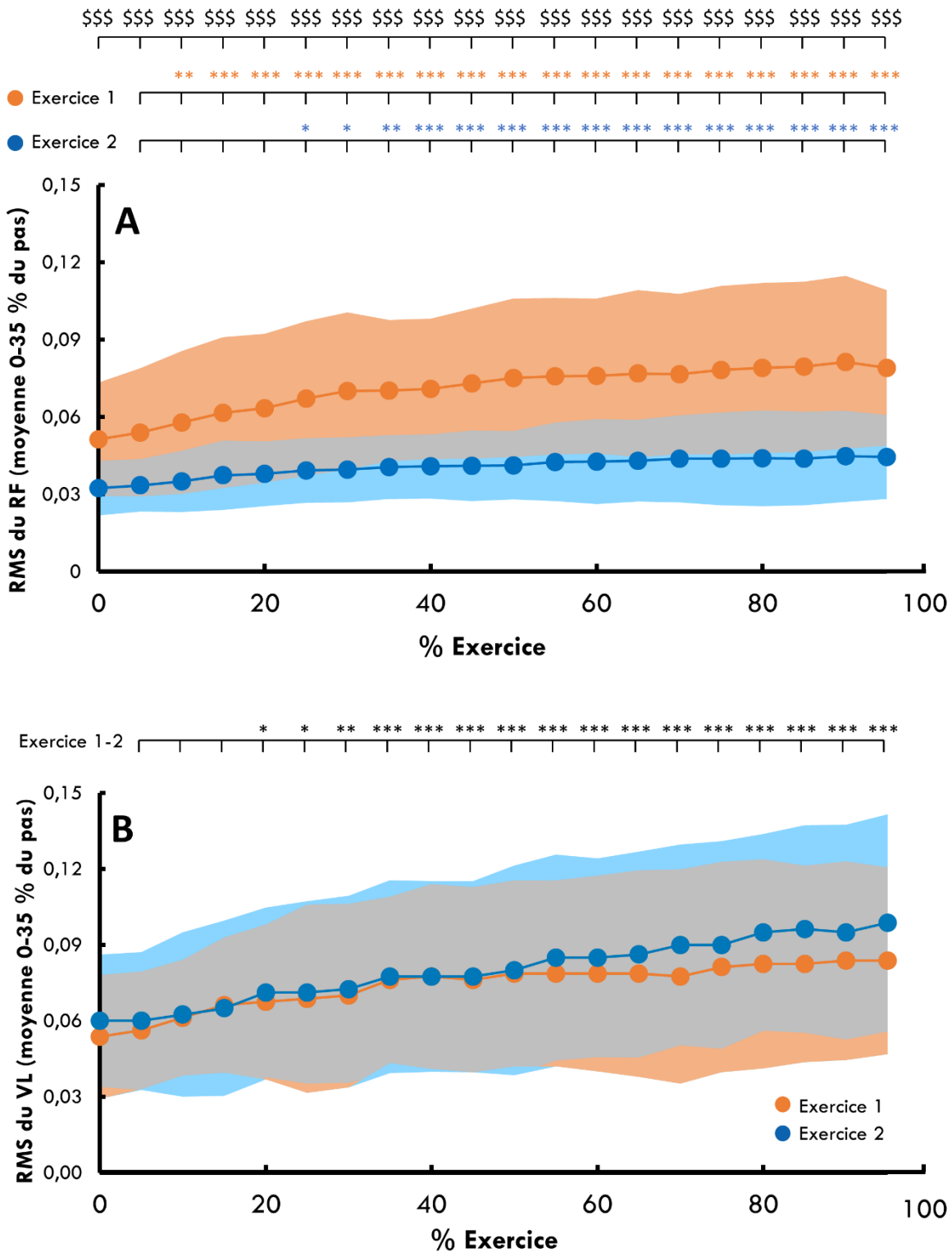


Figure 54. Activation des muscles (A) rectus fermoris (RF) et (B) vastus lateralis (VL) au cours des exercices 1 (orange) et 2 (bleu). *Les valeurs sont exprimées par la valeur RMS (root mean square) calculée sur le début de la phase d'appui (0-35 % du pas total), en fonction du temps d'exercice (100% = arrêt de l'exercice). Les zones de couleur représentent les écart-types et la zone grise correspond au croisement des deux zones de couleur. *, **, et *** : différent de PRE à p < 0,05, p < 0.01, et p < 0,001, respectivement ; $$$: différent entre l'exercice 1 et l'exercice 2 à p < 0,001.*

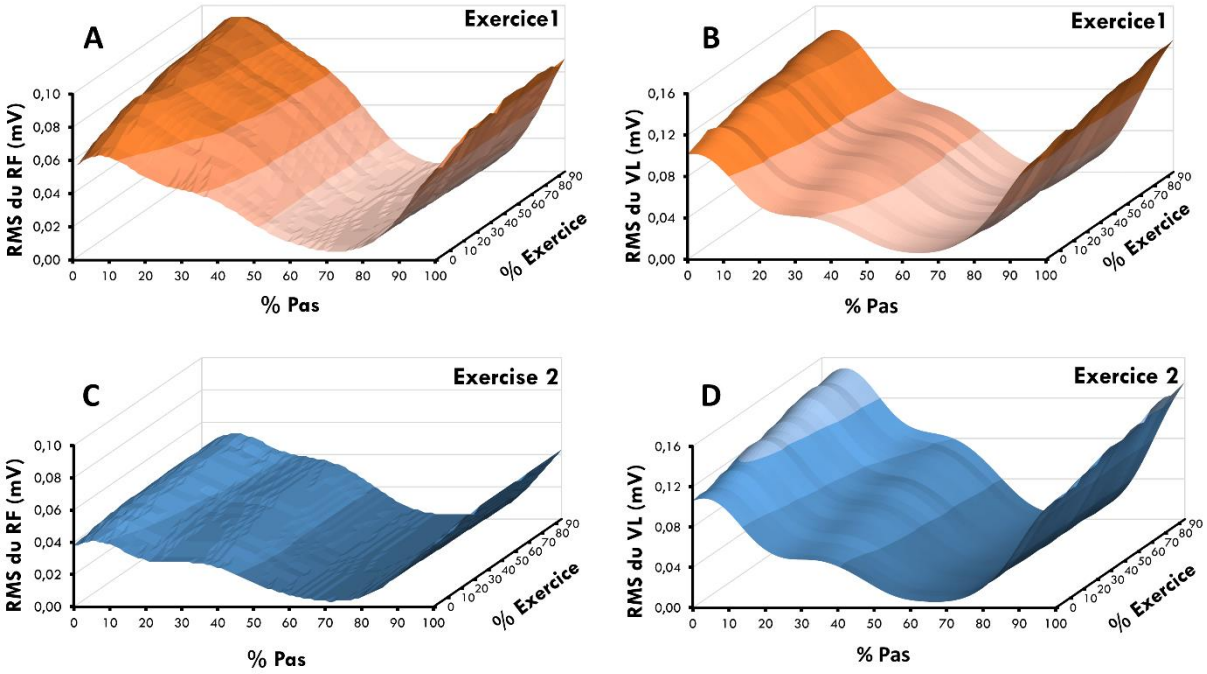


Figure 55. Représentation de l'activation des muscles rectus femoris (RF) et vastus lateralis (VL) au cours d'un pas (0% = début de la phase d'appuis) en fonction du temps (100% = arrêt de l'exercice). *L'activation est représentée pour l'exercice 1 (A : RF ; B : VL) et l'exercice 2 (C : RF ; D : VL).*

Partie 5. Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, l'intérêt des marqueurs de dommages musculaires a été évalué en jugeant de leur capacité à prédire la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire (*i.e.* force/puissance maximale volontaire). L'originalité de ce travail de thèse reposait sur (1) un travail de revue systématique avec méta-analyse portant sur un nombre important d'études qui permettait d'évaluer de manière quantitative l'intérêt des marqueurs de dommages musculaires les plus utilisés, (2) l'évaluation de l'intérêt des « nouveaux » marqueurs de dommages musculaires (miARNs circulants et raideur musculaire mesurée par élastographie), et (3) l'investigation des adaptations conférées par un exercice induisant des dommages musculaires par l'utilisation du RBE.

Si aucun des marqueurs couramment utilisés ne semble être en mesure de prédire la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire, certaines recommandations peuvent être données sur le(s) marqueur(s) à privilégier en fonction du moment où le diagnostic est effectué. La concentration de la myoglobine devrait être mesurée pendant les premières heures suivant l'exercice, alors que l'évaluation de l'activité de la CK ne semble avoir un intérêt qu'à partir de 72 h après l'exercice pour rendre compte de l'état de la fonction musculaire. Les résultats ce travail de thèse montrent que les « nouveaux » marqueurs de dommages musculaires, à savoir les microARNs circulants et la raideur musculaire mesurée par élastographie, peuvent avoir un intérêt pour prédire la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire. Cependant la prédiction n'est que partielle et une combinaison de plusieurs marqueurs semble être plus intéressante pour un meilleur diagnostic. Par ailleurs, les résultats montrent que des adaptations de la raideur musculaire semblent avoir lieu en réponse à un exercice induisant des dommages musculaires. Nous avons montré que les muscles pouvaient devenir plus raides en réponse à un exercice induisant des dommages musculaires pour protéger les muscles contre des dommages musculaires ultérieurs.

Ce travail de thèse a également permis de mettre en lumière de nouvelles questions. Les différents facteurs impliqués dans la variabilité des réponses des marqueurs de dommages musculaires les plus utilisés sont encore mal connus et devraient être investigués pour améliorer leur interprétation. Les mécanismes impliqués la libération des miARNs en réponse à l'exercice excentrique et aux adaptations associées devraient également être investigués. De la même manière, les mécanismes impliqués dans les modifications de la raideur musculaire après des exercices induisant des dommages musculaires restent à évaluer.

Au niveau des applications pratiques, ces travaux pourraient donner des indications sur la façon d'évaluer les dommages musculaires dans un contexte sportif ou militaire. Nos résultats montrent qu'il parait difficile d'adapter les charges d'entrainement en s'appuyant sur la mesure d'un unique marqueur, en raison d'une variabilité interindividuelle importante des marqueurs disponibles actuellement. Une combinaison de plusieurs marqueurs semble donc à privilégier, même si la combinaison la plus adaptée reste à déterminer. Si le moment où l'évaluation est effectuée semble conditionner le choix des marqueurs à mesurer, les besoins spécifiques des sportifs/militaires pourraient également orienter ce choix. En effet, certains marqueurs donnent une indication systémique (*e.g.*, CK, Mb, miARNs) alors que d'autres marqueurs permettent de localiser le(s) muscle(s) lésé(s) (*e.g.*, moment de FMV, DOMS, amplitude de mouvement articulaire, raideur mesurée par élastographie).

Références

Aagaard, P., Simonsen, E. B., Andersen, J. L., Magnusson, P., & Dyhre-Poulsen, P. (2002). Increased rate of force development and neural drive of human skeletal muscle following resistance training. *J Appl Physiol (1985), 93*(4), 1318-1326. doi:10.1152/japplphysiol.00283.2002

Aagaard, P., Simonsen, E. B., Andersen, J. L., Magnusson, S. P., Halkjaer-Kristensen, J., & Dyhre-Poulsen, P. (2000). Neural inhibition during maximal eccentric and concentric quadriceps contraction: effects of resistance training. *J Appl Physiol (1985), 89*(6), 2249-2257. doi:10.1152/jappl.2000.89.6.2249

Abbott, B. C., Bigland, B., & Ritchie, J. M. (1952). The physiological cost of negative work. *J Physiol, 117*(3), 380-390. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004755

Abernethy, P., Wilson, G., & Logan, P. (1995). Strength and power assessment. Issues, controversies and challenges. *Sports Med, 19*(6), 401-417. doi:10.2165/00007256-199519060-00004

Agten, C. A., Buck, F. M., Dyer, L., Flück, M., Pfirrmann, C. W., & Rosskopf, A. B. (2017). Delayed-Onset Muscle Soreness: Temporal Assessment With Quantitative MRI and Shear-Wave Ultrasound Elastography. *AJR Am J Roentgenol, 208*(2), 402-412. doi:10.2214/ajr.16.16617

Akagi, R., Fukui, T., Kubota, M., Nakamura, M., & Ema, R. (2017). Muscle Shear Moduli Changes and Frequency of Alternate Muscle Activity of Plantar Flexor Synergists Induced by Prolonged Low-Level Contraction. *Front Physiol, 8*, 708. doi:10.3389/fphys.2017.00708

Akagi, R., Sato, S., Yoshihara, K., Ishimatsu, H., & Ema, R. (2019). Sex difference in fatigability of knee extensor muscles during sustained low-level contractions. *Sci Rep, 9*(1), 16718. doi:10.1038/s41598-019-53375-z

Allen, D. G. (2001). Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. *Acta Physiol Scand, 171*(3), 311-319. doi:10.1046/j.1365-201x.2001.00833.x

Allen, D. G., Kabbara, A. A., & Westerblad, H. (2002). Muscle fatigue: the role of intracellular calcium stores. *Can J Appl Physiol, 27*(1), 83-96. doi:10.1139/h02-006

Allen, D. G., Lamb, G. D., & Westerblad, H. (2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev, 88*(1), 287-332. doi:10.1152/physrev.00015.2007

Andonian, P., Viallon, M., Le Goff, C., de Bourguignon, C., Tourel, C., Morel, J., . . . Croisille, P. (2016). Shear-Wave Elastography Assessments of Quadriceps Stiffness Changes prior to, during and after Prolonged Exercise: A Longitudinal Study during an Extreme Mountain Ultra-Marathon. *PLoS One, 11*(8), e0161855. doi:10.1371/journal.pone.0161855

Anesi, A., Rondanelli, M., Trotti, R., & Melzi d'Eril, G. V. (2000). Biological variability of myoglobin in healthy elderly and younger subjects. *Aging (Milano), 12*(3), 168-172. doi:10.1007/bf03339834

Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., & Calin, G. A. (2018). Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nature Reviews Clinical Oncology, 15*(9), 541-563. doi:10.1038/s41571-018-0035-x

Aoi, W., Ichikawa, H., Mune, K., Tanimura, Y., Mizushima, K., Naito, Y., & Yoshikawa, T. (2013). Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. *Front Physiol, 4*, 80. doi:10.3389/fphys.2013.00080

Armstrong, R. B. (1986). Muscle damage and endurance events. *Sports Med, 3*(5), 370-381. doi:10.2165/00007256-198603050-00006

Armstrong, R. B. (1990). Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc, 22*(4), 429-435.

Ascensao, A., Rebelo, A., Oliveira, E., Marques, F., Pereira, L., & Magalhaes, J. (2008). Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. *Clin Biochem, 41*(10-11), 841-851. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.04.008

Avela, J., Kyrolainen, H., Komi, P. V., & Rama, D. (1999). Reduced reflex sensitivity persists several days after long-lasting stretch-shortening cycle exercise. *J Appl Physiol (1985), 86*(4), 1292-1300. doi:10.1152/jappl.1999.86.4.1292

Babault, N., Pousson, M., Ballay, Y., & Van Hoecke, J. (2001). Activation of human quadriceps femoris during isometric, concentric, and eccentric contractions. *J Appl Physiol (1985), 91*(6), 2628-2634. doi:10.1152/jappl.2001.91.6.2628

Baggish, A. L., Hale, A., Weiner, R. B., Lewis, G. D., Systrom, D., Wang, F., . . . Chan, S. Y. (2011). Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol, 589*(Pt 16), 3983-3994. doi:10.1113/jphysiol.2011.213363

Baggish, A. L., Park, J., Min, P. K., Isaacs, S., Parker, B. A., Thompson, P. D., . . . Chan, S. Y. (2014). Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol (1985), 116*(5), 522-531. doi:10.1152/japplphysiol.01141.2013

Bala, S., Csak, T., Momen-Heravi, F., Lippai, D., Kodys, K., Catalano, D., . . . Szabo, G. (2015). Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice. *Sci Rep, 5*, 10721. doi:10.1038/srep10721

Balnave, C. D., & Allen, D. G. (1996). The effect of muscle length on intracellular calcium and force in single fibres from mouse skeletal muscle. *J Physiol, 492 (Pt 3)*(Pt 3), 705-713. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021339

Banzet, S., Chennaoui, M., Girard, O., Racinais, S., Drogou, C., Chalabi, H., & Koulmann, N. (2013). Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. *J Appl Physiol (1985), 115*(9), 1237-1244. doi:10.1152/japplphysiol.00075.2013

Barotsis, N., Tsiganos, P., Kokkalis, Z., Panayiotakis, G., & Panagiotopoulos, E. (2020). Reliability of muscle thickness measurements in ultrasonography. *Int J Rehabil Res, 43*(2), 123-128. doi:10.1097/mrr.0000000000000390

Baulande, S., Criqui, A., & Duthieuw, M. (2014). [Circulating miRNAs as a new class of biomedical markers]. *Med Sci (Paris), 30*(3), 289-296. doi:10.1051/medsci/20143003017

Beekley, M. D., Alt, J., Buckley, C. M., Duffey, M., & Crowder, T. A. (2007). Effects of heavy load carriage during constant-speed, simulated, road marching. *Mil Med, 172*(6), 592-595. doi:10.7205/milmed.172.6.592

Behrens, M., Mau-Moeller, A., & Bruhn, S. (2012). Effect of exercise-induced muscle damage on neuromuscular function of the quadriceps muscle. *Int J Sports Med, 33*(8), 600-606. doi:10.1055/s-0032-1304642

Beltman, J. G., Sargeant, A. J., van Mechelen, W., & de Haan, A. (2004). Voluntary activation level and muscle fiber recruitment of human quadriceps during lengthening contractions. *J Appl Physiol (1985), 97*(2), 619-626. doi:10.1152/japplphysiol.01202.2003

Bercoff, J., Tanter, M., & Fink, M. (2004). Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, *51*(4), 396-409. doi:10.1109/tuffc.2004.1295425

Bigland-Ritchie, & Woods, J. J. (1984). Changes in muscle contractile properties and neural control during human muscular fatigue. *Muscle Nerve, 7*(9), 691-699. doi:10.1002/mus.880070902

Bigland-Ritchie, B. R., Dawson, N. J., Johansson, R. S., & Lippold, O. C. (1986). Reflex origin for the slowing of motoneurone firing rates in fatigue of human voluntary contractions. *J Physiol, 379*, 451-459. doi:10.1113/jphysiol.1986.sp016263

Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. (2001). *Clin Pharmacol Ther, 69*(3), 89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989

Blacker, S. D., Fallowfield, J. L., Bilzon, J. L., & Willems, M. E. (2013). Neuromuscular impairment following backpack load carriage. *J Hum Kinet, 37*, 91-98. doi:10.2478/hukin-2013-0029

Blacker, S. D., Fallowfield, J. L., Bilzon, J. L. J., & Willems, M. E. T. (2010). Neuromuscular Function Following Prolonged Load Carriage on Level and Downhill Gradients. *Aviation, Space, and Environmental Medicine, 81*(8), 745-753. doi:10.3357/asem.2659.2010

Borenstein, M., Hedges, L., Higgins, J., & Rothstein, H. (2009). An Introduction to Meta-Analysis. *Introduction to Meta-Analysis, 19*. doi:10.1002/9780470743386

Bouchet, P., Gennisson, J. L., Podda, A., Alilet, M., Carrié, M., & Aubry, S. (2020). Artifacts and Technical Restrictions in 2D Shear Wave Elastography. *Ultraschall Med, 41*(3), 267-277. doi:10.1055/a-0805-1099

Bouillard, K., Nordez, A., Hodges, P. W., Cornu, C., & Hug, F. (2012). Evidence of changes in load sharing during isometric elbow flexion with ramped torque. *J Biomech, 45*(8), 1424-1429. doi:10.1016/j.jbiomech.2012.02.020

Bouillard, K., Nordez, A., & Hug, F. (2011). Estimation of individual muscle force using elastography. *PLoS One, 6*(12), e29261. doi:10.1371/journal.pone.0029261

Brancaccio, P., Lippi, G., & Maffulli, N. (2010). Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med, 48*(6), 757-767. doi:10.1515/cclm.2010.179

Brewster, L. M., Mairuhu, G., Sturk, A., & van Montfrans, G. A. (2007). Distribution of creatine kinase in the general population: implications for statin therapy. *Am Heart J, 154*(4), 655-661. doi:10.1016/j.ahj.2007.06.008

Brockett, C. L., Morgan, D. L., & Proske, U. (2001). Human hamstring muscles adapt to eccentric exercise by changing optimum length. *Med Sci Sports Exerc, 33*(5), 783-790.

Brusco, C. M., Radaelli, R., Neske, R., Peñailillo, L. E., & Pinto, R. S. (2022). Rate of torque development as an indirect marker of muscle damage in the knee flexors. *Sport Sciences for Health, 18*(1), 75-83. doi:10.1007/s11332-021-00776-1

Byrne, C., Eston, R. G., & Edwards, R. H. (2001). Characteristics of isometric and dynamic strength loss following eccentric exercise-induced muscle damage. *Scand J Med Sci Sports, 11*(3), 134-140.

Cacchiarelli, D., Legnini, I., Martone, J., Cazzella, V., D'Amico, A., Bertini, E., & Bozzoni, I. (2011). miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med, 3*(5), 258-265. doi:10.1002/emmm.201100133

Carlsen, J., Ewertsen, C., Sletting, S., Vejborg, I., Schäfer, F. K., Cosgrove, D., & Bachmann Nielsen, M. (2015). Ultrasound Elastography in Breast Cancer Diagnosis. *Ultraschall Med, 36*(6), 550-562; quiz 563-555. doi:10.1055/s-0035-1553293

Carmona, G., Mendiguchía, J., Alomar, X., Padullés, J. M., Serrano, D., Nescolarde, L., . . . Cadefau, J. A. (2018). Time Course and Association of Functional and Biochemical Markers in Severe Semitendinosus Damage Following Intensive Eccentric Leg Curls: Differences between and within Subjects. *Front Physiol, 9*. doi:10.3389/fphys.2018.00054

Carroll, T. J., Taylor, J. L., & Gandevia, S. C. (2017). Recovery of central and peripheral neuromuscular fatigue after exercise. *J Appl Physiol (1985), 122*(5), 1068-1076. doi:10.1152/japplphysiol.00775.2016

Chalchat, E., Charlot, K., Garcia-Vicencio, S., Hertert, P., Baugé, S., Bourdon, S., . . . Siracusa, J. (2021). Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes. *Scand J Med Sci Sports, 31*(9), 1782-1795. doi:10.1111/sms.14000

Chalchat, E., Gennisson, J. L., Peñailillo, L., Oger, M., Malgoyre, A., Charlot, K., . . . Garcia-Vicencio, S. (2020). Changes in the Viscoelastic Properties of the Vastus Lateralis Muscle With Fatigue. *Front Physiol, 11*, 307. doi:10.3389/fphys.2020.00307

Chazaud, B. (2020). Inflammation and Skeletal Muscle Regeneration: Leave It to the Macrophages! *Trends Immunol, 41*(6), 481-492. doi:10.1016/j.it.2020.04.006

Chen, Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., . . . Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res, 18*(10), 997-1006. doi:10.1038/cr.2008.282

Chen, Chen, H. L., Pearce, A. J., & Nosaka, K. (2012a). Attenuation of eccentric exercise-induced muscle damage by preconditioning exercises. *Med Sci Sports Exerc, 44*(11), 2090-2098. doi:10.1249/MSS.0b013e31825f69f3

Chen, Liang, H., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012b). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol, 22*(3), 125-132. doi:10.1016/j.tcb.2011.12.001

Chen, Nosaka, K., & Sacco, P. (2007). Intensity of eccentric exercise, shift of optimum angle, and the magnitude of repeated-bout effect. *J Appl Physiol (1985), 102*(3), 992-999. doi:10.1152/japplphysiol.00425.2006

Cheng, Y., Tan, N., Yang, J., Liu, X., Cao, X., He, P., . . . Zhang, C. (2010). A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clinical science (London, England : 1979), 119*(2), 87-95. doi:10.1042/cs20090645

Cheng, Y., Wang, X., Yang, J., Duan, X., Yao, Y., Shi, X., . . . Zhang, C. (2012). A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 53*(5), 668-676. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.08.010

Cheung, K., Hume, P., & Maxwell, L. (2003). Delayed onset muscle soreness : treatment strategies and performance factors. *Sports Med, 33*(2), 145-164. doi:10.2165/00007256-200333020-00005

Child, R. B., Saxton, J. M., & Donnelly, A. E. (1998). Comparison of eccentric knee extensor muscle actions at two muscle lengths on indices of damage and angle-specific force production in humans. *J Sports Sci, 16*(4), 301-308. doi:10.1080/02640419808559358

Choi, S. J. (2014). Differential susceptibility on myosin heavy chain isoform following eccentric-induced muscle damage. *J Exerc Rehabil, 10*(6), 344-348. doi:10.12965/jer.140171

Clarkson, P. M., Byrnes, W. C., McCormick, K. M., Turcotte, L. P., & White, J. S. (1986). Muscle soreness and serum creatine kinase activity following isometric, eccentric, and concentric exercise. *Int J Sports Med, 7*(3), 152-155. doi:10.1055/s-2008-1025753

Clarkson, P. M., & Hubal, M. J. (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil, 81*(11 Suppl), S52-69. doi:10.1097/01.PHM.0000029772.45258.43

Clarkson, P. M., Nosaka, K., & Braun, B. (1992). Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc, 24*(5), 512-520.

Clarkson, P. M., & Tremblay, I. (1988). Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in humans. *J Appl Physiol (1985), 65*(1), 1-6. doi:10.1152/jappl.1988.65.1.1

Clausen, T. (2003). Na+-K+ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol Rev, 83*(4), 1269-1324. doi:10.1152/physrev.00011.2003

Clauss, S., Wakili, R., Hildebrand, B., Kääb, S., Hoster, E., Klier, I., . . . Nickel, T. (2016). MicroRNAs as Biomarkers for Acute Atrial Remodeling in Marathon Runners (The miRathon Study--A Sub-Study of the Munich Marathon Study). *PLoS One, 11*(2), e0148599-e0148599. doi:10.1371/journal.pone.0148599

Coenen-Stass, A. M. L., Pauwels, M. J., Hanson, B., Martin Perez, C., Conceição, M., Wood, M. J. A., . . . Roberts, T. C. (2019). Extracellular microRNAs exhibit sequence-dependent stability and cellular release kinetics. *RNA Biol, 16*(5), 696-706. doi:10.1080/15476286.2019.1582956

Coenen-Stass, A. M. L., Wood, M. J. A., & Roberts, T. C. (2017). Biomarker Potential of Extracellular miRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy. *Trends Mol Med, 23*(11), 989-1001. doi:10.1016/j.molmed.2017.09.002

Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates.

Corona, B. T., Balog, E. M., Doyle, J. A., Rupp, J. C., Luke, R. C., & Ingalls, C. P. (2010). Junctophilin damage contributes to early strength deficits and EC coupling failure after eccentric contractions. *Am J Physiol Cell Physiol, 298*(2), C365-376. doi:10.1152/ajpcell.00365.2009

Corsten, M. F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., . . . Schroen, B. (2010). Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics', 3*(6), 499-506. doi:10.1161/circgenetics.110.957415

Crenshaw, A. G., Thornell, L. E., & Fridén, J. (1994). Intramuscular pressure, torque and swelling for the exercise-induced sore vastus lateralis muscle. *Acta Physiol Scand, 152*(3), 265-277. doi:10.1111/j.1748-1716.1994.tb09806.x

Creze, M., Nordez, A., Soubeyrand, M., Rocher, L., Maitre, X., & Bellin, M. F. (2018). Shear wave sonoelastography of skeletal muscle: basic principles, biomechanical concepts, clinical applications, and future perspectives. *Skeletal Radiol, 47*(4), 457-471. doi:10.1007/s00256-017-2843-y

D'Alessandra, Y., Devanna, P., Limana, F., Straino, S., Di Carlo, A., Brambilla, P. G., . . . Capogrossi, M. C. (2010). Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal, 31*(22), 2765-2773. doi:10.1093/eurheartj/ehq167

Damas, F., Nosaka, K., Libardi, C. A., Chen, T. C., & Ugrinowitsch, C. (2016). Susceptibility to Exercise-Induced Muscle Damage: a Cluster Analysis with a Large Sample. *Int J Sports Med, 37*(8), 633-640. doi:10.1055/s-0042-100281

Dankel, S. J., Abe, T., Bell, Z. W., Jessee, M. B., Buckner, S. L., Mattocks, K. T., . . . Loenneke, J. P. (2020). The Impact of Ultrasound Probe Tilt on Muscle Thickness and Echo-Intensity: A Cross-Sectional Study. *J Clin Densitom, 23*(4), 630-638. doi:10.1016/j.jocd.2018.10.003

Dartnall, T. J., Nordstrom, M. A., & Semmler, J. G. (2011). Adaptations in biceps brachii motor unit activity after repeated bouts of eccentric exercise in elbow flexor muscles. *J Neurophysiol, 105*(3), 1225-1235. doi:10.1152/jn.00854.2010

de Gonzalo-Calvo, D., Dávalos, A., Montero, A., García-González, Á., Tyshkovska, I., González-Medina, A., . . . Iglesias-Gutiérrez, E. (2015). Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. *J Appl Physiol (1985), 119*(2), 124-134. doi:10.1152/japplphysiol.00077.2015

Decherchi, P., & Dousset, E. (2003). [Role of metabosensitive afferent fibers in neuromuscular adaptive mechanisms]. *Can J Neurol Sci, 30*(2), 91-97.

Deyhle, M. R., Sorensen, J. R., & Hyldahl, R. D. (2016). Induction and Assessment of Exertional Skeletal Muscle Damage in Humans. *J Vis Exp*(118). doi:10.3791/54859

Diniz, G. P., & Wang, D. Z. (2016). Regulation of Skeletal Muscle by microRNAs. *Comprehensive Physiology, 6*(3), 1279-1294. doi:10.1002/cphy.c150041

Dousset, E., Avela, J., Ishikawa, M., Kallio, J., Kuitunen, S., Kyrolainen, H., . . . Komi, P. V. (2007). Bimodal recovery pattern in human skeletal muscle induced by exhaustive stretch-shortening cycle exercise. *Med Sci Sports Exerc, 39*(3), 453-460. doi:10.1249/mss.0b013e31802dd74e

Downs, S. H., & Black, N. (1998). The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomised and non-randomised studies of health care interventions. *J Epidemiol Community Health, 52*(6), 377-384. doi:10.1136/jech.52.6.377

Drummond, M. J., McCarthy, J. J., Fry, C. S., Esser, K. A., & Rasmussen, B. B. (2008). Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab, 295*(6), E1333-1340. doi:10.1152/ajpendo.90562.2008

Duchateau, J., & Hainaut, K. (1993). Behaviour of short and long latency reflexes in fatigued human muscles. *J Physiol, 471*, 787-799. doi:10.1113/jphysiol.1993.sp019928

Duclay, J., & Martin, A. (2005). Evoked H-reflex and V-wave responses during maximal isometric, concentric, and eccentric muscle contraction. *J Neurophysiol, 94*(5), 3555-3562. doi:10.1152/jn.00348.2005

Duclay, J., Martin, A., Robbe, A., & Pousson, M. (2008). Spinal reflex plasticity during maximal dynamic contractions after eccentric training. *Med Sci Sports Exerc, 40*(4), 722-734. doi:10.1249/MSS.0b013e31816184dc

Duclay, J., Pasquet, B., Martin, A., & Duchateau, J. (2011). Specific modulation of corticospinal and spinal excitabilities during maximal voluntary isometric, shortening and lengthening contractions in synergist muscles. *J Physiol, 589*(Pt 11), 2901-2916. doi:10.1113/jphysiol.2011.207472

Duclay, J., Pasquet, B., Martin, A., & Duchateau, J. (2014). Specific modulation of spinal and cortical excitabilities during lengthening and shortening submaximal and maximal contractions in plantar flexor muscles. *J Appl Physiol (1985), 117*(12), 1440-1450. doi:10.1152/japplphysiol.00489.2014

Dupont, G., Nedelec, M., McCall, A., McCormack, D., Berthoin, S., & Wisløff, U. (2010). Effect of 2 soccer matches in a week on physical performance and injury rate. *Am J Sports Med, 38*(9), 1752-1758. doi:10.1177/0363546510361236

Duttagupta, R., Jiang, R., Gollub, J., Getts, R. C., & Jones, K. W. (2011). Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One, 6*(6), e20769. doi:10.1371/journal.pone.0020769

Eby, S. F., Song, P., Chen, S., Chen, Q., Greenleaf, J. F., & An, K. N. (2013). Validation of shear wave elastography in skeletal muscle. *J Biomech, 46*(14), 2381-2387. doi:10.1016/j.jbiomech.2013.07.033

Edwards, R. H., Hill, D. K., Jones, D. A., & Merton, P. A. (1977). Fatigue of long duration in human skeletal muscle after exercise. *J Physiol, 272*(3), 769-778. doi:10.1113/jphysiol.1977.sp012072

Ema, R., Nosaka, K., Kawashima, R., Kanda, A., Ikeda, K., & Akagi, R. (2021). Muscle length influence on rectus femoris damage and protective effect in knee extensor eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports, 31*(3), 597-609. doi:10.1111/sms.13890

Enoka, R. M. (1996). Eccentric contractions require unique activation strategies by the nervous system. *J Appl Physiol (1985), 81*(6), 2339-2346. doi:10.1152/jappl.1996.81.6.2339

Ertel, K. A., Hallam, J. E., & Hillman, A. R. (2020). The effects of training status and exercise intensity on exercise-induced muscle damage. *J Sports Med Phys Fitness, 60*(3), 449-455. doi:10.23736/s0022-4707.19.10151-x

Faraldi, M., Gomarasca, M., Banfi, G., & Lombardi, G. (2018). Free Circulating miRNAs Measurement in Clinical Settings: The Still Unsolved Issue of the Normalization. *Advances in Clinical Chemistry, 87*, 113-139. doi:10.1016/bs.acc.2018.07.003

Faraone, S. V. (2008). Interpreting estimates of treatment effects: implications for managed care. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management, 33*(12), 700-711.

Féasson, L., Stockholm, D., Freyssenet, D., Richard, I., Duguez, S., Beckmann, J. S., & Denis, C. (2002). Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *J Physiol, 543*(Pt 1), 297-306. doi:10.1113/jphysiol.2002.018689

Fernandez-Gonzalo, R., Lundberg, T. R., Alvarez-Alvarez, L., & de Paz, J. A. (2014). Muscle damage responses and adaptations to eccentric-overload resistance exercise in men and women. *Eur J Appl Physiol, 114*(5), 1075-1084. doi:10.1007/s00421-014-2836-7

Fischer, C. P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev, 12*, 6-33.

Fochi, A. G., Damas, F., Berton, R., Alvarez, I., Miquelini, M., Salvini, T. F., & Libardi, C. A. (2016). Greater eccentric exercise-induced muscle damage by large versus small range of motion with the same end-point. *Biol Sport, 33*(3), 285-289. doi:10.5604/20831862.1208480

Forterre, A., Jalabert, A., Chikh, K., Pesenti, S., Euthine, V., Granjon, A., . . . Rome, S. (2014). Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. *Cell Cycle, 13*(1), 78-89. doi:10.4161/cc.26808

Foure, A., Nosaka, K., Wegrzyk, J., Duhamel, G., Le Troter, A., Boudinet, H., . . . Gondin, J. (2014). Time course of central and peripheral alterations after isometric neuromuscular electrical stimulation-induced muscle damage. *PLoS One, 9*(9), e107298. doi:10.1371/journal.pone.0107298

Friden, J., Sjostrom, M., & Ekblom, B. (1983). Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int J Sports Med, 4*(3), 170-176.

Fridén, J., Sjöström, M., & Ekblom, B. (1981). A morphological study of delayed muscle soreness. *Experientia, 37*(5), 506-507. doi:10.1007/bf01986165

Fry, C. S., Kirby, T. J., Kosmac, K., McCarthy, J. J., & Peterson, C. A. (2017). Myogenic Progenitor Cells Control Extracellular Matrix Production by Fibroblasts during Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Stem Cell, 20*(1), 56-69. doi:10.1016/j.stem.2016.09.010

Furman, J. (2015). When exercise causes exertional rhabdomyolysis. *JAAPA, 28*(4), 38-43. doi:10.1097/01.JAA.0000458861.78559.3b

Gandevia, S. C. (2001). Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev, 81*(4), 1725-1789. doi:10.1152/physrev.2001.81.4.1725

Gennisson, J. L., Deffieux, T., Fink, M., & Tanter, M. (2013). Ultrasound elastography: principles and techniques. *Diagn Interv Imaging, 94*(5), 487-495. doi:10.1016/j.diii.2013.01.022

Gennisson, J. L., Deffieux, T., Mace, E., Montaldo, G., Fink, M., & Tanter, M. (2010). Viscoelastic and anisotropic mechanical properties of in vivo muscle tissue assessed by supersonic shear imaging. *Ultrasound Med Biol, 36*(5), 789-801. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.02.013

Gissel, H. (2005). The role of Ca2+ in muscle cell damage. *Ann N Y Acad Sci, 1066*, 166-180. doi:10.1196/annals.1363.013

Glineur, S. F., De Ron, P., Hanon, E., Valentin, J. P., Dremier, S., & Nogueira da Costa, A. (2016). Paving the Route to Plasma miR-208a-3p as an Acute Cardiac Injury Biomarker: Preclinical Rat Data Supports Its Use in Drug Safety Assessment. *Toxicol Sci, 149*(1), 89-97. doi:10.1093/toxsci/kfv222

Goldspink, G. (1977). *Mechanics and Energetics of Animal Locomotion* : Chapman and Hall.

Goljanek-Whysall, K., Sweetman, D., Abu-Elmagd, M., Chapnik, E., Dalmay, T., Hornstein, E., & Münsterberg, A. (2011). MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108*(29), 11936-11941. doi:10.1073/pnas.1105362108

Gong, B., Legault, D., Miki, T., Seino, S., & Renaud, J. M. (2003). KATP channels depress force by reducing action potential amplitude in mouse EDL and soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol, 285*(6), C1464-1474. doi:10.1152/ajpcell.00278.2003

Gong, B., Miki, T., Seino, S., & Renaud, J. M. (2000). A K(ATP) channel deficiency affects resting tension, not contractile force, during fatigue in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol, 279*(5), C1351-1358. doi:10.1152/ajpcell.2000.279.5.C1351

Goodall, S., Thomas, K., Barwood, M., Keane, K., Gonzalez, J. T., St Clair Gibson, A., & Howatson, G. (2017). Neuromuscular changes and the rapid adaptation following a bout of damaging eccentric exercise. *Acta Physiol (Oxf), 220*(4), 486-500. doi:10.1111/apha.12844

Gray, S. E., & Finch, C. F. (2015). Epidemiology of hospital-treated injuries sustained by fitness participants. *Res Q Exerc Sport, 86*(1), 81-87. doi:10.1080/02701367.2014.975177

Green, M. A., Sinkus, R., Gandevia, S. C., Herbert, R. D., & Bilston, L. E. (2012). Measuring changes in muscle stiffness after eccentric exercise using elastography. *NMR Biomed, 25*(6), 852-858. doi:10.1002/nbm.1801

Gresslien, T., & Agewall, S. (2016). Troponin and exercise. *International Journal Cardiology, 221*, 609-621. doi:10.1016/j.ijcard.2016.06.243

Gruber, M., Linnamo, V., Strojnik, V., Rantalainen, T., & Avela, J. (2009). Excitability at the motoneuron pool and motor cortex is specifically modulated in lengthening compared to isometric contractions. *J Neurophysiol, 101*(4), 2030-2040. doi:10.1152/jn.91104.2008

Guescini, M., Canonico, B., Lucertini, F., Maggio, S., Annibalini, G., Barbieri, E., . . . Stocchi, V. (2015). Muscle Releases Alpha-Sarcoglycan Positive Extracellular Vesicles Carrying miRNAs in the Bloodstream. *PLoS One, 10*(5), e0125094. doi:10.1371/journal.pone.0125094

Guilhem, G., Cornu, C., & Guével, A. (2010). Neuromuscular and muscle-tendon system adaptations to isotonic and isokinetic eccentric exercise. *Ann Phys Rehabil Med, 53*(5), 319-341. doi:10.1016/j.rehab.2010.04.003

Guilhem, G., Doguet, V., Hauraix, H., Lacourpaille, L., Jubeau, M., Nordez, A., & Dorel, S. (2016). Muscle force loss and soreness subsequent to maximal eccentric contractions depend on the amount of fascicle strain in vivo. *Acta Physiol (Oxf), 217*(2), 152-163. doi:10.1111/apha.12654

Heales, L. J., Badya, R., Ziegenfuss, B., Hug, F., Coombes, J. S., van den Hoorn, W., . . . Coombes, B. K. (2018). Shear-wave velocity of the patellar tendon and quadriceps muscle is increased immediately after maximal eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol, 118*(8), 1715-1724. doi:10.1007/s00421-018-3903-2

Heavens, K. R., Szivak, T. K., Hooper, D. R., Dunn-Lewis, C., Comstock, B. A., Flanagan, S. D., . . . Kraemer, W. J. (2014). The effects of high intensity short rest resistance exercise on muscle damage markers in men and women. *J Strength Cond Res, 28*(4), 1041-1049. doi:10.1097/jsc.0000000000000236

Hedges, L. V. (1981). Distribution Theory for Glass's Estimator of Effect size and Related Estimators. *Journal of Educational and Behavioral Statistics, 6*(2), 107-128.

Herbert, R. D., Moseley, A. M., Butler, J. E., & Gandevia, S. C. (2002). Change in length of relaxed muscle fascicles and tendons with knee and ankle movement in humans. *J Physiol, 539*(Pt 2), 637-645. doi:10.1113/jphysiol.2001.012756

Herzog, W., Schappacher, G., DuVall, M., Leonard, T. R., & Herzog, J. A. (2016). Residual Force Enhancement Following Eccentric Contractions: A New Mechanism Involving Titin. *Physiology (Bethesda), 31*(4), 300-312. doi:10.1152/physiol.00049.2014

Hicks, A., & McComas, A. J. (1989). Increased sodium pump activity following repetitive stimulation of rat soleus muscles. *J Physiol, 414*, 337-349. doi:10.1113/jphysiol.1989.sp017691

Hoffman, B. W., Cresswell, A. G., Carroll, T. J., & Lichtwark, G. A. (2016). Protection from Muscle Damage in the Absence of Changes in Muscle Mechanical Behavior. *Med Sci Sports Exerc, 48*(8), 1495-1505. doi:10.1249/MSS.0000000000000920

Honda, S., Kawasaki, T., Kamitani, T., & Kiyota, K. (2017). Rhabdomyolysis after High Intensity Resistance Training. *Internal medicine (Tokyo, Japan), 56*(10), 1175-1178. doi:10.2169/internalmedicine.56.7636

Howatson, G., Taylor, M. B., Rider, P., Motawar, B. R., McNally, M. P., Solnik, S., . . . Hortobágyi, T. (2011). Ipsilateral motor cortical responses to TMS during lengthening and shortening of the contralateral wrist flexors. *Eur J Neurosci, 33*(5), 978-990. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07567.x

Howatson, G., & van Someren, K. A. (2007). Evidence of a contralateral repeated bout effect after maximal eccentric contractions. *Eur J Appl Physiol, 101*(2), 207-214. doi:10.1007/s00421-007-0489-5

Howell, J. N., Chleboun, G., & Conatser, R. (1993). Muscle stiffness, strength loss, swelling and soreness following exercise-induced injury in humans. *J Physiol, 464*, 183-196. doi:10.1113/jphysiol.1993.sp019629

Hug, F., Tucker, K., Gennisson, J. L., Tanter, M., & Nordez, A. (2015). Elastography for Muscle Biomechanics: Toward the Estimation of Individual Muscle Force. *Exerc Sport Sci Rev, 43*(3), 125-133. doi:10.1249/jes.0000000000000049

Hunter, S. K. (2018). Performance Fatigability: Mechanisms and Task Specificity. *Cold Spring Harb Perspect Med, 8*(7). doi:10.1101/cshperspect.a029728

Hunter, S. K., & Enoka, R. M. (2001). Sex differences in the fatigability of arm muscles depends on absolute force during isometric contractions. *J Appl Physiol (1985), 91*(6), 2686-2694. doi:10.1152/jappl.2001.91.6.2686

Hyldahl, R. D., Chen, T. C., & Nosaka, K. (2017). Mechanisms and Mediators of the Skeletal Muscle Repeated Bout Effect. *Exerc Sport Sci Rev, 45*(1), 24-33. doi:10.1249/JES.0000000000000095

Ingalls, C. P., Warren, G. L., Williams, J. H., Ward, C. W., & Armstrong, R. B. (1998). E-C coupling failure in mouse EDL muscle after in vivo eccentric contractions. *J Appl Physiol (1985), 85*(1), 58-67. doi:10.1152/jappl.1998.85.1.58

Ishikawa, M., Dousset, E., Avela, J., Kyrolainen, H., Kallio, J., Linnamo, V., . . . Komi, P. V. (2006). Changes in the soleus muscle architecture after exhausting stretch-shortening cycle exercise in humans. *Eur J Appl Physiol, 97*(3), 298-306. doi:10.1007/s00421-006-0180-2

Janecki, D., Jaskólska, A., Marusiak, J., & Jaskólski, A. (2016). Low-Frequency Fatigue Assessed as Double to Single Twitch Ratio after Two Bouts of Eccentric Exercise of the Elbow Flexors. *J Sports Sci Med, 15*(4), 697-703.

Jeanson-Leh, L., Lameth, J., Krimi, S., Buisset, J., Amor, F., Le Guiner, C., . . . Israeli, D. (2014). Serum profiling identifies novel muscle miRNA and cardiomyopathy-related miRNA biomarkers in Golden Retriever muscular dystrophy dogs and Duchenne muscular dystrophy patients. *Am J Pathol, 184*(11), 2885-2898. doi:10.1016/j.ajpath.2014.07.021

Jenkins, Housh, T. J., Traylor, D. A., Cochrane, K. C., Bergstrom, H. C., Lewis, R. W., . . . Cramer, J. T. (2014). The rate of torque development: a unique, non-invasive indicator of eccentric-induced muscle damage? *Int J Sports Med, 35*(14), 1190-1195. doi:10.1055/s-0034-1375696

Jenkins, Palmer, T., & Cramer, J. (2013). Comparisons of voluntary and evoked rate of torque development and rate of velocity development during isokinetic muscle actions. *Journal of Isokinetics and Exercise Science, 21*, 253-261. doi:10.3233/IES-130504

Katz, B. (1939). The relation between force and speed in muscular contraction. *J Physiol, 96*(1), 45-64. doi:10.1113/jphysiol.1939.sp003756

Kavakiotis, I., Alexiou, A., Tastsoglou, S., Vlachos, I. S., & Hatzigeorgiou, A. G. (2022). DIANA-miTED: a microRNA tissue expression database. *Nucleic Acids Res, 50*(D1), D1055-d1061. doi:10.1093/nar/gkab733

Kirby, T. J., Chaillou, T., & McCarthy, J. J. (2015). The role of microRNAs in skeletal muscle health and disease. *Front Biosci (Landmark Ed), 20*(1), 37-77. doi:10.2741/4298

Komulainen, J., Koskinen, S. O., Kalliokoski, R., Takala, T. E., & Vihko, V. (1999). Gender differences in skeletal muscle fibre damage after eccentrically biased downhill running in rats. *Acta Physiol Scand, 165*(1), 57-63. doi:10.1046/j.1365-201x.1999.00481.x

Komulainen, J., Takala, T. E., Kuipers, H., & Hesselink, M. K. (1998). The disruption of myofibre structures in rat skeletal muscle after forced lengthening contractions. *Pflugers Arch, 436*(5), 735-741. doi:10.1007/s004240050696

Kubo, K., Kanehisa, H., Kawakami, Y., & Fukunaga, T. (2000). Elastic properties of muscle-tendon complex in long-distance runners. *Eur J Appl Physiol, 81*(3), 181-187. doi:10.1007/s004210050028

Kubo, K., Kanehisa, H., Kawakami, Y., & Fukunaga, T. (2001). Influences of repetitive muscle contractions with different modes on tendon elasticity in vivo. *J Appl Physiol (1985), 91*(1), 277-282. doi:10.1152/jappl.2001.91.1.277

Lacourpaille, L., Hug, F., Bouillard, K., Hogrel, J. Y., & Nordez, A. (2012). Supersonic shear imaging provides a reliable measurement of resting muscle shear elastic modulus. *Physiol Meas, 33*(3), N19-28. doi:10.1088/0967-3334/33/3/N19

Lacourpaille, L., Hug, F., Guével, A., Péréon, Y., Magot, A., Hogrel, J. Y., & Nordez, A. (2015). Non-invasive assessment of muscle stiffness in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve, 51*(2), 284-286. doi:10.1002/mus.24445

Lacourpaille, L., Nordez, A., Hug, F., Couturier, A., Dibie, C., & Guilhem, G. (2014). Time-course effect of exercise-induced muscle damage on localized muscle mechanical properties assessed using elastography. *Acta Physiol (Oxf), 211*(1), 135-146. doi:10.1111/apha.12272

Lacourpaille, L., Nordez, A., Hug, F., Doguet, V., Andrade, R., & Guilhem, G. (2017). Early detection of exercise-induced muscle damage using elastography. *Eur J Appl Physiol, 117*(10), 2047-2056. doi:10.1007/s00421-017-3695-9

Lakie, M., & Campbell, K. S. (2019). Muscle thixotropy-where are we now? *J Appl Physiol (1985), 126*(6), 1790-1799. doi:10.1152/japplphysiol.00788.2018

Lapointe, B. M., Frenette, J., & Côté, C. H. (2002). Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. *J Appl Physiol (1985), 92*(5), 1995-2004. doi:10.1152/japplphysiol.00803.2001

LaStayo, P. C., Woolf, J. M., Lewek, M. D., Snyder-Mackler, L., Reich, T., & Lindstedt, S. L. (2003). Eccentric muscle contractions: their contribution to injury, prevention, rehabilitation, and sport. *J Orthop Sports Phys Ther, 33*(10), 557-571. doi:10.2519/jospt.2003.33.10.557

Laterza, O. F., Lim, L., Garrett-Engele, P. W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W. K., . . . Glaab, W. E. (2009). Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem, 55*(11), 1977-1983. doi:10.1373/clinchem.2009.131797

Lau, W. Y., Blazevich, A. J., Newton, M. J., Wu, S. S., & Nosaka, K. (2015). Reduced muscle lengthening during eccentric contractions as a mechanism underpinning the repeated-bout effect. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 308*(10), R879-886. doi:10.1152/ajpregu.00338.2014

Lavoué, C., Siracusa, J., Chalchat, É., Bourrilhon, C., & Charlot, K. (2020). Analysis of food and fluid intake in elite ultra-endurance runners during a 24-h world championship. *J Int Soc Sports Nutr, 17*(1), 36. doi:10.1186/s12970-020-00364-7

Lee, Baek, M., Gusev, Y., Brackett, D. J., Nuovo, G. J., & Schmittgen, T. D. (2008). Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *Rna, 14*(1), 35-42. doi:10.1261/rna.804508

Lee, Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell, 75*(5), 843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-y

Lehti, T. M., Kalliokoski, R., & Komulainen, J. (2007). Repeated bout effect on the cytoskeletal proteins titin, desmin, and dystrophin in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil, 28*(1), 39-47. doi:10.1007/s10974-007-9102-0

Leung, W. K. C., Chu, K. L., & Lai, C. (2017). Sonographic evaluation of the immediate effects of eccentric heel drop exercise on Achilles tendon and gastrocnemius muscle stiffness using shear wave elastography. *PeerJ, 5*, e3592. doi:10.7717/peerj.3592

Lewis, P. B., Ruby, D., & Bush-Joseph, C. A. (2012). Muscle soreness and delayed-onset muscle soreness. *Clin Sports Med, 31*(2), 255-262. doi:10.1016/j.csm.2011.09.009

Li, X., Li, Y., Zhao, L., Zhang, D., Yao, X., Zhang, H., . . . Ying, H. (2014). Circulating Muscle-specific miRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Mol Ther Nucleic Acids, 3*(7), e177. doi:10.1038/mtna.2014.29

Lieber, R. L., & Fridén, J. (1999). Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction. *J Sci Med Sport, 2*(3), 253-265. doi:10.1016/s1440-2440(99)80177-7

Lieber, R. L., Thornell, L. E., & Fridén, J. (1996). Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contraction. *J Appl Physiol (1985), 80*(1), 278-284. doi:10.1152/jappl.1996.80.1.278

Lindstedt, S. L., LaStayo, P. C., & Reich, T. E. (2001). When active muscles lengthen: properties and consequences of eccentric contractions. *News Physiol Sci, 16*, 256-261. doi:10.1152/physiologyonline.2001.16.6.256

Linnamo, V., Moritani, T., Nicol, C., & Komi, P. V. (2003). Motor unit activation patterns during isometric, concentric and eccentric actions at different force levels. *J Electromyogr Kinesiol, 13*(1), 93-101. doi:10.1016/s1050-6411(02)00063-9

Lippi, G., Schena, F., & Ceriotti, F. (2018). Diagnostic biomarkers of muscle injury and exertional rhabdomyolysis. *Clin Chem Lab Med, 57*(2), 175-182. doi:10.1515/cclm-2018-0656

Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., . . . Keller, A. (2016). Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res, 44*(8), 3865-3877. doi:10.1093/nar/gkw116

Luther, P. K. (2009). The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil, 30*(5-6), 171-185. doi:10.1007/s10974-009-9189-6

MacIntosh, B. R. (2010). Cellular and whole muscle studies of activity dependent potentiation. *Adv Exp Med Biol, 682*, 315-342. doi:10.1007/978-1-4419-6366-6_18

MacIntosh, B. R. (2017). Recent developments in understanding the length dependence of contractile response of skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol, 117*(6), 1059-1071. doi:10.1007/s00421-017-3591-3

Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., & Hornik, K. (2012). Cluster: cluster analysis basics and extensions. *R package version, 1*(2), 56.

Maeo, S., Ando, Y., Kanehisa, H., & Kawakami, Y. (2017). Localization of damage in the human leg muscles induced by downhill running. *Sci Rep, 7*(1), 5769. doi:10.1038/s41598-017-06129-8

Maeo, S., Ochi, Y., Yamamoto, M., Kanehisa, H., & Nosaka, K. (2015). Effect of a prior bout of preconditioning exercise on muscle damage from downhill walking. *Appl Physiol Nutr Metab, 40*(3), 274-279. doi:10.1139/apnm-2014-0390

Maeo, S., Saito, A., Otsuka, S., Shan, X., Kanehisa, H., & Kawakami, Y. (2018). Localization of muscle damage within the quadriceps femoris induced by different types of eccentric exercises. *Scand J Med Sci Sports, 28*(1), 95-106. doi:10.1111/sms.12880

Maeo, S., Yamamoto, M., & Kanehisa, H. (2016). Downhill walking training with and without exercise-induced muscle damage similarly increase knee extensor strength. *J Sports Sci, 34*(21), 2018-2026. doi:10.1080/02640414.2016.1149607

Maffiuletti, N. A., Aagaard, P., Blazevich, A. J., Folland, J., Tillin, N., & Duchateau, J. (2016). Rate of force development: physiological and methodological considerations. *Eur J Appl Physiol, 116*(6), 1091-1116. doi:10.1007/s00421-016-3346-6

Magnusson, S. P. (1998). Passive properties of human skeletal muscle during stretch maneuvers. A review. *Scand J Med Sci Sports, 8*(2), 65-77. doi:10.1111/j.1600-0838.1998.tb00171.x

Mantilla-Escalante, D. C., López de Las Hazas, M. C., Gil-Zamorano, J., Del Pozo-Acebo, L., Crespo, M. C., Martín-Hernández, R., . . . Dávalos, A. (2019). Postprandial Circulating miRNAs in Response to a Dietary Fat Challenge. *Nutrients, 11*(6). doi:10.3390/nu11061326

Marshall, P. W., Cross, R., & Lovell, R. (2015). Passive heating following the prematch warm-up in soccer: examining the time-course of changes in muscle temperature and contractile function. *Physiol Rep, 3*(12). doi:10.14814/phy2.12635

Martin, V., Kerherve, H., Messonnier, L. A., Banfi, J. C., Geyssant, A., Bonnefoy, R., . . . Millet, G. Y. (2010). Central and peripheral contributions to neuromuscular fatigue induced by a 24-h treadmill run. *J Appl Physiol (1985), 108*(5), 1224-1233. doi:10.1152/japplphysiol.01202.2009

Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol, 21*(1), 9-17. doi:10.1038/s41556-018-0250-9

McHugh, M. P. (2003). Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports, 13*(2), 88-97.

McNeil, P. L., & Khakee, R. (1992). Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *Am J Pathol, 140*(5), 1097-1109.

Meisner, A., Kerr, K. F., Thiessen-Philbrook, H., Coca, S. G., & Parikh, C. R. (2016). Methodological issues in current practice may lead to bias in the development of biomarker combinations for predicting acute kidney injury. *Kidney Int, 89*(2), 429-438. doi:10.1038/ki.2015.283

Mense, S. (1981). Sensitization of group IV muscle receptors to bradykinin by 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2. *Brain Res, 225*(1), 95-105. doi:10.1016/0006-8993(81)90320-6

Merton, P. A. (1954). Voluntary strength and fatigue. *J Physiol, 123*(3), 553-564. doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005070

Millet, G. Y., Bachasson, D., Temesi, J., Wuyam, B., Féasson, L., Vergès, S., & Lévy, P. (2012). Potential interests and limits of magnetic and electrical stimulation techniques to assess neuromuscular fatigue. *Neuromuscul Disord, 22 Suppl 3*, S181-186. doi:10.1016/j.nmd.2012.10.007

Millet, G. Y., Martin, V., Martin, A., & Vergès, S. (2011a). Electrical stimulation for testing neuromuscular function: from sport to pathology. *Eur J Appl Physiol, 111*(10), 2489-2500. doi:10.1007/s00421-011-1996-y

Millet, G. Y., Tomazin, K., Verges, S., Vincent, C., Bonnefoy, R., Boisson, R. C., . . . Martin, V. (2011b). Neuromuscular consequences of an extreme mountain ultra-marathon. *PLoS One, 6*(2), e17059. doi:10.1371/journal.pone.0017059

Miyamoto, N., Hirata, K., Kanehisa, H., & Yoshitake, Y. (2015). Validity of measurement of shear modulus by ultrasound shear wave elastography in human pennate muscle. *PLoS One, 10*(4), e0124311. doi:10.1371/journal.pone.0124311

Moher, D., Shamseer, L., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., Petticrew, M., . . . Stewart, L. A. (2015). Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev, 4*, 1. doi:10.1186/2046-4053-4-1

Moons, K. G., Altman, D. G., Reitsma, J. B., Ioannidis, J. P., Macaskill, P., Steyerberg, E. W., . . . Collins, G. S. (2015). Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis (TRIPOD): explanation and elaboration. *Annals of internal medicine, 162*(1), W1-73. doi:10.7326/m14-0698

Mooren, F. C., Viereck, J., Kruger, K., & Thum, T. (2014). Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol, 306*(4), H557-563. doi:10.1152/ajpheart.00711.2013

Morel, B., Hug, F., Nordez, A., Pournot, H., Besson, T., Mathevon, L., & Lapole, T. (2019). Reduced Active Muscle Stiffness after Intermittent Submaximal Isometric Contractions. *Med Sci Sports Exerc*. doi:10.1249/mss.0000000000002080

Morgan, D. L. (1990). New insights into the behavior of muscle during active lengthening. *Biophysical journal, 57*(2), 209-221. doi:10.1016/s0006-3495(90)82524-8

Morgan, D. L., & Allen, D. G. (1999). Early events in stretch-induced muscle damage. *J Appl Physiol (1985), 87*(6), 2007-2015. doi:10.1152/jappl.1999.87.6.2007

Muslimovic, A., Fridén, V., Starnberg, K., Tenstad, O., Espedal, H., Vukusic, K., . . . Hammarsten, O. (2020). Novel clearance of muscle proteins by muscle cells. *Eur J Cell Biol, 99*(8), 151127. doi:10.1016/j.ejcb.2020.151127

Nabiałek, E., Wańha, W., Kula, D., Jadczyk, T., Krajewska, M., Kowalówka, A., . . . Wojakowski, W. (2013). Circulating microRNAs (miR-423-5p, miR-208a and miR-1) in acute myocardial infarction and stable coronary heart disease. *Minerva Cardioangiolica, 61*(6), 627-637.

Neal, R. C., Ferdinand, K. C., Ycas, J., & Miller, E. (2009). Relationship of ethnic origin, gender, and age to blood creatine kinase levels. *Am J Med, 122*(1), 73-78. doi:10.1016/j.amjmed.2008.08.033

Newham, D. J., McPhail, G., Mills, K. R., & Edwards, R. H. (1983). Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J Neurol Sci, 61*(1), 109-122. doi:10.1016/0022-510x(83)90058-8

Nicol, C., Komi, P. V., Horita, T., Kyröläinen, H., & Takala, T. E. (1996). Reduced stretch-reflex sensitivity after exhausting stretch-shortening cycle exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 72*(5-6), 401-409. doi:10.1007/bf00242268

Nielsen, S., Hvid, T., Kelly, M., Lindegaard, B., Dethlefsen, C., Winding, K., . . . Laye, M. J. (2013). Muscle specific miRNAs are induced by testosterone and independently upregulated by age. *Front Physiol, 4*, 394. doi:10.3389/fphys.2013.00394

Nordlund, M. M., Thorstensson, A., & Cresswell, A. G. (2002). Variations in the soleus H-reflex as a function of activation during controlled lengthening and shortening actions. *Brain Res, 952*(2), 301-307. doi:10.1016/s0006-8993(02)03259-6

Nosaka, K., Clarkson, P. M., McGuiggin, M. E., & Byrne, J. M. (1991). Time course of muscle adaptation after high force eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 63*(1), 70-76. doi:10.1007/bf00760804

Nosaka, K., & Newton, M. (2002). Difference in the magnitude of muscle damage between maximal and submaximal eccentric loading. *J Strength Cond Res, 16*(2), 202-208.

Nosaka, K., Newton, M., & Sacco, P. (2002). Delayed-onset muscle soreness does not reflect the magnitude of eccentric exercise-induced muscle damage. *Scand J Med Sci Sports, 12*(6), 337-346. doi:10.1034/j.1600-0838.2002.10178.x

Nosaka, K., Sakamoto, K., Newton, M., & Sacco, P. (2001). How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Med Sci Sports Exerc, 33*(9), 1490-1495.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne), 9*, 402. doi:10.3389/fendo.2018.00402

Paulsen, G., Mikkelsen, U. R., Raastad, T., & Peake, J. M. (2012). Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exerc Immunol Rev, 18*, 42-97.

Peake, J., Nosaka, K., & Suzuki, K. (2005). Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev, 11*, 64-85.

Penailillo, L., Blazevich, A., Numazawa, H., & Nosaka, K. (2015a). Rate of force development as a measure of muscle damage. *Scand J Med Sci Sports, 25*(3), 417-427. doi:10.1111/sms.12241

Penailillo, L., Blazevich, A. J., & Nosaka, K. (2015b). Muscle fascicle behavior during eccentric cycling and its relation to muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc, 47*(4), 708-717. doi:10.1249/MSS.0000000000000473

Philippou, A., Maridaki, M., & Bogdanis, G. C. (2003). Angle-specific impairment of elbow flexors strength after isometric exercise at long muscle length. *J Sports Sci, 21*(10), 859-865. doi:10.1080/0264041031000140356

Piitulainen, H., Komi, P., Linnamo, V., & Avela, J. (2008). Sarcolemmal excitability as investigated with M-waves after eccentric exercise in humans. *J Electromyogr Kinesiol, 18*(4), 672-681. doi:10.1016/j.jelekin.2007.01.004

Pincheira, P. A., Hoffman, B. W., Cresswell, A. G., Carroll, T. J., Brown, N. A. T., & Lichtwark, G. A. (2018). The repeated bout effect can occur without mechanical and neuromuscular changes after a bout of eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports, 28*(10), 2123-2134. doi:10.1111/sms.13222

Pizza, F. X., Davis, B. H., Henrickson, S. D., Mitchell, J. B., Pace, J. F., Bigelow, N., . . . Naglieri, T. (1996). Adaptation to eccentric exercise: effect on CD64 and CD11b/CD18 expression. *J Appl Physiol (1985), 80*(1), 47-55. doi:10.1152/jappl.1996.80.1.47

Pournot, H., Tindel, J., Testa, R., Mathevon, L., & Lapole, T. (2016). The Acute Effect of Local Vibration As a Recovery Modality from Exercise-Induced Increased Muscle Stiffness. *J Sports Sci Med, 15*(1), 142-147.

Prasartwuth, O., Allen, T. J., Butler, J. E., Gandevia, S. C., & Taylor, J. L. (2006). Length-dependent changes in voluntary activation, maximum voluntary torque and twitch responses after eccentric damage in humans. *J Physiol, 571*(Pt 1), 243-252. doi:10.1113/jphysiol.2005.101600

Prasartwuth, O., Taylor, J. L., & Gandevia, S. C. (2005). Maximal force, voluntary activation and muscle soreness after eccentric damage to human elbow flexor muscles. *J Physiol, 567*(Pt 1), 337-348. doi:10.1113/jphysiol.2005.087767

Proske, U., & Morgan, D. L. (2001). Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol, 537*(Pt 2), 333-345. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.00333.x

Raastad, T., Owe, S. G., Paulsen, G., Enns, D., Overgaard, K., Crameri, R., . . . Hallen, J. (2010). Changes in calpain activity, muscle structure, and function after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc, 42*(1), 86-95. doi:10.1249/MSS.0b013e3181ac7afa

Ramos, A. E., Lo, C., Estephan, L. E., Tai, Y.-Y., Tang, Y., Zhao, J., . . . Baggish, A. L. (2018). Specific circulating microRNAs display dose-dependent responses to variable intensity and duration of endurance exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol, 315*(2), H273-H283. doi:10.1152/ajpheart.00741.2017

Rassier, D. E., MacIntosh, B. R., & Herzog, W. (1999). Length dependence of active force production in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985), 86*(5), 1445-1457. doi:10.1152/jappl.1999.86.5.1445

Reeves, N. D., Maganaris, C. N., Longo, S., & Narici, M. V. (2009). Differential adaptations to eccentric versus conventional resistance training in older humans. *Exp Physiol, 94*(7), 825-833. doi:10.1113/expphysiol.2009.046599

Reihmane, D., & Dela, F. (2014). Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *Eur J Sport Sci, 14*(3), 242-250. doi:10.1080/17461391.2013.776640

Rivas, D. A., Lessard, S. J., Rice, N. P., Lustgarten, M. S., So, K., Goodyear, L. J., . . . Fielding, R. A. (2014). Diminished skeletal muscle microRNA expression with aging is associated with attenuated muscle plasticity and inhibition of IGF-1 signaling. *FASEB J, 28*(9), 4133-4147. doi:10.1096/fj.14-254490

Roberts, T. C., Godfrey, C., McClorey, G., Vader, P., Briggs, D., Gardiner, C., . . . Wood, M. J. (2013). Extracellular microRNAs are dynamic non-vesicular biomarkers of muscle turnover. *Nucleic Acids Res, 41*(20), 9500-9513. doi:10.1093/nar/gkt724

Rojas-Valverde, D., Sanchez-Urena, B., Crowe, J., Timon, R., & Olcina, G. J. (2020). Exertional rhabdomyolysis and acute kidney injury in endurance sports: A systematic review. *Eur J Sport Sci*, 1-14. doi:10.1080/17461391.2020.1746837

Rominger, M. B., Kälin, P., Mastalerz, M., Martini, K., Klingmüller, V., Sanabria, S., & Frauenfelder, T. (2018). Influencing Factors of 2D Shear Wave Elastography of the Muscle - An Ex Vivo Animal Study. *Ultrasound Int Open, 4*(2), E54-e60. doi:10.1055/a-0619-6058

Roszek, B., Baan, G. C., & Huijing, P. A. (1994). Decreasing stimulation frequency-dependent length-force characteristics of rat muscle. *J Appl Physiol (1985), 77*(5), 2115-2124. doi:10.1152/jappl.1994.77.5.2115

Sadacharan, C. M., & Seo, S. (2021). Effect of Large Versus Small Range of Motion in the Various Intensities of Eccentric Exercise-Induced Muscle Pain and Strength. *Int J Exerc Sci, 14*(7), 1-18.

Sapin-de Brosses, E., Gennisson, J. L., Pernot, M., Fink, M., & Tanter, M. (2010). Temperature dependence of the shear modulus of soft tissues assessed by ultrasound. *Phys Med Biol, 55*(6), 1701-1718. doi:10.1088/0031-9155/55/6/011

Saunders, P. U., Pyne, D. B., Telford, R. D., & Hawley, J. A. (2004). Factors affecting running economy in trained distance runners. *Sports Med, 34*(7), 465-485. doi:10.2165/00007256-200434070-00005

Saxton, J. M., & Donnelly, A. E. (1996). Length-specific impairment of skeletal muscle contractile function after eccentric muscle actions in man. *Clin Sci (Lond), 90*(2), 119-125. doi:10.1042/cs0900119

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods, 9*(7), 671-675. doi:10.1038/nmeth.2089

Sejersted, O. M., & Sjøgaard, G. (2000). Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev, 80*(4), 1411-1481. doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1411

Sekiguchi, H., Kimura, T., Yamanaka, K., & Nakazawa, K. (2001). Lower excitability of the corticospinal tract to transcranial magnetic stimulation during lengthening contractions in human elbow flexors. *Neurosci Lett, 312*(2), 83-86. doi:10.1016/s0304-3940(01)02197-8

Servonnet, A., Dubost, C., Martin, G., Lefrère, B., Fontan, E., Ceppa, F., & Delacour, H. (2018). Myoglobin: still a useful biomarker in 2017? *Ann Biol Clin (Paris), 76*(2), 137-141. doi:10.1684/abc.2018.1326

Siracusa, J., Charlot, K., Malgoyre, A., Conort, S., Tardo-Dino, P. E., Bourrilhon, C., & Garcia-Vicencio, S. (2019). Resting Muscle Shear Modulus Measured With Ultrasound Shear-

Wave Elastography as an Alternative Tool to Assess Muscle Fatigue in Humans. *Front Physiol, 10*, 626. doi:10.3389/fphys.2019.00626

Siracusa, J., Koulmann, N., & Banzet, S. (2018). Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine. *J Cachexia Sarcopenia Muscle, 9*(1), 20-27. doi:10.1002/jcsm.12227

Siracusa, J., Koulmann, N., Bourdon, S., Goriot, M. E., & Banzet, S. (2016). Circulating miRNAs as Biomarkers of Acute Muscle Damage in Rats. *Am J Pathol, 186*(5), 1313-1327. doi:10.1016/j.ajpath.2016.01.007

Skenderi, K. P., Kavouras, S. A., Anastasiou, C. A., Yiannakouris, N., & Matalas, A. L. (2006). Exertional Rhabdomyolysis during a 246-km continuous running race. *Med Sci Sports Exerc, 38*(6), 1054-1057. doi:10.1249/01.mss.0000222831.35897.5f

Skurvydas, A., Brazaitis, M., Kamandulis, S., & Sipaviciene, S. (2010). Peripheral and central fatigue after muscle-damaging exercise is muscle length dependent and inversely related. *J Electromyogr Kinesiol, 20*(4), 655-660. doi:10.1016/j.jelekin.2010.02.009

Smith, L. L. (1991). Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Med Sci Sports Exerc, 23*(5), 542-551.

Smith, L. L., McKune, A. J., Semple, S. J., Sibanda, E., Steel, H., & Anderson, R. (2007). Changes in serum cytokines after repeated bouts of downhill running. *Appl Physiol Nutr Metab, 32*(2), 233-240. doi:10.1139/h06-106

Sorichter, S., Puschendorf, B., & Mair, J. (1999). Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc Immunol Rev, 5*, 5-21.

Souron, R., Nosaka, K., & Jubeau, M. (2018). Changes in central and peripheral neuromuscular fatigue indices after concentric versus eccentric contractions of the knee extensors. *Eur J Appl Physiol, 118*(4), 805-816. doi:10.1007/s00421-018-3816-0

Spudich, J. A. (2001). The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol, 2*(5), 387-392. doi:10.1038/35073086

Stahl, K., Rastelli, E., & Schoser, B. (2020). A systematic review on the definition of rhabdomyolysis. *Journal of Neurology, 267*(4), 877-882. doi:10.1007/s00415-019-09185-4

Starbuck, C., & Eston, R. G. (2012). Exercise-induced muscle damage and the repeated bout effect: evidence for cross transfer. *Eur J Appl Physiol, 112*(3), 1005-1013. doi:10.1007/s00421-011-2053-6

Strong, J., Unruh, A. M., Wright, A., Baxter, G. D., & Wall, P. D. (2002). *Pain: A Textbook for Therapists* : Churchill Livingstone.

Sugi, H., & Tsuchiya, T. (1981). Enhancement of mechanical performance in frog muscle fibres after quick increases in load. *J Physiol, 319*, 239-252. doi:10.1113/jphysiol.1981.sp013904

Sumien, N., Shetty, R. A., & Gonzales, E. B. (2018). Creatine, Creatine Kinase, and Aging. *Subcell Biochem, 90*, 145-168. doi:10.1007/978-981-13-2835-0_6

Takagi, R., Tabuchi, A., Poole, D. C., & Kano, Y. (2021). In vivo cooling-induced intracellular Ca(2+) elevation and tension in rat skeletal muscle. *Physiol Rep, 9*(13), e14921. doi:10.14814/phy2.14921

Takekura, H., Fujinami, N., Nishizawa, T., Ogasawara, H., & Kasuga, N. (2001). Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. *J Physiol, 533*(Pt 2), 571-583. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0571a.x

Taylor, J. L., & Gandevia, S. C. (2004). Noninvasive stimulation of the human corticospinal tract. *J Appl Physiol (1985), 96*(4), 1496-1503. doi:10.1152/japplphysiol.01116.2003

Temesi, J., Arnal, P. J., Rupp, T., Feasson, L., Cartier, R., Gergele, L., . . . Millet, G. Y. (2015). Are Females More Resistant to Extreme Neuromuscular Fatigue? *Med Sci Sports Exerc, 47*(7), 1372-1382. doi:10.1249/mss.0000000000000540

Temesi, J., Besson, T., Parent, A., Singh, B., Martin, V., Brownstein, C. G., . . . Millet, G. Y. (2021). Effect of race distance on performance fatigability in male trail and ultra-trail runners. *Scand J Med Sci Sports, 31*(9), 1809-1821. doi:10.1111/sms.14004

Tietz, N. W., Shuey, D. F., & Wekstein, D. R. (1992). Laboratory values in fit aging individuals--sexagenarians through centenarians. *Clin Chem, 38*(6), 1167-1185.

Turchinovich, A., Weiz, L., & Burwinkel, B. (2012). Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci, 37*(11), 460-465. doi:10.1016/j.tibs.2012.08.003

Tyloch, D. J., Tyloch, J. F., Adamowicz, J., Juszczak, K., Ostrowski, A., Warsiński, P., . . . Drewa, T. (2018). Elastography in prostate gland imaging and prostate cancer detection. *Med Ultrason, 20*(4), 515-523. doi:10.11152/mu-1655

van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., . . . Olson, E. N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental Cell, 17*(5), 662-673. doi:10.1016/j.devcel.2009.10.013

van Solingen, C., Seghers, L., Bijkerk, R., Duijs, J. M., Roeten, M. K., van Oeveren-Rietdijk, A. M., . . . van Zonneveld, A. J. (2009). Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med, 13*(8a), 1577-1585. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00613.x

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology, 3*(7), RESEARCH0034-RESEARCH0034. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034

Vignier, N., Amor, F., Fogel, P., Duvallet, A., Poupiot, J., Charrier, S., . . . Israeli, D. (2013). Distinctive serum miRNA profile in mouse models of striated muscular pathologies. *PLoS One, 8*(2), e55281. doi:10.1371/journal.pone.0055281

Vincent, H. K., & Vincent, K. R. (1997). The effect of training status on the serum creatine kinase response, soreness and muscle function following resistance exercise. *Int J Sports Med, 18*(6), 431-437. doi:10.1055/s-2007-972660

Wallace, B. C., Small, K., Brodley, C. E., Lau, J., & Trikalinos, T. A. (2012). *Deploying an interactive machine learning system in an evidence-based practice center: abstrackr*. Paper presented at the Proceedings of the 2nd ACM SIGHIT International Health Informatics Symposium, Miami, Florida, USA.

Warburton, D. E., Nicol, C. W., & Bredin, S. S. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *Cmaj, 174*(6), 801-809. doi:10.1503/cmaj.051351

Warren, G. L., Hermann, K. M., Ingalls, C. P., Masselli, M. R., & Armstrong, R. B. (2000). Decreased EMG median frequency during a second bout of eccentric contractions. *Med Sci Sports Exerc, 32*(4), 820-829. doi:10.1097/00005768-200004000-00015

Warren, G. L., Ingalls, C. P., Lowe, D. A., & Armstrong, R. B. (2001). Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. *Exerc Sport Sci Rev, 29*(2), 82-87. doi:10.1097/00003677-200104000-00008

Warren, G. L., Ingalls, C. P., Lowe, D. A., & Armstrong, R. B. (2002). What mechanisms contribute to the strength loss that occurs during and in the recovery from skeletal

muscle injury? *J Orthop Sports Phys Ther, 32*(2), 58-64. doi:10.2519/jospt.2002.32.2.58

Warren, G. L., Lowe, D. A., & Armstrong, R. B. (1999). Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med, 27*(1), 43-59. doi:10.2165/00007256-199927010-00004

Waśkiewicz, Z., Kłapcińska, B., Sadowska-Krępa, E., Czuba, M., Kempa, K., Kimsa, E., & Gerasimuk, D. (2012). Acute metabolic responses to a 24-h ultra-marathon race in male amateur runners. *Eur J Appl Physiol, 112*(5), 1679-1688. doi:10.1007/s00421-011-2135-5

Watanabe, S., Sudo, Y., Kimura, S., Tomita, K., Noguchi, M., Sakurai, H., . . . Yamauchi, Y. (2021). Skeletal muscle releases extracellular vesicles with distinct protein and miRNA signatures that accumulate and function within the muscle microenvironment. *bioRxiv*, 2021.2011.2030.470551. doi:10.1101/2021.11.30.470551

Westing, S. H., Cresswell, A. G., & Thorstensson, A. (1991). Muscle activation during maximal voluntary eccentric and concentric knee extension. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 62*(2), 104-108. doi:10.1007/bf00626764

Whitehead, N. P., Weerakkody, N. S., Gregory, J. E., Morgan, D. L., & Proske, U. (2001). Changes in passive tension of muscle in humans and animals after eccentric exercise. *J Physiol, 533*(Pt 2), 593-604. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0593a.x

Wilke, J., & Behringer, M. (2021). Is "Delayed Onset Muscle Soreness" a False Friend? The Potential Implication of the Fascial Connective Tissue in Post-Exercise Discomfort. *Int J Mol Sci, 22*(17). doi:10.3390/ijms22179482

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol, 11*(3), 228-234. doi:10.1038/ncb0309-228

Wolf, M. R., Fragala, M. S., Volek, J. S., Denegar, C. R., Anderson, J. M., Comstock, B. A., . . . Kraemer, W. J. (2012). Sex differences in creatine kinase after acute heavy resistance exercise on circulating granulocyte estradiol receptors. *Eur J Appl Physiol, 112*(9), 3335-3340. doi:10.1007/s00421-012-2314-z

Wong, V., Spitz, R. W., Bell, Z. W., Viana, R. B., Chatakondi, R. N., Abe, T., & Loenneke, J. P. (2020). Exercise induced changes in echo intensity within the muscle: a brief review. *J Ultrasound, 23*(4), 457-472. doi:10.1007/s40477-019-00424-y

Xiao, G., Zhu, S., Xiao, X., Yan, L., Yang, J., & Wu, G. (2017). Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Hepatology, 66*(5), 1486-1501. doi:10.1002/hep.29302

Xu, J., Fu, S. N., Zhou, D., Huang, C., & Hug, F. (2019). Relationship between pre-exercise muscle stiffness and muscle damage induced by eccentric exercise. *Eur J Sport Sci, 19*(4), 508-516. doi:10.1080/17461391.2018.1535625

Xu, J., Hug, F., & Fu, S. N. (2018). Stiffness of individual quadriceps muscle assessed using ultrasound shear wave elastography during passive stretching. *J Sport Health Sci, 7*(2), 245-249. doi:10.1016/j.jshs.2016.07.001

Yu, J. Y., Jeong, J. G., & Lee, B. H. (2015). Evaluation of muscle damage using ultrasound imaging. *J Phys Ther Sci, 27*(2), 531-534. doi:10.1589/jpts.27.531

Zhang, J., Meng, Q., Zhong, J., Zhang, M., Qin, X., Ni, X., . . . Lan, D. (2020). Serum MyomiRs as Biomarkers for Female Carriers of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Front Neurol, 11*, 563609. doi:10.3389/fneur.2020.563609

Ziaeian, B., & Fonarow, G. C. (2016). Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol, 13*(6), 368-378. doi:10.1038/nrcardio.2016.25

Annexes

I. Protocoles d'analyse biologique

A. Annexe 1 : Extraction des ARNs du plasma

Les extractions d'ARNs du plasma ont été réalisées avec le kit mirVana Paris (Ambion). Les aliquots de plasma étaient progressivement décongelés à 4°C. Un volume de 200 µL était utilisé pour les extractions.

Étape d'extraction organique :

1) 200 µL de plasma étaient mélangés avec un volume égal de *Denaturing Solution*
2) 400 µL d'un mélange de Phénol-Chloroforme étaient ajoutés
3) Vortexer pendant 60 secondes
4) Centrifuger pour séparer la phase aqueuse et la phase organique :
   - 12 000 g
   - 10 minutes
   - Température ambiante
5) Pipetter prudemment 250 µL de la phase aqueuse située en surface et mélanger cette solution avec 312 µL d'éthanol (100 %)

Étape d'extraction sur colonne anionique

6) Transférer la totalité de la solution sur le filtre de la colonne anionique placée sur un tube collecteur
7) Centrifuger :
   - 1 000g
   - 30 secondes
   - Température ambiante
8) Jeter l'éluat. Rincer le filtre de la colonne avec 700 µL de *Wash Solution 1*
9) Centrifuger comme décrit dans l'étape 7
10) Jeter l'éluat. Rincer le filtre de la colonne avec 500 µL de *Wash Solution 2/3*
11) Centrifuger comme décrit dans l'étape 7
12) Répéter les étapes 10) et 11)
13) Jeter l'éluat. Centrifuger à nouveau pour éliminer le fluide résiduel présent sur le filtre :

- 2 000 g
- 60 secondes
- Température ambiante

14) Placer la colonne sur un tube propre. Pipeter 100 µL d'eau stérile chauffée à 95°C sur le filtre de la colonne
15) Centrifuger comme décrit dans l'étape 7)
16) Pipeter 80 µL d'eau stérile sur le filtre de la colonne. Centrifuger comme dans l'étape 7) puis jeter la colonne.

<u>Étape de précipitation des ARNs :</u>

L'étape de précipitation des ARNs est utilisée pour optimiser la quantité et la pureté des ARNs extraits.

17) Ajouter à l'éluat :
    - 18 µL d'acétate de Sodium 3M (Sigma)
    - 396 µL d'éthanol (100%)
    - 1 µL de Glycoblue (Ambion)
18) Vortexer 60 secondes
19) Laisser précipiter l'échantillon pendant au moins 20 min à -20°C
20) Centrifuger :
    - 12 000 g
    - 15 min
    - Température ambiante
21) Éliminer le surnageant et conserver le culot contenant les ARNs
22) Rincer le culot avec 400µl d'éthanol (70%) et remettre le culot en suspension au vortex. Centrifuger :
    - 12 000 g
    - 10 min
    - Température ambiante
23) Éliminer le surnageant en pipetant prudemment un maximum du liquide et en évitant d'aspirer le culot

24) Sécher le culot contenant les ARNs (tube ouvert, 30 min sous une hotte à flux laminaire vertical)

Étape d'élution :

25) Le culot est remis en solution dans 12 µL d'eau stérile par pipetage-refoulement.
26) Incuber la solution d'ARNs dans un bain-marie :
    - 50°C
    - 10 min
27) Congeler à -80°C pour conservation à long terme ou à 4°C si les ARNs sont utilisés dans la journée pour la reverse transcription.

B. Annexe 2 : *Reverse transcription*, synthèse des ADN complémentaires

La synthèse des ADNc des ARNs extraits du plasma a été réalisée avec le kit miRCURY LNA RT (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Étape de préparation de la RT :

1) 5 µL d'ARNs extraits du plasma (dilué au 1/6ème dans de l'eau stérile) étaient mélangées par pipetage-refoulement avec une solution contenant :

- - 2 µL de *reaction buffer*
- - 1 µL d'*enzyme mix*
- - 0,5 µL d'*UniSp6 Spike-in*
- - 1,5 µL de *Nuclease-free water*

Étape de RT :

2) Incuber la solution au bain-marie :
- 42°C
- 60 min
3) Inactiver l'enzyme transcriptase inverse à l'aide d'un bain sec :
- 95°C
- 5 min
4) Refroidir l'échantillon à 4°C pendant 5 min
5) Congeler à -80°C pour une conservation à long terme ou à 4°C si l'analyse par qPCR est réalisée dans la journée.

II. Articles publiés ou en cours de publication

A. Annexe 3 : Étude 1

Appropriateness of indirect markers of muscle damage following lower limbs eccentric-biased exercises: A systematic review with meta-analysis. **Chalchat E,** Gaston AF, Charlot K, Peñailillo L, Valdés O, Tardo-Dino PE, Nosaka K, Martin V, Garcia-Vicencio S, Siracusa J. Soumis dans *PLOS ONE* le 16/03/2022, en révision depuis le 26/04/2022.

Appropriateness of indirect markers of muscle damage following lower limbs eccentric-biased exercises: A systematic review with meta-analysis

Emeric Chalchat[1,2], Anne-Fleur Gaston[3], Keyne Charlot[1,4], Luis Peñailillo[5], Omar Valdés[6], Pierre-Emmanuel Tardo-Dino[1,4], Kazunori Nosaka[7], Vincent Martin[2,8], Sebastian Garcia-Vicencio[1,4*], Julien Siracusa[1,4*]

[1] Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Unité de Physiologie des Exercices et Activités en Conditions Extrêmes, Département Environnements Opérationnels, 91223 Bretigny-Sur-Orge, France

[2] Université Clermont Auvergne, AME2P, F-63000, Clermont-Ferrand, France

[3] Laboratoire Interdisciplinaire Performance Santé Environnement de Montagne, Université de Perpignan

[4] LBEPS, Univ Evry, IRBA, Université Paris Saclay, 91025 Evry, France.

[5] Exercise and Rehabilitation Sciences Laboratory, School of Physical Therapy, Faculty of Rehabilitation Sciences, Universidad Andres Bello, Santiago 7591538, Chile

[6] Exercise Science Laboratory, School of Kinesiology, Faculty of Medicine, Universidad Finis Terrae, Santiago, Chile.

[7] Centre for Exercise and Sports Science Research, School of Medical and Health Sciences, Edith Cowan University, Joondalup, WA, Australia

[8] Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

* Sebastian Garcia-Vicencio and Julien Siracusa authors contributed equally to this work.

Corresponding author:
Emeric Chalchat
E-mail: emchalchat@gmail.com

Short Title: Appropriateness of EIMD markers

ABSTRACT

Purpose: The aim of this review was to (1) characterize the time-course of markers of exercise-induced muscle damage (EIMD) based on the level of maximal voluntary contraction torque loss at 24-48 h post-exercise ($MVC_{loss24\text{-}48h}$), (2) identify factors (*e.g.*, exercise and population characteristics) affecting the level of $MVC_{loss24\text{-}48h}$, and (3) evaluate the appropriateness of EIMD markers as indicators of $MVC_{loss24\text{-}48h}$.

Methods: Magnitude of change of each EIMD markers was normalized using the standardized mean differences method to compare the results from different studies. Time-course of EIMD markers were characterized according to three levels of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ based on a clustering analysis of the 141 studies included. Association between $MVC_{loss24\text{-}48h}$ levels and participant´s characteristics or exercise type/modalities were assessed. Meta-regressions were performed to investigate the associations between $MVC_{loss24\text{-}48h}$ and EIMD markers changes at < 6 h, 24 h, 48 h, 72 h and > 96 h after exercise.

Results: Time-course of EIMD markers recovery differs between levels of $MVC_{loss24\text{-}48h}$. Training status and exercise type/modality were associated with $MVC_{loss24\text{-}48h}$ level ($p < 0.05$). $MVC_{loss24\text{-}48h}$ was correlated to changes in myoglobin concentration (< 6 h), jump height (24 h) and range of motion (48 h) ($p < 0.001$).

Conclusion: As the exercise could differently affect markers as function of the EIMD severity (*i.e.*, $MVC_{loss24\text{-}48h}$ levels), different markers should be used as function of the timing of measurement. Mb concentration should be used during the first hours after the exercise (< 6 h), whereas jump height (24 h) and range of motion (48 h) could be used as surrogate for maximal voluntary contraction later. Moreover, training status and exercise type/modality could influence the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$.

Keywords: lengthening contractions, exercise-induced muscle damage, neuromuscular function, creatine kinase, myoglobin, delayed-onset muscle soreness.

INTRODUCTION

Eccentric biased exercise − where muscles are activated while lengthening − has received considerable interest in the field of health and sports sciences over the last decades. The use of progressive eccentric exercise has been proposed for the treatment of a variety of chronic diseases such as tendinopathies [1], coronary artery disease [2], knee osteoarthritis [3] or for the preservation of muscle mass in chronic obstructive pulmonary disease patients [4]. The implementation of eccentric contractions as a part of resistance training program has also been shown to be beneficial for the improvement of athletic performance through gain of muscle mass, strength, and power [5-7] and useful as an injury prevention/rehabilitation strategy [8]. Despite the benefits of this type of exercise, unaccustomed, strenuous exercise and specially involving lengthening contractions, or with a repetition of stretch-shortening cycles, can alter the ultrastructure of the muscle tissue and induce exercise-induced muscle damage (EIMD) [9].

EIMD is characterized by a prolonged reduction of muscle force and power production which has shown to better represent magnitude of muscle damage when assessed at 24-48 h after exercise [10, 11]. The reduction in muscle function is often accompanied by other indirect markers of muscle damage, which have traditionally been used to quantify magnitude of EIMD that can last from few days to several weeks following exercise. Among indirect markers of muscle damage, the delayed-onset muscle soreness (DOMS), decreased joint range of motion (ROM) as well as increased blood levels of circulating muscle proteins such as creatine kinase (CK) and myoglobin (Mb) are the most frequently reported [10]. These EIMD markers are often measured concomitantly to describe a complex succession of events encompassing several physiological processes such as loss of myofibrillar integrity, connective tissue damage, membrane damage, failure in excitation-contraction coupling, and extracellular matrix remodeling [9-11].

Warren et al. [10], within the limitations of a narrative review approach, published recommendations in which the measurement of muscle strength (*i.e.*, maximal voluntary contraction torque) was raised as the best indirect assessment of the magnitude of EIMD compared to other indirect markers due to its reliability, low cost, accessibility and easy to use [12]. Maximal voluntary contraction (MVC) torque comes closest to evaluating the overall functional contractile capacity of the muscle then has become a great tool in rehabilitation healthcare [12]. Despite the high set of indirect markers reported to assess muscle damage, their usefulness to quantify the magnitude and time-course of EIMD is still under debate, as their responses do not always converge. Since then, numerous studies highlighted an important variability of EIMD markers both in magnitude and time-course, which has limited the interpretation of such changes [11, 13].

Furthermore, as it has already been pointed [11, 13], the discrepancies between markers responses may be partly explained by an important inter-individual variability (age, sex, training status, etc.), the limited sample size, nature of exercise, and muscle groups involved in exercise. Interestingly, a comprehensive synthesis using a systematic and quantitative approach has not been yet performed, making difficult the decision of what is (are) the best marker(s) to monitor EIMD. The evaluation of the appropriateness of the most reported indirect markers of EIMD could be helpful in a sport context to prevent other-related musculoskeletal injuries (*e.g.*, primary lower extremity injury) in the days following the exercise. Furthermore, EIMD is not desired when a clinical population is performing exercise to improve health and adhesion and enjoyment are highly desired to induce long-lasting changes in patients. In this context, it may be of great interest to quantitatively summarize exercise parameters and population characteristics that could influence the magnitude and time course indirect markers of EIMD.

In an attempt to shed light in the complexity, we performed a systematic review and a meta-analysis with the aim to characterize the magnitude and time-course of commonly used indirect markers of EIMD over different levels of muscle function loss at 24-48 h post-exercise (based on the effect size values) by using a classification analysis (clustering) as previously suggested by Damas et al. [13]. The second aim was to identify factors such as exercise parameters and population characteristics affecting the magnitude of muscle strength loss after exercise. Finally, we aimed to evaluate the appropriateness of EIMD markers as indicators of muscle functional deficit.

MATERIALS AND METHODS

Literature search

Five databases including Pubmed, Embase, Web of Science, Cochrane and Scopus were searched using the following terms: (“muscle damage” OR “muscle injury” OR “EIMD”) AND (contraction OR exercise) AND (strength OR MVC OR torque OR force OR “muscle function” OR “neuromuscular function” OR “maximal voluntary contraction”) NOT (“mouse” OR “Mice” OR “rat” OR “animal”) for “English-language” papers from start of records until 29/10/2021. In addition, the literature search was completed with SPORTDiscus that contains theses and dissertations and thereby included “gray literature” (*i.e.*, literature that is difficult to locate or retrieve [14]). This led to the identification of 4,897 potential studies for the initial inclusion for this study (Figure 1).

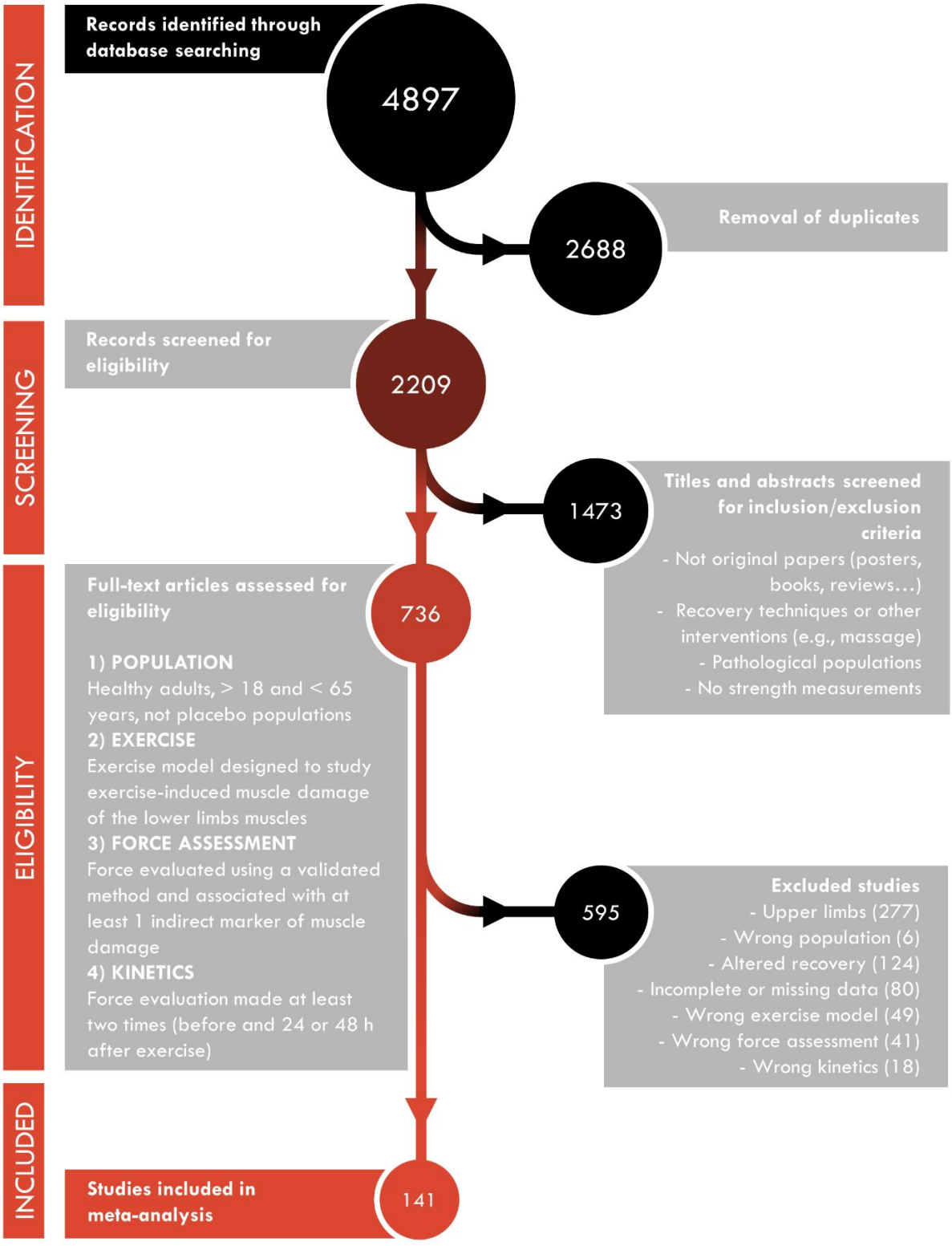


Figure 1. Schematic flowchart of study selection from initial search to the final study inclusion

Selection criteria

After removing 2,688 duplicates, the titles and abstracts of 2,209 articles were screened using the online program Abstrackr (URL: http://abstrackr.cebm.brown.edu/), an open-source tool for systematic reviews [15]. Among the 2,209 abstracts, 1,473 articles were excluded in the first screening based on the criteria listed below, narrowing the number down to 736 articles for full-text review. Studies were eligible for inclusion if they met the following criteria: (1) they implemented a model to study EIMD of the lower limbs muscles in healthy adults (18 – 65 years); (2) the outcome measures included isometric and dynamic articular joint torque using an accurate device at least two time points (before and 24 or 48 h after exercise) combined with the evaluation of at least one other indirect marker of EIMD (*e.g.*, CK, ROM, DOMS); (3) they did not use recovery techniques or other interventions (*e.g.*, massage, icing, nutritional supplementation); and (4) they reported all necessary data to calculate standardized mean differences (SMD) (*i.e.*, absolute value, standard deviation and sample size). Studies were excluded if they presented duplicated data from a previous publication. The present study protocol followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statements [14]. The exclusion criteria are displayed in Figure 1.

Data collection and quality assessment

Included studies (n=141) were randomly distributed to nine reviewers and data were independently extracted from text or tables using a standardized assessment spreadsheet. The following criteria were collected: sample size, sex, age, training level, exercise type, MVC torque and other indirect markers of EIMD values at all available time points. When incomplete or missing data were found, the corresponding authors of the studies were contacted or the required data was extrapolated from figures using ImageJ software (v1.51j8; [16]). Only EIMD markers present in at least five studies were included in the analysis: jump height, ROM, DOMS assessed actively and passively, pain pressure threshold (PPT), limb circumference, mechanical response to peripheral stimulation (evoked torque response), rate of torque development (RTD), voluntary activation level (VAL), CK, Mb, lactate dehydrogenase (LDH), interleukin-6 (IL-6), and transverse relaxation time (T_2) in magnetic resonance imaging (MRI). Due to the large number of studies assessing DOMS using several different methods, they were classified for “active DOMS” (*i.e.*, during a movement), “passive DOMS” (*i.e.*, without movement) and PPT. The quality of the included manuscripts was assessed by the same nine reviewers based on an adapted checklist proposed by Downs & Black [17] (Figure 2).

Coding for studies

The following moderators were coded: sex (male, female, or both), training status based on the training volume (sedentary, active, trained), modality of exercise (eccentric contractions using an isokinetic dynamometer, eccentric/resistance exercise, plyometric exercise, prolonged aerobic exercise, downhill walking/running, neuromuscular electrostimulation, and others) and type of exercise (monoarticular, polyarticular). The time points of measurements were also coded (< 6, 24, 48, 72, > 96 h). Early measurements (*i.e.*, between 0 and 6 h) were grouped as "< 6 h", due to the lack of consistencies in the literature to assess "post-exercise" EIMD markers. In the same way, the delayed measurements assessed between 96 to 168 h were grouped as "> 96 h" due to the relatively small number of assessments at these time points. Each moderator and time points were coded by two independent reviewers. Any disagreement between reviewers was discussed in a consensus meeting, and unresolved items were addressed by a third reviewer for resolution.

Statistical analyses

For all analyses, the statistical significance level was set at $p < 0.05$. SMD [18] (also called "effect size" [19]) and standard error (SE) of MVC torque and other indirect markers of EIMD were calculated for each experimental group at several time points of the measurements. The SMD measure can be used to compare the magnitude of changes of similarly computed measures between studies. Indeed, variable changes between studies cannot be simply compared because these studies may differ in their scales/units of measurement or in their standards for precision of measurement [19]. SMDs were weighted by the inverse of the variance to calculate the overall effect and SE. SMD was calculated as follows:

$$SMD = \frac{Mean_{TP} - Mean_{PRE}}{Pooled\ SD}$$

where TP was the value at the time-point of interest, PRE was the baseline value and SD was the standard deviation. Pooled SD was calculated as follows:

$$Pooled\ SD = \sqrt{\frac{(N_{TP} - 1)\ VARIANCE_{TP} + (N_{PRE} - 1)VARIANCE_{PRE}}{(N_{TP} - 1) + (N_{PRE} - 1)}}$$

where N was the number of participants.

Cohen's criteria were used to interpret the magnitude of the absolute SMD: < |0.50|: small;|0.50| to |0.80|: moderate; and > |0.80|: large [20]. All calculations were carried out with Comprehensive Meta-analysis software (http://www.meta-analysis.com).

A single composite SMD was calculated to estimate the overall effect of changes in MVC torque and other indirect markers at each time point (< 6, 24, 48, 72, > 96 h) [21]. A random-effects model was used because the effect of indirect markers might differ according to the type of exercise, training status, sex or other moderators. This analysis was performed in order to describe the time-course of each indirect marker in response to exercise.

A k-medoids clustering (Partitioning around medoids) was done using R (R Core Team; 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: https://www.R-project.org) and the optimal number of clusters was determined using the NbClust R [22]. This clustering analysis was used to classify 141 experimental groups into 3 categories (clusters) based on the largest reduction in SMD torque at 24-48 h post-exercise ($MVC_{loss24\text{-}48h}$) of each group. Thus, experimental groups were classified as low responders (cluster 1; LOW), moderate responders (cluster 2; MOD) and high responders (cluster 3; HIGH) according to the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (*i.e.*, SMD). Once allocated in the clusters, their respective overall effect (*i.e.*, SMD) in MVC torque and others EIMD markers were calculated at each time point (< 6, 24, 48, 72, > 96 h) using a random-effects model, in order to characterize the magnitude and time-course of commonly used indirect markers of EIMD over different levels of muscle function loss. Positive and negative SMD correspond to an increase and a decrease of indirect markers of EIMD after exercise, respectively. The SMD for each cluster was not calculated for PPT, limb circumference, VAL, RTD, LDH, IL-6 and T_2, due to the lack of experimental groups in at least one cluster.

A Chi-square test of association was performed to investigate the relationship between the level of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (clusters) and the characteristics of participants and exercises (age, sex, training status, exercise type/modality, and muscles involved) represented by the distribution (frequencies) into each cluster (Table 1).

Meta-regressions were performed to investigate the association between the changes in $MVC_{loss24\text{-}48h}$ and changes in indirect markers at each time-point (< 6, 24, 48, 72, > 96 h) (Table 2). A correlation between $MVC_{loss24\text{-}48h}$ and an EIMD marker measured within 6 h post-exercise indicates that this marker could partly predict the $MVC_{loss24\text{-}48h}$, whereas a correlation between $MVC_{loss24\text{-}48h}$ and an EIMD marker measured between 24 h and 48 h indicates that this marker could be used as a surrogate at these time points. Moreover, correlation between $MVC_{loss24\text{-}48h}$ and an

EIMD marker measured later than 48 h post-exercise indicates that this marker is able to retrospectively estimate $MVC_{loss24\text{-}48h}$.

RESULTS

Identified studies: Characteristics and classification into clusters

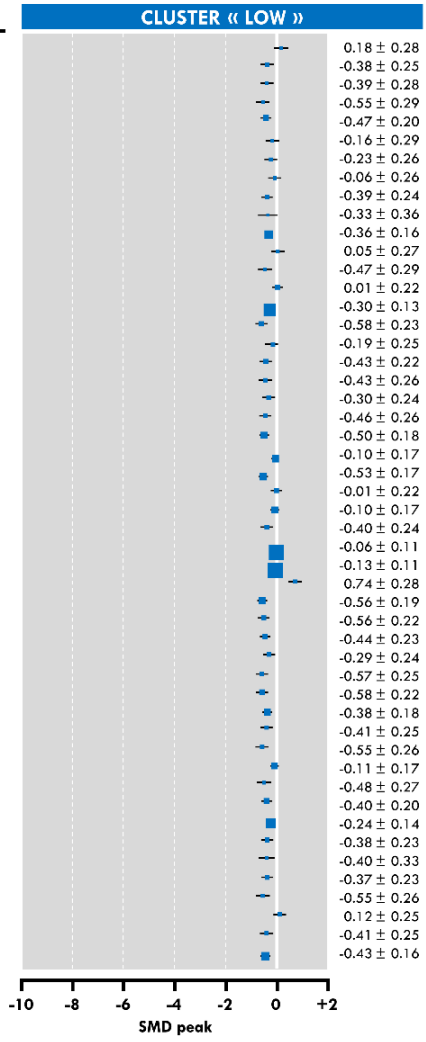
A total of 3,089 participants (24.1 ± 3.5 years old) were computed from the included studies (n=141). Among them, 81% were males and 19% were females. The participants were classified in four training status categories: sedentary (26.9%), active (36.9%), trained (27.7%), and unknown (8.5%). The participants performed different exercises including eccentric contractions using an isokinetic dynamometer (37.6%), eccentric/resistance exercise (22.7%), downhill walking/running (14.9%), plyometric exercise (12.0%), prolonged aerobic exercise (> 45 min; 4.3%), neuromuscular electrostimulation (1.4%) and others (*e.g.*, team sports, intermittent exercise, eccentric cycling) (7.1%). These exercises were classified as monoarticular (47.5%) or polyarticular (52.5%). Monoarticular exercises were performed by knee extensors (80.6%), knee flexors (11.9%), plantar flexors (6.0%) and dorsiflexors (1.5%). Among the 3,089 participants, 2,001 participants were assessed for CK activity (64.8%), 1,974 for active DOMS (63.9%), 760 for passive DOMS (24.6%), 501 for Mb concentration (16.2%), 492 for ROM (15.9%), 486 for jump height (15.7%), 352 for the evoked torque response (11.4%), 247 for VAL (8.0%), 241 for PPT (7.8%), 185 for limb circumference (6.0%), 169 for LDH (5.5%), 154 for RTD (5.0%), 149 for IL-6 (4.8%), 52 for T_2 in MRI (1.7%).

Measurement time points of each indirect marker in response to exercise are described in Figure 3. $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (SMD) values of each group are displayed in Figure 2 for the three clusters: low responders (LOW: SMD center = -0.29 ± 0.03, n = 50), moderate responders (MOD: SMD center = -0.81 ± 0.04, n = 52) and high responders (HIGH: SMD center = -1.81 ± 0.12, n = 39). Time-course changes in each indirect marker of the three clusters are described in Figures 4 and 5. SMD for each cluster was not calculated for PPT, limb circumference, VAL, RTD, LDH, IL-6 and T_2, due to the lack of experimental groups in at least one cluster.

Figure 2. Summary of included experimental groups with forest plot for low (a), moderate (b) and high (c) clusters. QA: Quality assessment; EIMD: exercise-induced muscle damage; Sed: Sedentary; Act: Active; Train: trained; ?: unknown; ECCiso: eccentric contractions using an isokinetic ergometer; Plyo : Plyometric exercise; Resist: Eccentric/resistance exercises; DW/R: downhill walking/running; Prol: prolonged aerobic exercise; NM-ES: Neuromuscular electrostimulation; CK: creatine kinase; DOMS: delayed-onset muscle damage; Mb: myoglobin; ROM: range of motion; JH: jump height; EV: evoked response; PPT: pain pressure threshold; VAL: voluntary activation level; LDH: lactate dehydrogenase; RTD: rate of torque development; LC: limb circumference; IL-6: iterleukin-6; T_2: transverse relaxation time. Data are displayed as standard mean difference (SMD) ± standard error.

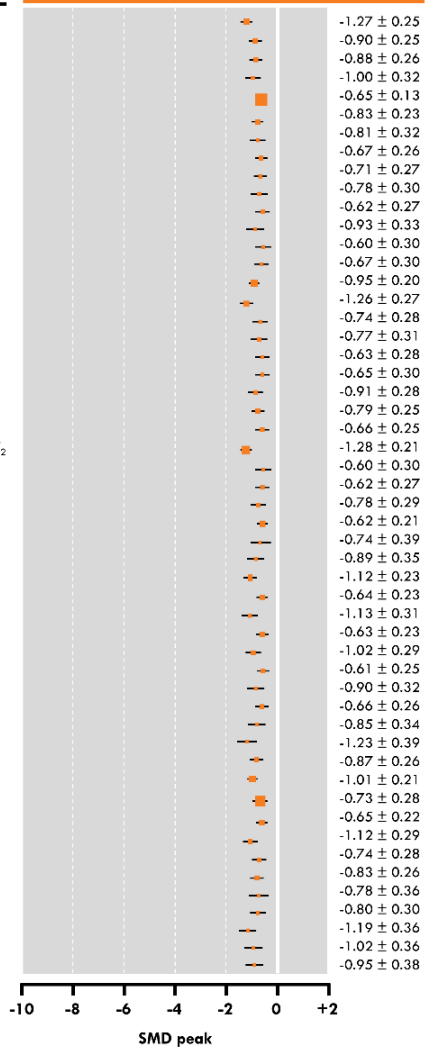
a

		Subjects characteristics				Protocol		
	QA	n	Sex (M or F)	Age (y)	Training status	Exercise type	EIMD markers (outcomes)	
Aldret et al. (2017)	61	8	M	23 ± 2	Train	DW/R	Mb, ROM	0.18 ± 0.28
Apostolopoulos et al. (2018)	68	10	M	25 ± 6	Act	ECCiso	CK, DOMS	-0.38 ± 0.25
Arazi et al. (2016)	71	8	M	21 ± 0	Act	Plyo (F)	CK, DOMS, ROM, JH	-0.39 ± 0.28
Arazi et al. (2016)	71	8	M	20 ± 1	Act	Plyo (S)	CK, DOMS, ROM, JH	-0.55 ± 0.29
Ascensao et al. (2008)	71	16	M	21 ± 1	Train	Other	CK, DOMS, Mb	-0.47 ± 0.20
Avela et al. (1999)	61	7	M/F	29 ± NA	Train	Prol	CK, DOMS, RTD	-0.16 ± 0.29
Banzet et al. (2013)	61	9	M	32 ± NA	Act	DW/R	CK, DOMS, Mb	-0.23 ± 0.26
Banzet et al. (2013)	61	9	M	32 ± NA	Act	Other	CK, DOMS, Mb	-0.06 ± 0.26
Baumann et al. (2014)	75	11	M	28 ± 6	Train	DW/R	CK, DOMS	-0.39 ± 0.24
Baumert et al. (2017)	57	5	M/F	23 ± 4	Sed	ECCiso	DOMS	-0.33 ± 0.36
Black et al. (2016)	76	25	M	23 ± 3	Sed	Resist	DOMS, PPT	-0.36 ± 0.16
Bridgeman et al. (2016)	61	8	M	26 ± 5	Train	Plyo	CK, DOMS, JH	0.05 ± 0.27
Burt et al. (2011)	50	8	M/F	22 ± 3	Act	Plyo	DOMS	-0.47 ± 0.29
Chatzinikolaoau et al. (2010)	68	12	M	23 ± 9	Train	Plyo	CK, JH, LDH, IL-6	0.01 ± 0.22
Chrismas et al. (2017)	75	40	M/F	26 ± NA	Act	DW/R	CK, DOMS, VAL	-0.30 ± 0.13
Coratella et al. (2015)	54	13	M	22 ± 3	Act	Resist	CK, DOMS	-0.58 ± 0.23
Crystal et al. (2013)	75	10	M	21 ± 3	Train	DW/R	DOMS	-0.19 ± 0.25
Dabbs et al. (2018)	54	13	M/F	20 ± 1	Train	Resist	DOMS	-0.43 ± 0.22
Dantas et al. (2019)	82	10	M	33 ± 5	Act	Prol	CK, DOMS	-0.43 ± 0.26
Davies et al. (2018)	61	11	M	23 ± 3	Train	Resist	CK, DOMS, JH	-0.30 ± 0.24
Easthope et al. (2010)	50	10	M	31 ± 7	Train	Prol	CK, EV, LDH	-0.46 ± 0.26
Easthope et al. (2014)	64	20	M/F	35 ± 10	Train	Prol	DOMS	-0.50 ± 0.18
Ferguson et al. (2014)	71	21	M	21 ± 1	Train	Other	CK, DOMS, LDH, IL-6	-0.10 ± 0.17
Giandolini et al. (2015)	68	23	M	39 ± 11	Train	DW/R	DOMS, EV, VAL	-0.53 ± 0.17
Huang et al. (2019)	71	12	M	22 ± 2	Sed	Resist	CK, DOMS, Mb	-0.01 ± 0.22
Joseph et al. (2014)	71	20	M	22 ± 3	Act	DW/R	CK, DOMS	-0.10 ± 0.17
Keane et al. (2015)	50	11	F	22 ± 3	Train	Other	CK, DOMS, JH, LC	-0.40 ± 0.24
Lin et al. (2015)	57	52	M	21 ± 2	Sed	ECCiso (KE)	CK, DOMS, Mb, ROM	-0.06 ± 0.11
Lin et al. (2015)	57	52	M	21 ± 2	Sed	ECCiso (KF)	CK, DOMS, Mb, ROM	-0.13 ± 0.11
Lombard et al. (2012)	68	10	M	22 ± 3	Train	Other	CK, DOMS, ROM	0.74 ± 0.28
Machado et al. (2012)	79	20	M	20 ± 2	Sed	ECCiso	CK, DOMS, PPT	-0.56 ± 0.19
Maeo et al. (2015)	54	14	M/F	21 ± 1	Sed	DW/R	CK, DOMS	-0.56 ± 0.22
Maeo et al. (2017)	79	12	M	24 ± 5	Act	DW/R	CK, DOMS	-0.44 ± 0.23
Maeo et al. (2017b)	71	11	M	29 ± 4	Act	DW/R	DOMS, T_2	-0.29 ± 0.24
Maeo et al. (2017b)	71	11	M	29 ± 4	Act	Resist	DOMS, T_2	-0.57 ± 0.25
Marcora et al. (2007)	79	15	M/F	31 ± 9	Train	Plyo	CK, DOMS, LC	-0.58 ± 0.22
McHugh et al. (2001)	54	20	M/F	NA ± NA	?	ECCiso	DOMS, PPT	-0.38 ± 0.18
Paschalis et al. (2007)	86	10	F	21 ± 10	Sed	ECCiso	CK, DOMS	-0.41 ± 0.25
Peñailillo et al. (2014)	71	10	M	28 ± 8	?	Resist	RTD	-0.55 ± 0.26
Pincheira et al. (2018)	57	20	M/F	25 ± 3	Sed	ECCiso	DOMS, EV	-0.11 ± 0.17
Pournot et al. (2010)	68	9	M	22 ± 5	Train	Plyo	CK, DOMS, JH, LDH	-0.48 ± 0.27
Romero-Moraleda et al. (2017)	71	16	M/F	24 ± 5	Act	Plyo	DOMS	-0.40 ± 0.20
Stultskolehmainen et al. (2014)	71	30	M/F	20 ± 1	Train	Resist	JH	-0.24 ± 0.14
Tékus et al. (2017)	61	12	M	23 ± 7	Train	ECCiso	CK	-0.38 ± 0.23
Thompson et al. (1997)	61	6	F	25 ± 3	Act	Plyo	CK, DOMS, ROM, LC	-0.40 ± 0.33
Tofari et al. (2017)	57	12	M	25 ± 4	Train	Other	CK, JH, EV, VAL	-0.37 ± 0.23
Twist et al. (2011)	61	10	M	24 ± 2	Train	Other	CK, DOMS, JH	-0.55 ± 0.26
Vaczi et al. (2018)	61	10	M	21 ± 2	Train	Plyo	DOMS, EV, VAL, RTD	0.12 ± 0.25
Vilach et al. (2011)	57	10	M	25 ± 3	?	ECCiso	CK, DOMS, RTD	-0.41 ± 0.25
Xu et al. (2018)	68	26	M/F	24 ± 3	Sed	ECCiso	DOMS	-0.43 ± 0.16



b

	QA	Subjects characteristics				Protocol		CLUSTER « MODERATE »
		n	Sex (M or F)	Age (y)	Training status	Exercise type	EIMD markers (outcomes)	
Aminianfar et al. (2011)	68	17	M/F	22 ± 2	Sed	ECCiso	CK, DOMS, LC	-1.27 ± 0.25
Arroyo et al. (2017)	86	13	M	47 ± 4	Act	ECCiso (M-A)	CK, DOMS, Mb	-0.90 ± 0.25
Arroyo et al. (2017)	86	12	M	22 ± 2	Act	ECCiso (Y-A)	CK, DOMS, Mb	-0.88 ± 0.26
Barker et al. (2012)	71	9	M	33 ± 6	Act	Plyo	CK, DOMS	-1.00 ± 0.32
Baumert et al. (2017)	57	40	M/F	23 ± 4	Sed	ECCiso	DOMS	-0.65 ± 0.13
Berhens et al. (2012)	54	15	M/F	27 ± 4	Sed	Resist	EV, PPT, VAL	-0.83 ± 0.23
Black et al. (2015)	79	8	M/F	22 ± 1	Train	ECCiso	DOMS, EV, VAL, RTD	-0.81 ± 0.32
Brown et al. (2016)	61	11	F	19 ± 1	Act	Resist	CK, DOMS, JH, LC	-0.67 ± 0.26
Brown et al. (2016)	61	10	F	20 ± 1	Act	Other	CK, DOMS, JH, LC	-0.71 ± 0.27
Burt et al. (2012a)	82	9	M	26 ± 4	Act	Resist	CK, DOMS, JH	-0.78 ± 0.30
Burt et al. (2012b)	57	10	M	23 ± 3	Act	Resist	CK, DOMS	-0.62 ± 0.27
Burt et al. (2013)	75	8	M	24 ± 2	Train	Resist	CK, DOMS	-0.93 ± 0.33
Burt et al. (2015)	75	8	M	27 ± 4	Train	Resist (H-H)	CK, DOMS	-0.60 ± 0.30
Burt et al. (2015)	75	8	M	26 ± 5	Train	Resist (L-H)	CK, DOMS	-0.67 ± 0.30
Camacho et al. (2020)	71	22	M	21 ± 1	Act	ECCiso	DOMS	-0.95 ± 0.20
Chen et al. (2009)	64	15	M	22 ± 2	Sed	DW/R	CK, Mb	-1.26 ± 0.27
Davies et al. (2011)	61	8	F	24 ± 4	Train	Resist	CK, DOMS, JH	-0.74 ± 0.28
Davies et al. (2018)	50	10	M	22 ± 4	Act	Resist	CK, DOMS	-0.77 ± 0.31
Deschenes et al. (2000)	54	9	M	21 ± 3	Sed	Resist	CK	-0.63 ± 0.28
Dobbin et al. (2016)	61	8	M	23 ± 3	Train	Other	DOMS, JH	-0.65 ± 0.30
Doguet et al. (2019)	64	11	M	27 ± 2	Act	ECCiso	DOMS	-0.91 ± 0.28
Easthope et al. (2010)	50	13	M	46 ± 6	Train	Prol	CK, EV, LDH	-0.79 ± 0.25
Fonda et al. (2015)	86	12	F	21 ± 2	Act	Resist	CK, DOMS, JH, LDH	-0.66 ± 0.25
Fouré et al. (2014)	75	25	M	22 ± 2	Act	NS-ES	CK, DOMS, EV, VAL, RTD, T_2	-1.28 ± 0.21
Gleeson et al. (2013)	64	8	M	21 ± 2	Train	ECCiso	CK, DOMS, ROM	-0.60 ± 0.30
Gordon et al. (2017)	64	10	M	47 ± 4	Act	ECCiso (M-A)	CK, DOMS, Mb, RTD, IL-6	-0.62 ± 0.27
Gordon et al. (2017)	64	9	M	22 ± 2	Act	ECCiso (Y-A)	CK, DOMS, Mb, RTD, IL-6	-0.78 ± 0.29
Guilhem et al. (2016)	54	17	M/F	25 ± 4	Sed	ECCiso	DOMS, ROM	-0.62 ± 0.21
Hasson et al. (1993)	61	5	M	24 ± 4	Act	Resist	PPT	-0.74 ± 0.39
Highton et al. (2009)	61	7	M/F	21 ± 1	Act	Plyo	DOMS	-0.89 ± 0.35
Hody et al. (2013)	54	18	M	23 ± 2	Sed	ECCiso	CK, DOMS	-1.12 ± 0.23
Larsen et al. (2015)	68	14	M/F	26 ± 5	Act	Resist	DOMS, PPT, T_2	-0.64 ± 0.23
MacIntyre et al. (1996)	50	10	F	27 ± NA	Act	ECCiso	CK, DOMS	-1.13 ± 0.31
Maeo et al. (2015)	54	14	M/F	21 ± 1	Sed	DW/R	CK, DOMS	-0.63 ± 0.23
Maeo et al. (2017)	71	11	M	29 ± 4	Act	Resist	DOMS, T_2	-1.02 ± 0.29
Millet et al. (2011)	68	11	M	38 ± 7	Train	Prol	CK, Mb, EV, VAL, LDH	-0.61 ± 0.25
Minahan et al. (2015)	68	8	F	22 ± 3	Act	ECCiso	CK, Mb	-0.90 ± 0.32
Nelson et al. (2004)	61	11	M	28 ± NA	?	DW/R	DOMS, LC	-0.66 ± 0.26
Neverdeen et al. (2014)	61	7	M	25 ± 1	Act	Resist (F)	DOMS	-0.85 ± 0.34
Neverdeen et al. (2014)	61	7	M	25 ± 3	Act	Resist (L)	DOMS	-1.23 ± 0.39
Nikolaidis et al. (2007)	57	12	F	23 ± 2	Sed	ECCiso	CK, DOMS, ROM	-0.87 ± 0.26
Nottle et al. (2005)	79	20	M	28 ± 7	?	DW/R	CK, DOMS, PPT	-1.01 ± 0.21
Oakley et al. (2013)	64	33	M/F	24 ± 4	?	ECCiso	CK, DOMS	-0.73 ± 0.28
Okamoto et al. (2018)	79	15	M	23 ± 3	Sed	Resist	DOMS	-0.65 ± 0.22
Paschalis et al. (2007)	61	12	F	20 ± 4	Sed	ECCiso	CK, DOMS	-1.12 ± 0.29
Pointon et al. (2011)	57	10	M	21 ± 2	Train	Resist	DOMS, EV, PPT, VAL, RTD	-0.74 ± 0.28
Szczyglowski et al. (2017)	79	12	M/F	23 ± 4	Act	ECCiso	DOMS	-0.83 ± 0.26
Tékus et al. (2017)	61	6	M	25 ± 7	Sed	ECCiso	CK	-0.78 ± 0.36
Twist et al. (2008)	61	9	M/F	24 ± 3	?	Plyo	DOMS	-0.80 ± 0.30
Willoughby et al. (2003)	68	8	M	21 ± 3	Sed	Resist	DOMS, IL-6	-1.19 ± 0.36
Yanagisawa et al. (2010)	54	7	M	22 ± 1	Act	ECCiso	DOMS	-1.02 ± 0.36
Yanagisawa et al. (2011)	54	6	M	22 ± 1	Sed	Resist	CK, DOMS, T_2	-0.95 ± 0.38



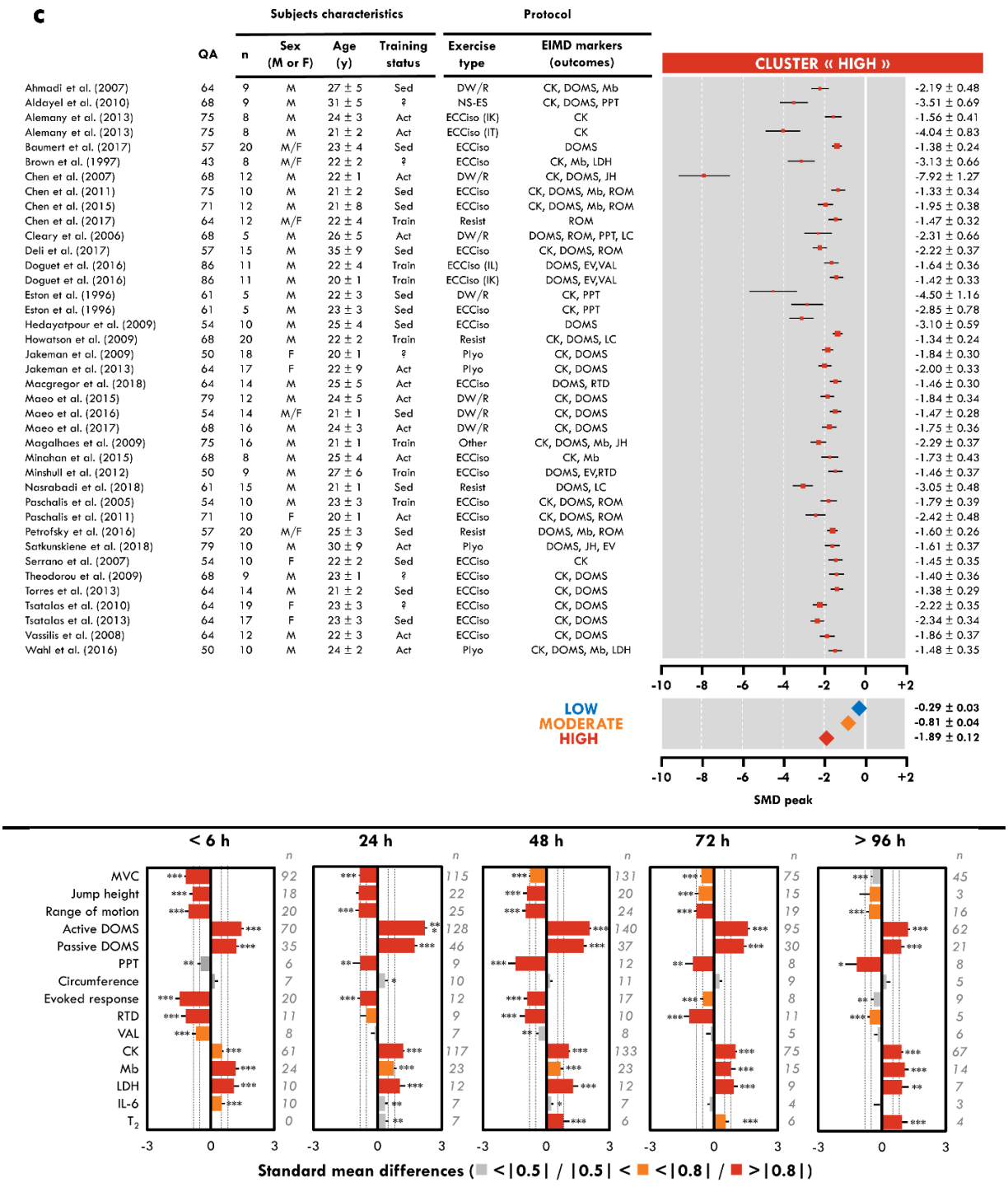


Figure 3. Time-course changes in maximal voluntary contraction (MVC) torque, jump height, range of motion, active delayed-onset muscle soreness (DOMS), passive DOMS, pain pressure threshold (PPT), limb circumference, evoked response, rate of torque development (RTD), voluntary activation level (VAL), creatine kinase (CK), myoglobin (Mb), lactate dehydrogenase (LDH), interleukin-6 (IL-6) and transverse relaxation time (T_2) at < 6 h, 24 h, 48 h, 72 h and > 96 h post-exercise. Data are displayed as mean of standard mean difference (SMD) ± standard error. Grey, orange and red correspond to small (< |0.50|), moderate (|0.50| to |0.80|) and large (> |0.80|) effects, respectively. *: Significant difference from baseline at $p < 0.05$; *: **: Significant difference from baseline at $p < 0.01$; ***: Significant difference from baseline at $p < 0.001$.

Changes in EIMD markers: time-course analysis

Markers of force-generating capacity

MVC torque. As expected, we found that time-course of MVC torque recovery was different between clusters (Figure 4b). MVC torque recovery was faster in the LOW and MOD clusters when compared with the HIGH cluster (Figure 4b). Indeed, a large effect of exercise on MVC torque (SMD = -1.18 ± 0.12) was still observed at 72 h in the HIGH cluster whereas small to moderate effects were found for the other clusters (LOW: SMD = -0.14 ± 0.05; MOD: SMD = -0.50 ± 0.06).

Jump height. Jump height showed greater decrease at 24-48 h post-exercise in the HIGH (SMD = -2.13 ± 0.72) than in the LOW (SMD = -0.47 ± 0.14) and MOD (SMD = -0.68 ± 0.19) clusters after exercise (Figure 4f). Moreover, recovery was faster in LOW and MOD clusters when compared with the HIGH cluster. A large effect of exercise on jump height (SMD = -1.95 ± 0.28) was still observed at 72 h post-exercise in the HIGH cluster, whereas small effects were found for the other clusters (LOW: SMD = -0.44 ± 0.14; MOD: SMD = -0.21 ± 0.29).

Evoked torque response. A significant decrease in the amplitude of the evoked torque response was observed during the days following the exercises (Figure 3; Figure 4c). The decrease at 24-48 h post-exercise was larger for HIGH cluster (SMD = -1.21 ± 0.23) compared to MOD (-0.95 ± 0.23) and LOW (-0.33 ± 0.16) clusters (Figure 4d). The recovery took longer (> 96 h) in the HIGH cluster than MOD and LOW clusters (48 h) (Figure 4d). Indeed, a large effect of exercise on the amplitude of the evoked torque response was still observed at 48, 72 and 96 h post-exercise, whereas small to moderate and no effects were evident for the MOD and LOW clusters, respectively (Figure 4d).

Voluntary activation level. VAL was significantly decreased at < 6 h (SMD = -0.71 ± 0.20) and 48 h (SMD = -0.36 ± 0.11) after the exercise (Figure 3). Time-course of this marker was not analyzed for each cluster due to lack of experimental groups in at least one cluster.

Rate of torque development. A moderate to large decrease of RTD was observed after the exercise (Figure 3). RTD reduction was the largest within 6 hours following exercise (SMD = -1.18 ± 0.24), transiently recovered at 24 h post-exercise (SMD = 0.53 ± 0.28; p = 0.06) and decreased again at 48 h post-exercise (SMD = -1.01 ± 0.26). Time-course of this marker was not analyzed for each cluster due to lack of experimental groups in at least one cluster.

Range of motion

A significant decrease in ROM was observed during the days following the exercises (Figure 3; Figure 4g). However, ROM was significantly reduced only in the MOD and HIGH clusters and the maximum decrease occurred at 48 h post-exercise for these clusters (SMD: -1.14 ± 0.48 and -1.29 ± 0.39, respectively) (Figure 4 h). Moreover, ROM was reduced earlier after the end of the exercise in HIGH cluster (< 6 h) compare to MOD cluster (48 h).

Delayed-onset muscle soreness

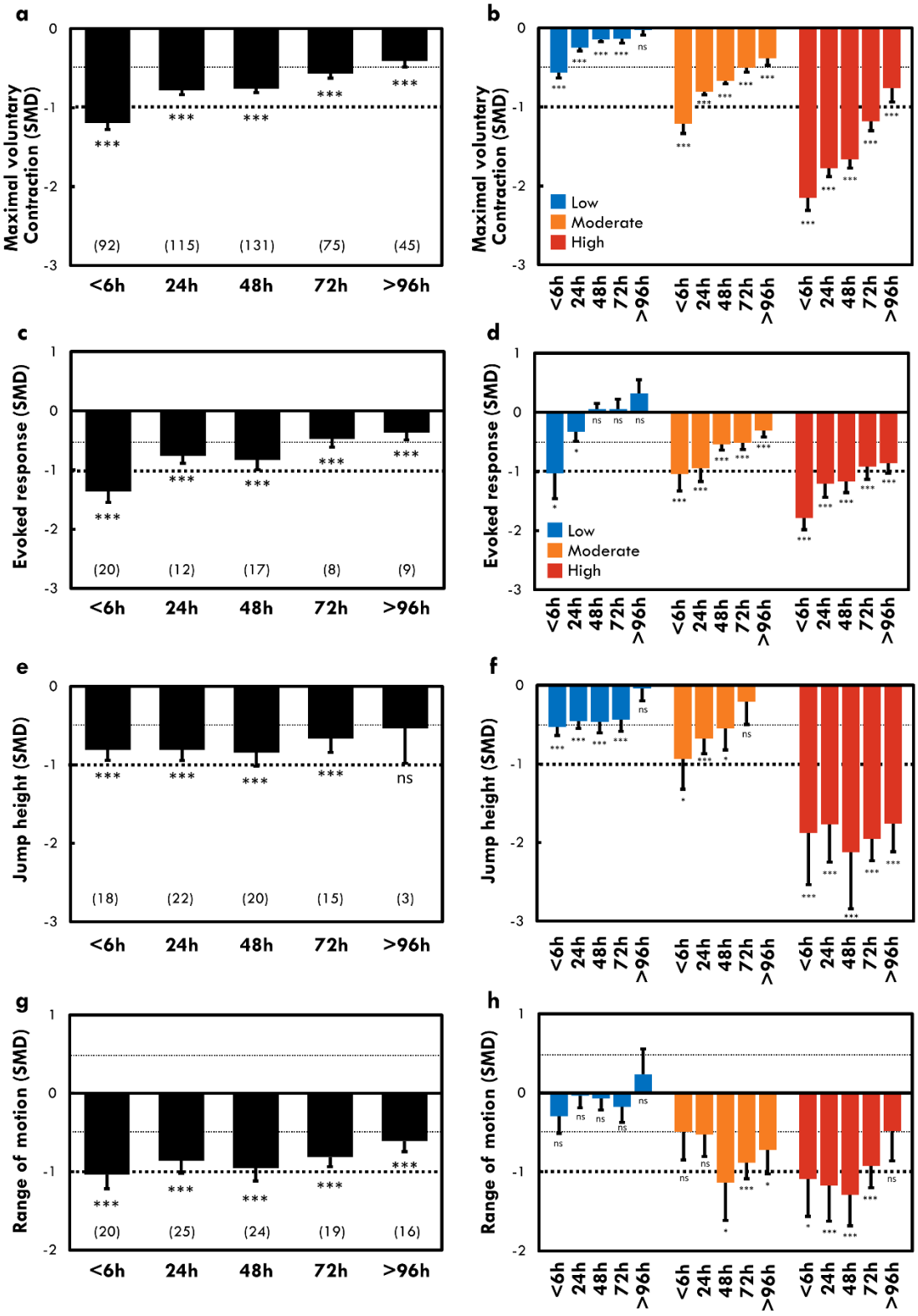
Increase in active and passive DOMS and decrease in PPT were observed and peaked 24 to 48 h after exercise (Figure 3; Figures 5a and 5c). DOMS peaked at 48 h post-exercise in the HIGH cluster but peaked at 24 h post-exercise in the LOW and MOD clusters. Moreover, the recovery was faster for the LOW compared to the MOD and HIGH clusters (Figures 5b and 5d). A large effect of exercise on active/passive DOMS was still observed at 72-96 h post-exercise in the HIGH cluster, whereas small to moderate effects were seen for the other clusters at these time points (Figures 5b and 5d).

Swelling

Limb circumference. A small decrease in limb circumference was observed only at 24 h post-exercise (SMD = 0.35 ± 0.15; Figure 3). Time-course of this marker was not analyzed for each cluster due to lack of experimental groups in at least one cluster.

Transverse relaxation time. T_2 was significantly increased after exercise (Figure 3). Although no study assessed T_2 at < 6 h post-exercise, larger increases in T_2 were observed at 48 to 96 h post-exercise (Figure 3). Time-course of this marker was not analyzed for each cluster due to lack of experimental groups in at least one cluster.

Figure 4. Time-course changes in maximal voluntary contraction torque (a-b), evoked response (c-d), jump height (e-f), and range of motion (g-h) after exercise. Standard mean difference (SMD) and standard error were displayed for all included groups (a, c, e, g) and for three clusters representing three levels of maximal voluntary contraction torque loss (b, d, f, h). Significant differences from baseline (before the damaging exercise) were displayed. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***; $p < 0.001$; ns: non-significant.



Blood markers

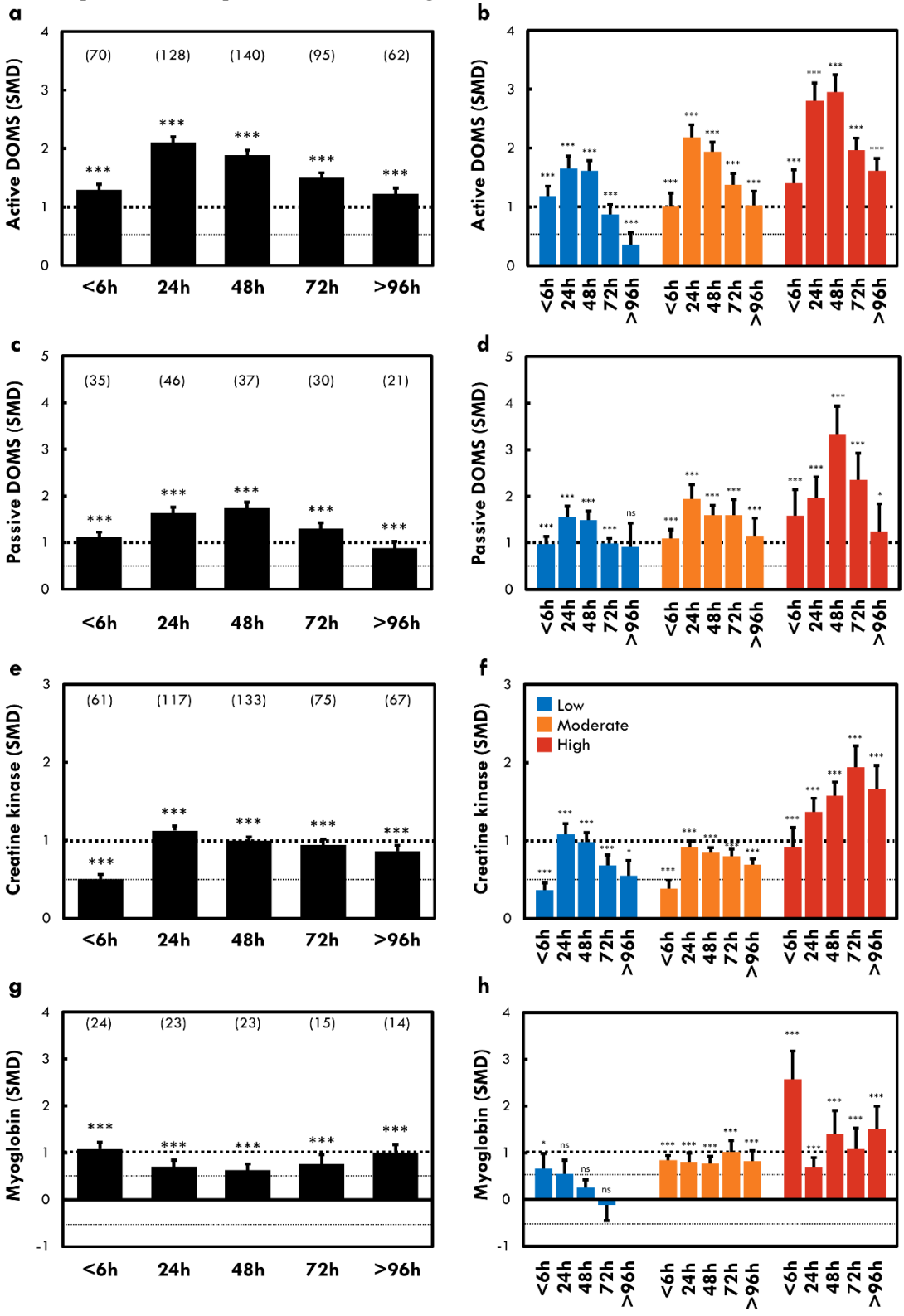
Creatine kinase (CK) activity. CK activity peaked, on average, 24 h post-exercise and remained elevated for up to 96 h post-exercise (Figure 3; Figure 5e). The time-course changes in CK activity differed as a function of clusters (Figure 5f). CK activity peaked 24 h after exercise for the LOW (SMD = 1.08 ± 0.14) and MOD (SMD = 0.92 ± 0.08) clusters and 72 h post-exercise for the HIGH cluster (SMD = 1.94 ± 0.27) (Figure 5f).

Myoglobin (Mb) concentration. Mb concentration peaked, on average, within 6 h and remained elevated for up to 96 h post-exercise (Figure 3; Figure 5g). The time-course of changes in Mb concentration also differed as a function of clusters (Figure 5h). The recovery of Mb concentration was longer in the MOD and HIGH clusters (< 96 h) when compared with the LOW cluster (24 h) (Figure 5h). The maximal Mb concentration was larger for the HIGH cluster (SMD = 2.58 ± 0.60) than the MOD (SMD = 1.01 ± 0.25) and LOW (SMD = 0.66 ± 0.32) clusters.

Lactate dehydrogenase (LDH). LDH activity peaked 48 h post-exercise (SMD = 1.28 ± 0.24; Figure 3) remained elevated for up to 96 h post-exercise (SMD = 0.95 ± 0.31; Figure 3). Time-course of this marker was not analyzed for each cluster due to lack of experimental groups in at least one cluster.

Interleukin-6 (IL-6). Moderate increase in IL-6 concentration was observed < 6 h after exercise (SMD = 0.51 ± 0.15; Figure 3). IL-6 was significantly increased only during the first 2 days following exercise (< 6 h, 24 h and 48 h; Figure 3). Time-course of this marker was not analyzed for each cluster due to lack of experimental groups in at least one cluster.

Figure 5. Time-course changes in active DOMS (a-b), passive DOMS (c-d), creatine kinase (e-f), and myoglobin (G-H). Standard mean difference (SMD) and standard error were displayed for all included groups (a, c, e, g) and for three clusters representing three levels of maximal voluntary contraction torque loss (b, d, f, h). Significant differences from baseline (before the damaging exercise) were displayed. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***; $p < 0.001$; ns: non-significant.



Factors associated with the $MVC_{loss24\text{-}48h}$

The chi-square test of association showed a significant relationship between the level of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (clusters) and the training status ($p < 0.05$), the exercise modality ($p < 0.01$) and the exercise type ($p < 0.01$) (Table 1). Indeed, trained participants were over-represented in the LOW cluster (Table 1a) whereas eccentric contractions using an isokinetic ergometer and monoarticular exercises were over-represented in the HIGH cluster (Table 1b and 1c).

(a)

Cluster*	LOW	MOD	HIGH	Expected
Sedentary	20.0 %	26.9 %	35.9 %	26.9 %
Active	30.0 %	46.2 %	33.4 %	36.9 %
Trained	44.0 %	19.2 %	17.9 %	27.7 %
Unknown	6.0 %	7.7 %	12.8 %	8.5 %
Total	100 %	100 %	100 %	100 %

(b)

Cluster**	LOW	MOD	HIGH	Expected
ECCiso	22.0 %	38.5 %	56.4 %	37.6 %
Plyo	20.0 %	5.8 %	10.3 %	12.0 %
Resist	16.0 %	38.5 %	10.3 %	22.7 %
DW/R	20.0 %	7.7 %	18.0 %	14.9 %
Prol	8.0 %	3.8 %	0.0 %	4.3 %
NM-ES	0.0 %	1.9 %	2.5 %	1.4 %
Other	14.0 %	3.8 %	2.5 %	7.1 %
Total	100 %	100 %	100 %	100 %

(c)

Cluster**	LOW	MOD	HIGH	Expected
Polyarticular	76.0 %	42.3 %	35.9 %	52.5 %
Monoarticular	24.0 %	57.7 %	64.1 %	47.5 %
Total	100 %	100 %	100 %	100 %

Table 1. LOW, MOD and HIGH clusters' characteristics. Distribution of training status (a), exercise modality (b) and exercise type (c). Data are expressed in percentage of total participants (%). Expected values corresponds to the distribution of each characteristic in the whole sample. ECCiso: eccentric contractions using an isokinetic ergometer; Plyo: Plyometric exercise; Resist: eccentric/resistance exercises; DW/R: downhill walking/running; Prol: prolonged aerobic exercise; NM-ES: Neuromuscular electrostimulation. Any significant association between clusters and characteristics are displayed (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

Meta-regression: association between EIMD markers and $MVC_{loss24\text{-}48h}$

The results of the meta-regressions between $MVC_{loss24\text{-}48h}$ and changes in other markers are shown in Table 2.

Associations within 6 h post-exercise

Changes in MVC torque within 6 h post-exercise was significantly correlated ($r^2 = 0.67$; $p < 0.001$) with changes in $MVC_{loss24\text{-}48h}$. Jump height, ROM, active DOMS, limb circumference, VAL and Mb concentration changes observed within 6 hours after exercise (SMD value at < 6 h) were also correlated with the largest changes in $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (Table 2).

Associations between 24 and 48 h post-exercise

Jump height, PPT, limb circumference, amplitude of the evoked torque response, RTD and T_2 changes observed at 24 h post-exercise were correlated with the largest change in $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (Table 2). Similarly, ROM, active/passive DOMS, limb circumference, amplitude of the evoked torque response and T_2 changes observed at 48 h post-exercise were correlated with the largest change in $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (Table 2).

Associations later than 48 h post-exercise

Jump height performance, active/passive DOMS, PPT, limb circumference, evoked torque response, VAL and CK activity changes observed at 72 h post-exercise were correlated with the largest change in $MVC_{loss24\text{-}48h}$. Similarly, active DOMS, evoked torque response and RTD measured at > 96 h post-exercise were correlated with $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (Table 2).

Table 2. Coefficient of determination (r^2) and p-value of meta-regressions between peak reductions in maximal voluntary contraction (MVC) torque and changes in jump height, range of motion, active DOMS, passive DOMS, pain pressure threshold (PPT), limb circumference (circ), evoked response (EV), rate of torque development (RTD), voluntary activation level (VAL), creatine kinase (CK), myoglobin (Mb), lactate dehydrogenase (LDH), interleukin-6 (IL-6) and transverse relaxation time (T_2). Results with a P-value < 0.05 are considered significant and are displayed in bold characters.

Time	< 6 h			24 h			48 h			72 h			> 96 h		
	r^2	p	n	r^2	p	n	r^2	p	n	r^2	p	n	r^2	p	n
Jump Height	0.21	**<0.001**	16	0.40	**<0.001**	19	0.00	0.21	17	0.07	**<0.001**	13	-	-	-
ROM	0.23	**0.01**	12	0.00	0.36	16	0.52	**<0.001**	16	0.02	0.23	12	0.00	0.41	8
Active DOMS	0.03	**0.02**	43	0.00	0.55	62	0.13	**<0.001**	77	0.16	**<0.001**	43	0.28	**<0.001**	26
Passive DOMS	0.00	0.13	26	0.00	0.71	31	0.16	**<0.001**	40	0.22	**0.02**	20	0.00	0.16	10
PPT	0.17	0.24	6	0.13	**0.02**	7	0.05	0.09	10	0.10	**0.02**	6	0.00	0.35	7
Circ.	1.00	**<0.001**	4	0.78	**<0.001**	7	0.82	**0.01**	8	0.76	**0.01**	7	0.31	0.08	4
EV	0.00	0.16	14	0.88	**<0.001**	10	0.91	**<0.001**	12	0.98	**<0.001**	8	1.00	**<0.001**	8
RTD	0.04	0.36	4	0.51	**0.02**	7	0.00	0.42	9	-	-	-	0.95	**<0.001**	5
VAL	0.32	**0.04**	10	0.29	0.29	7	0.00	0.42	10	0.70	**<0.001**	5	0.00	0.83	7
CK	0.02	0.08	37	0.00	0.39	73	0.00	0.61	80	0.21	**<0.001**	49	0.00	0.19	30
Mb	0.47	**<0.001**	15	0.00	0.26	15	0.09	0.30	16	0.00	0.14	10	0.00	0.93	7
LDH	0.00	0.52	5	0.00	0.40	8	0.00	0.52	8	0.00	0.77	7	-	-	-
IL-6	0.00	0.46	5	0.00	0.62	5	0.46	0.13	5	-	-	-	-	-	-
T_2	-	-	-	1.00	**<0.001**	5	1.00	**<0.001**	6	1.00	0.10	4	-	-	-

DISCUSSION

This study was the first to quantitatively review the magnitude and time-course of the most common indirect markers of EIMD and cluster them based on levels of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ following lower limb eccentric-biased exercises. This approach was applied to an extensive dataset from 141 studies employing various exercise modalities and participant characteristics. Firstly, three different time-courses were identified, corresponding to three levels of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (LOW, MOD, HIGH) for commonly used EIMD markers (*e.g.*, CK activity, Mb concentration, DOMS, ROM). For instance, magnitude of changes is greater and recovery slower in HIGH cluster compare to other clusters for MVC torque, evoked torque response, jump height, Mb concentration and the peak may also be reached later in HIGH cluster compare to other clusters for DOMS and CK activity. Secondly, we showed that some factors such as training status and exercise type/modality partly explain the level of $MVC_{loss24\text{-}48h}$. For instance, eccentric contractions using an isokinetic dynamometer and monoarticular exercises induced larger $MVC_{loss24\text{-}48h}$ than other exercises modalities and polyarticular exercises, respectively. Thirdly, some EIMD markers could serve as

surrogate (*e.g.*, jump height, evoked torque response) to MVC or are suitable to partly estimate (*e.g.*, Mb) the level of $MVC_{loss24\text{-}48h}$.

Changes in EIMD markers: time-course analysis

Markers of force-generating capacity

The results of the present study showed that the larger the $MVC_{loss24\text{-}48h}$ of the lower limb muscles, the longer the recovery (Figure 4b). This is consistent with Damas et al. [13] that reported time-course differences between three clusters computed from individual MVC torque loss after maximal eccentric exercise of the elbow flexors. The MVC torque recovery time-course is also consistent with a previous review by Paulsen et al. [11] who showed a longer recovery after "severe damage" compared to "mild" or "moderate" EIMD based on the MVC torque loss. Interestingly, we also found that the larger the $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (*i.e.*, the larger EIMD), the longer the evoked torque response and jump height recovery. Unfortunately, we were unable to compare time-course of VAL and RTD at different levels of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ due to lack of studies assessing these markers in at least one cluster. However, we found that VAL was decreased during the first hours after the exercise (< 6 h) and at 48 h post-exercise. RTD, a measure of ability of the neuromuscular system to rapidly produce torque during MVC, was decreased in the first hours following exercises (< 6 h), but also 48 to 96 h post-exercise. As the ability of neural drive to activate muscle (*i.e.*, VAL) was not affected 72 and 96 h after exercise in the present study, it could be speculated that the decreased RTD at these time points was likely due to peripheral factors. Consistently, it has been suggested [23, 24] that early phase RTD reflects neural mechanisms underlying exercise-induced torque loss, while late RTD may describe the same physiological mechanisms as MVC torque loss. The results of evoked torque response and VAL confirmed that MVC torque loss observed the hours/days after an EIMD event are due to peripheral (*i.e.*, muscular) and central (*i.e.*, nervous) alterations of the neuromuscular system. Moreover, we confirmed that recovery process to reestablish the force-generating capacity after a training session or an exercise intervention must be individually adapted as a function of extent of $MVC_{loss24\text{-}48h}$.

DOMS, ROM, and Swelling

The present review confirmed that both passive and active DOMS peaked between 24 and 48 h after exercise, and showed that the greater the $MVC_{loss24\text{-}48h}$, the later the peak of DOMS occurs. Indeed, we found that DOMS peaked at 24 h after the exercise for LOW and MOD clusters, whereas it peaked at 48 h post-exercise for HIGH cluster. These results were not consistent with those reported by Damas et al. [13] who found that DOMS peaked 48 h after eccentric exercise of the

elbow flexors, regardless of the level of MVC torque loss. These discrepancies could be due to the large type of exercise modalities, muscle groups and study designs included into the analysis in the present review, which differ from the specific model used by Damas et al. [13]. However, it is difficult to fully explain the delayed peak of DOMS after severe EIMD due to a complex etiology of pain [25]. For instance, muscle inflammation due to white cells infiltration (*i.e.*, macrophages) [11] and intramuscular fluid pressure [26] due to muscle swelling could be different as function of the level of $MVC_{loss24\text{-}48h}$, inducing different time-courses of DOMS. Our results showed a small increase of limb circumference at 24 h post-exercise, whereas larger T_2 MRI imagining elevation was observed 24 to 96 h post-exercise. As Damas et al. [13] reported that eccentric exercise of the elbow flexors induce an increase in limb circumference up to 120 h regardless of the level of $MVC_{loss24\text{-}48h}$, it could be speculated that this marker is more sensitive in upper limbs than lower limbs. Our results showed that ROM was not reduced the days after the exercises for the LOW cluster, while ROM decreased greatly at 48 h post-exercise for the MOD and HIGH clusters. Moreover, ROM was decreased within few hours (< 6 h, 24 h) following exercise only in the HIGH cluster. In a clinical or sport context, reproducible, cheap, quickly and easy to use evaluations are important in order to provide a rapid and quantitative diagnosis of the impact of the exercise on the whole muscle system functionality. It could be suggested the assessment of limb circumference could be most appropriate and give more information about muscle swelling or EIMD when the damage is induced on the upper limbs muscles [9, 13]. Moreover, it seems that changes in muscle-tendon stiffness and the presence of edema represented by the measure of ROM [27] could be appear earlier (within the hours after exercise) and stay high longer (72 h) after severe EIMD.

Blood markers

Contrary to the above-mentioned indirect markers, circulating blood markers provide a whole body systemic information regarding EIMD. Indeed, when muscle fibers are damaged or permeability of sarcolemma is increased, intramuscular components are released into the extracellular space and bloodstream. Therefore, the increase in level of circulating markers has been often used to quantify EIMD [10, 28]. In the present study, an increase in CK and LDH activities and Mb concentrations were observed the days after the exercises, but with different time-courses, as already reported elsewhere [29, 30]. Because CK is cleared by the reticuloendothelial system and Mb is cleared through the liver and kidney [31], differences in time-course could be different among these blood markers. Moreover, Muslimovic et al. [31] reported a new mechanism of clearance through muscle cell endocytosis that could bring a new light to this phenomenon. While we found that peak of CK activity was not necessarily larger in HIGH cluster compared to LOW and MOD

clusters the hours after the exercise, we found that CK activity peaked at 24 h post-exercise for the LOW and MOD clusters and at 72 h post-exercise for the HIGH cluster. Even though CK is largely used in the literature and in clinical practice, this marker does not seem to be sensitive to EIMD in the first hours after the damaging exercise. In line with Lippi et al. [30], the time-course of changes in Mb concentration after low EIMD (LOW cluster) showed a rapid increase and return to baseline within hours (< 24 h) after the exercises. However, Mb levels could remain elevated for some days after exercise after moderate to severe EIMD (MOD and HIGH). The persistent elevation in Mb and CK the days after exercise in HIGH cluster could be at least partly explained by a secondary release of the myocyte content of CK and Mb the days after the end of the exercise. Indeed, it has been reported that secondary muscle damage and fiber necrosis could occur due to the loss of Ca^{2+} homeostasis and inflammatory process [11, 32]. The time-course of blood markers could inform on the muscle state during the days after the exercise since the peak of CK activity was delayed (from 24 h to 72 h) and Mb could remain elevated and after severe EIMD. It could be that the recovery of sarcolemma integrity is dependent of the level of EIMD. This has practical implications for the diagnosis of EIMD after exercise by focusing not only on the amplitude of the blood markers but also on their time-course.

Recommendations

Some discordance or asynchrony exists among EIMD markers. After severe EIMD (*i.e.*, high level of $MVC_{loss24\text{-}48h}$), Mb concentration peaks at 6 h post-exercice, whereas ROM and DOMS peaked at 48 h and CK at 72 h post-exercise, suggesting that the presence of high level of EIMD should be highlighted by different markers as function of the timing of measurement.

Factors affecting $MVC_{loss24\text{-}48h}$

Our results showed that the training level was a determinant of the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (Table 1). Indeed, this is consistent with Ertel et al. [33] who reported that untrained participants experienced greater EIMD symptoms than trained individuals. The present study also showed that eccentric contractions using an isokinetic ergometer resulted in larger $MVC_{loss24\text{-}48h}$ when compared to other exercises. Similarly, we found that monoarticular exercises induced larger $MVC_{loss24\text{-}48h}$ when compared to polyarticular exercises. This could be explained by the high proportion of monoarticular exercises performed at high intensity over a large range of motion using an isokinetic ergometer. Indeed, it has been shown that exercise intensity [34] and exercise range of motion [35, 36] are dominant factors affecting the magnitude of changes in EIMD markers (*e.g.* MVC torque loss). Unfortunately, it was impossible to compare the intensity of all the exercise models included

in the present study due to the heterogeneity of the exercise types and the lack of information on the intensity of exercise in some studies. Our results regarding monoarticular and polyarticular exercises, were in line with Paulsen et al. [11] who stated that isolated eccentric muscle actions cause larger decreases in muscle function compared with eccentric-biased exercise (*e.g.*, downhill running).

The methodological process of the present study revealed the lack of information regarding the participants and exercise model characteristics in many studies. Several participants' characteristics such as age, sex, height, weight, training volume and type of exercise should be systematically and accurately reported. Similarly, several exercise parameters such as exercise intensity, duration and volume should be more clearly reported. If applicable, it is also important to report the mode and the velocity of muscle contraction, and the joint angle and the range of motion at which the contraction was performed. A better understanding of factors involved in the exercise could be helpful to better anticipate the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ and better adapt recovery strategy and training loads of athletes. For instance, the more the subject is trained, the lower the EIMD and lesser the time to reestablish the muscle function between two mechanical stimuli.

EIMD markers reflecting $MVC_{loss24\text{-}48h}$

In order to evaluate whether EIMD markers could be used as indicators of muscle functional deficit, we compared the responses of these markers with the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ by performing meta-regressions. Our results showed some significant associations between the responses of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ and other EIMD markers. These results suggest that some EIMD markers are suitable to partly predict (*e.g.*, Mb) whereas other markers could be used as surrogate (*e.g.*, evoked torque response, jump height) to the measurement of $MVC_{loss24\text{-}48h}$.

Markers of force-generating capacity

A significant correlation was found between $MVC_{loss24\text{-}48h}$ and evoked torque response changes at 24, 48, 72 and > 96 h post-exercise (Table 2), suggesting that the amplitude of the evoked torque response could be used as a surrogate of the MVC torque without the necessity to perform maximal efforts. A significant correlation was also found between jump height loss at 24 h post-exercise and $MVC_{loss24\text{-}48h}$ ($r^2 = 0.40$), suggesting that jump height could be a practical, cheap and reliable alternative to evaluate the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$. (*i.e.*, the magnitude of EIMD). However, the early changes (< 6 h) of both the evoked torque response and jump height were poorly associated with $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (Table 2). It is likely that early measurements of muscle function reflect the combined influence of metabolic fatigue and muscle damage [11], therefore explaining the poor

correlation with the $MVC_{loss24\text{-}48h}$. Indeed, while we observed a better association of MVC torque loss at < 6 h with $MVC_{loss24\text{-}48h}$ than with early evoked response and jump height (< 6 h), early MVC measurement does not seem to fully explain the observed $MVC_{loss24\text{-}48h}$ ($r^2 = 0.67$), likely due to metabolic/central fatigue. We found that the VAL decrease within 6 hours after exercises was associated with the $MVC_{loss24\text{-}48h}$, suggesting that the (in)-ability to voluntarily activate the motor units in the early phase after the exercise could partly predict the $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (*i.e.*, indicate the magnitude of EIMD). However, early (< 6 h) decrease in VAL is largely affected by muscle fatigue [37], limiting the use of this marker to predict the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$. The presence of DOMS, swelling and inflammation at 48 h post-exercise in the present study could also be involved in the reduction of VAL observed 48 h after the exercise due to the sensitivity of group III-IV afferent fibers to nociceptive and mechanical (pressure) stimuli [37]. However, our results showed that the decrease in VAL at 48 h post-exercise was small, limiting its effect on the decrease in muscle function at this time-point. RTD, a measure of the ability of the neuromuscular system to rapidly produce torque during MVC, was decreased in the first hours following exercises (< 6 h), but also 48 to 96 h post-exercise. Among these time-point, only a correlation between RTD at 96 h post-exercise and $MVC_{loss24\text{-}48h}$ was found. Therefore, the present results were inconsistent with Penailillo et al. [24] who found that RTD at the 100-200 ms slot could be used as an early and sensitive marker of EIMD. These conflicting results could be explained by the different methods (early 0-50 vs late 100-200 ms windows) used to assess RTD. To sum up, jump height loss could be a practical, cheap and reliable alternative to evaluate the muscle function loss in EIMD context. Moreover, evoked torque response could be used as a surrogate of the MVC torque and allow to assess muscle function without the necessity to perform maximal efforts.

DOMS, ROM, and Swelling

We found that DOMS (active/passive DOMS and PPT) was poorly associated with the $MVC_{loss24\text{-}48h}$, suggesting that DOMS should not be used to evaluate the magnitude of EIMD. On the contrary, a correlation was found between ROM changes at 48 h post-exercise and the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$, suggesting that ROM could also be used as an indirect marker to partly indicate the magnitude of EIMD at this time point. Despite the small elevation of limb circumference, associations were found between limb circumference changes at several time points post-exercise and the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (Table 2). This is consistent with Damas et al. [13] who found a correlation between MVC torque loss and arm circumference after eccentric exercise of the elbow flexors. Moreover, we found an association between T_2 increase at 24-48 h post-exercise and MVCloss 24-48 h. Thus, T_2 seems to be suitable for evaluating the EIMD only after

24 h post-exercise. Our results should nevertheless be interpreted with caution due to the small number of studies assessing limb circumference and T_2 MRI on the lower limbs.

Blood markers

Regarding systemic indirect markers of EIMD, only Mb concentration seems to early (< 6 h post-exercise) estimate the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ (Table 2). Although CK activity in blood is the most often used marker, it may not be suitable to accurately predict the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$. Indeed, this marker partly reflects the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$ only 72 h post-exercise. Similarly, the lack of correlation between change in LDH activity and $MVC_{loss24\text{-}48h}$ suggests that LDH measurement is not useful for the evaluation of the magnitude of EIMD, likely due to the non-specificity of LDH to myocytes [38]. Despite the small to moderate increase of IL-6 concentration the days after the exercises (Figure 3), this marker was not correlated to the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$. This suggests that IL-6 concentration is not useful for the estimation of the magnitude of EIMD. These observations are consistent with those of Paulsen et al. [11] and Reihmane & Dela [39] who reported that discrepant changes in IL-6 concentrations among studies were explained by different exercise protocols and training status of the participants. Moreover, this large variability observed in the marker after eccentric exercise could be due to the various role of IL-6 in response to muscle contractions [40].

Recommendations

Among the most common used EIMD markers, Mb concentration or MVC torque loss should be used during the first hours after the exercise (< 6 h), even if these markers only partly predict the $MVC_{loss24\text{-}48h}$ due to high inter-individual variability and metabolic fatigue. MVC torque loss should be used beyond 24 h after the exercise, however, jump height loss and evoked torque response could be surrogates to this measure at these times points. It should be noted that ROM could be an easy and inexpensive alternative when the measure is performed 48 h after the exercise. Finally, the assessment of CK activity seems to be suitable only at 72 h post exercise to provide information on the muscle function.

Limitations

A few points may have influenced our results and deserve consideration. Firstly, the use of group values rather than individual values could limit the interpretation of the individual variability. Secondly, the assessment of EIMD markers was not always reported for all measurement time points, which limits the interpretation of the time-course changes in these markers, especially for the less frequently assessed markers. The fact that we reviewed only EIMD markers present in at

least five studies and that we cannot characterize the time-course for each cluster for some markers, our analysis was limited to the most common used markers. Thirdly, majority of the studies included mainly males (81%), limiting the interpretation of the present results for females. Indeed, it has been shown that muscle function is less affected in female than male after an eccentrically-biased exercise [41]. The lower susceptibility of female to EIMD could be explained by several factors such as the smaller absolute MVC torque [42] or the role of sex hormones [43], but more studies should be performed in order to clarify this.

CONCLUSION

The present review was the first to examine the recovery time-course of the most frequently reported indirect markers of EIMD for different levels of $MVC_{loss24\text{-}48h}$. As some discordance or asynchrony exists among the most common used EIMD markers, different markers should be used as function of the timing of measurement. Mb concentration or MVC torque loss should be used during the first hours after the exercise (< 6 h), even if these markers only partly predict the $MVC_{loss24\text{-}48h}$. Jump height loss and evoked torque response could be used as surrogate of the MVC torque loss. ROM could be an easy and inexpensive alternative when the measure is performed 48 h after the exercise, whereas the assessment of CK activity seems to be suitable only at 72 h post-exercise to provide information on the muscle function. Moreover, factors such as training status and exercise type/modality (*e.g.* monoarticular exercise, eccentric contractions using an isokinetic ergometer) could affect the magnitude of $MVC_{loss24\text{-}48h}$, and therefore affect the time to reestablish the muscle function between two mechanical stimuli.

Acknowledgments

We sincerely thank all support from all authors.

Authors' contributions

EC, AG, JS, SGV, LP and VM designed the research and wrote the manuscript. All authors collected the data. EC, AG, JS and SGV analyzed the data. EC and KC designed the figures. EC, AG, JS, SGV, LP, VM, KC, KN contributed to the interpretation of the data and revising the manuscript.

REFERENCES

1. Ortega-Castillo M, Medina-Porqueres I. Effectiveness of the eccentric exercise therapy in physically active adults with symptomatic shoulder impingement or lateral epicondylar tendinopathy: A systematic review. Journal of science and medicine in sport. 2016;19(6):438-53. Epub 2015/08/26. doi: 10.1016/j.jsams.2015.06.007. PubMed PMID: 26304796.
2. Gremeaux V, Duclay J, Deley G, Philipp JL, Laroche D, Pousson M, et al. Does eccentric endurance training improve walking capacity in patients with coronary artery disease? A randomized controlled pilot study. Clin Rehabil. 2010;24(7):590-9. Epub 2010/06/10. doi: 10.1177/0269215510362322. PubMed PMID: 20530649.
3. Hernandez HJ, McIntosh V, Leland A, Harris-Love MO. Progressive Resistance Exercise with Eccentric Loading for the Management of Knee Osteoarthritis. Frontiers in medicine. 2015;2:45. Epub 2015/07/29. doi: 10.3389/fmed.2015.00045. PubMed PMID: 26217665; PubMed Central PMCID: PMCPMC4497310.
4. Inostroza M, Valdés O, Tapia G, Núñez O, Kompen MJ, Nosaka K, et al. Effects of eccentric vs concentric cycling training on patients with moderate COPD. European journal of applied physiology. 2022;122(2):489-502. Epub 2021/11/21. doi: 10.1007/s00421-021-04850-x. PubMed PMID: 34799753.
5. Harris-Love MO, Gollie JM, Keogh JWL. Eccentric Exercise: Adaptations and Applications for Health and Performance. J Funct Morphol Kinesiol. 2021;6(4). Epub 2021/11/30. doi: 10.3390/jfmk6040096. PubMed PMID: 34842737; PubMed Central PMCID: PMCPMC8628948.
6. Roig M, O'Brien K, Kirk G, Murray R, McKinnon P, Shadgan B, et al. The effects of eccentric versus concentric resistance training on muscle strength and mass in healthy adults: a systematic review with meta-analysis. British journal of sports medicine. 2009;43(8):556-68. Epub 2008/11/05. doi: 10.1136/bjsm.2008.051417. PubMed PMID: 18981046.
7. McNeill C, Beaven CM, McMaster DT, Gill N. Eccentric Training Interventions and Team Sport Athletes. J Funct Morphol Kinesiol. 2019;4(4). Epub 2019/09/27. doi: 10.3390/jfmk4040067. PubMed PMID: 33467382; PubMed Central PMCID: PMCPMC7739426.
8. LaStayo P, Marcus R, Dibble L, Frajacomo F, Lindstedt S. Eccentric exercise in rehabilitation: safety, feasibility, and application. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 2014;116(11):1426-34. Epub 2013/07/05. doi: 10.1152/japplphysiol.00008.2013. PubMed PMID: 23823152.
9. Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induced muscle damage in humans. American journal of physical medicine & rehabilitation. 2002;81(11 Suppl):S52-69. doi: 10.1097/01.PHM.0000029772.45258.43. PubMed PMID: 12409811.
10. Warren GL, Lowe DA, Armstrong RB. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. Sports medicine. 1999;27(1):43-59. Epub 1999/02/24. doi: 10.2165/00007256-199927010-00004. PubMed PMID: 10028132.
11. Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? Exercise immunology review. 2012;18:42-97. Epub 2012/08/11. PubMed PMID: 22876722.
12. Abernethy P, Wilson G, Logan P. Strength and power assessment. Issues, controversies and challenges. Sports medicine. 1995;19(6):401-17. Epub 1995/06/01. doi: 10.2165/00007256-199519060-00004. PubMed PMID: 7676101.
13. Damas F, Nosaka K, Libardi CA, Chen TC, Ugrinowitsch C. Susceptibility to Exercise-Induced Muscle Damage: a Cluster Analysis with a Large Sample. International journal of sports medicine. 2016;37(8):633-40. Epub 2016/04/27. doi: 10.1055/s-0042-100281. PubMed PMID: 27116346.
14. Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. Syst Rev. 2015;4:1. Epub 2015/01/03. doi: 10.1186/2046-4053-4-1. PubMed PMID: 25554246; PubMed Central PMCID: PMCPMC4320440.
15. Wallace BC, Small K, Brodley CE, Lau J, Trikalinos TA. Deploying an interactive machine learning system in an evidence-based practice center: abstrackr. Proceedings of the 2nd ACM SIGHIT International Health Informatics Symposium; Miami, Florida, USA: Association for Computing Machinery; 2012. p. 819–24.
16. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):671-5. Epub 2012/08/30. doi: 10.1038/nmeth.2089. PubMed PMID: 22930834; PubMed Central PMCID: PMCPMC5554542.
17. Downs SH, Black N. The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomised and non-randomised studies of health care interventions. J Epidemiol Community

Health. 1998;52(6):377-84. Epub 1998/10/09. doi: 10.1136/jech.52.6.377. PubMed PMID: 9764259; PubMed Central PMCID: PMCPMC1756728.
18. Hedges LV. Distribution Theory for Glass's Estimator of Effect size and Related Estimators. Journal of Educational and Behavioral Statistics. 1981;6(2):107-28.
19. Faraone SV. Interpreting estimates of treatment effects: implications for managed care. P T. 2008;33(12):700-11. PubMed PMID: 19750051.
20. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates; 1988.
21. Borenstein M, Hedges L, Higgins J, Rothstein H. An Introduction to Meta-Analysis. Introduction to Meta-Analysis. 2009;19. doi: 10.1002/9780470743386.
22. Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M, Hornik K. Cluster: cluster analysis basics and extensions. R package version. 2012;1(2):56.
23. Jenkins, Housh TJ, Traylor DA, Cochrane KC, Bergstrom HC, Lewis RW, et al. The rate of torque development: a unique, non-invasive indicator of eccentric-induced muscle damage? International journal of sports medicine. 2014;35(14):1190-5. Epub 2014/09/27. doi: 10.1055/s-0034-1375696. PubMed PMID: 25259592.
24. Penailillo L, Blazevich A, Numazawa H, Nosaka K. Rate of force development as a measure of muscle damage. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2015;25(3):417-27. doi: 10.1111/sms.12241. PubMed PMID: 24798498.
25. Lewis PB, Ruby D, Bush-Joseph CA. Muscle soreness and delayed-onset muscle soreness. Clin Sports Med. 2012;31(2):255-62. Epub 2012/02/22. doi: 10.1016/j.csm.2011.09.009. PubMed PMID: 22341015.
26. Crenshaw AG, Thornell LE, Fridén J. Intramuscular pressure, torque and swelling for the exercise-induced sore vastus lateralis muscle. Acta physiologica Scandinavica. 1994;152(3):265-77. Epub 1994/11/01. doi: 10.1111/j.1748-1716.1994.tb09806.x. PubMed PMID: 7872004.
27. Howell JN, Chleboun G, Conatser R. Muscle stiffness, strength loss, swelling and soreness following exercise-induced injury in humans. The Journal of physiology. 1993;464:183-96. Epub 1993/05/01. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019629. PubMed PMID: 8229798; PubMed Central PMCID: PMCPMC1175380.
28. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2010;48(6):757-67. Epub 2010/06/04. doi: 10.1515/cclm.2010.179. PubMed PMID: 20518645.
29. Peake JM, Suzuki K, Wilson G, Hordern M, Nosaka K, Mackinnon L, et al. Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation. Medicine and science in sports and exercise. 2005;37(5):737-45. Epub 2005/05/05. doi: 10.1249/01.mss.0000161804.05399.3b. PubMed PMID: 15870626.
30. Lippi G, Schena F, Ceriotti F. Diagnostic biomarkers of muscle injury and exertional rhabdomyolysis. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2018;57(2):175-82. Epub 2018/09/03. doi: 10.1515/cclm-2018-0656. PubMed PMID: 30173201.
31. Muslimovic A, Fridén V, Starnberg K, Tenstad O, Espedal H, Vukusic K, et al. Novel clearance of muscle proteins by muscle cells. Eur J Cell Biol. 2020;99(8):151127. Epub 2020/11/10. doi: 10.1016/j.ejcb.2020.151127. PubMed PMID: 33162173.
32. Lapointe BM, Frenette J, Côté CH. Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 2002;92(5):1995-2004. Epub 2002/04/19. doi: 10.1152/japplphysiol.00803.2001. PubMed PMID: 11960950.
33. Ertel KA, Hallam JE, Hillman AR. The effects of training status and exercise intensity on exercise-induced muscle damage. The Journal of sports medicine and physical fitness. 2020;60(3):449-55. Epub 2020/01/21. doi: 10.23736/s0022-4707.19.10151-x. PubMed PMID: 31958001.
34. Nosaka K, Newton M. Difference in the magnitude of muscle damage between maximal and submaximal eccentric loading. Journal of strength and conditioning research. 2002;16(2):202-8. Epub 2002/05/07. PubMed PMID: 11991771.
35. Fochi AG, Damas F, Berton R, Alvarez I, Miquelini M, Salvini TF, et al. Greater eccentric exercise-induced muscle damage by large versus small range of motion with the same end-point. Biology of sport. 2016;33(3):285-9. Epub 2016/09/08. doi: 10.5604/20831862.1208480. PubMed PMID: 27601784; PubMed Central PMCID: PMCPMC4993145.
36. Sadacharan CM, Seo S. Effect of Large Versus Small Range of Motion in the Various Intensities of Eccentric Exercise-Induced Muscle Pain and Strength. International journal of exercise science. 2021;14(7):1-18. Epub 2021/06/01. PubMed PMID: 34055176; PubMed Central PMCID: PMCPMC8136596.
37. Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. Physiological reviews. 2001;81(4):1725-89. Epub 2001/10/03. doi: 10.1152/physrev.2001.81.4.1725. PubMed PMID: 11581501.

38. Sorichter S, Puschendorf B, Mair J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. Exercise immunology review. 1999;5:5-21. Epub 1999/10/16. PubMed PMID: 10519060.
39. Reihmane D, Dela F. Interleukin-6: possible biological roles during exercise. European journal of sport science. 2014;14(3):242-50. Epub 2014/03/25. doi: 10.1080/17461391.2013.776640. PubMed PMID: 24655147.
40. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? Exercise immunology review. 2006;12:6-33. Epub 2007/01/05. PubMed PMID: 17201070.
41. Temesi J, Arnal PJ, Rupp T, Feasson L, Cartier R, Gergele L, et al. Are Females More Resistant to Extreme Neuromuscular Fatigue? Medicine and science in sports and exercise. 2015;47(7):1372-82. Epub 2014/10/12. doi: 10.1249/mss.0000000000000540. PubMed PMID: 25304334.
42. Hunter SK, Enoka RM. Sex differences in the fatigability of arm muscles depends on absolute force during isometric contractions. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 2001;91(6):2686-94. Epub 2001/11/22. doi: 10.1152/jappl.2001.91.6.2686. PubMed PMID: 11717235.
43. Komulainen J, Koskinen SO, Kalliokoski R, Takala TE, Vihko V. Gender differences in skeletal muscle fibre damage after eccentrically biased downhill running in rats. Acta physiologica Scandinavica. 1999;165(1):57-63. Epub 1999/03/11. doi: 10.1046/j.1365-201x.1999.00481.x. PubMed PMID: 10072098.
44. Theodorou AA, Nikolaidis MG, Paschalis V, Sakellariou GK, Fatouros IG, Koutedakis Y, et al. Comparison between glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient and normal individuals after eccentric exercise. Medicine and science in sports and exercise. 2010;42(6):1113-21. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181c67ecd. PubMed PMID: 19997026.
45. Aldret RL, Trahan BA, Davis G, Campbell B, Bellar DM. Effects of an Elastic Hamstring Assistance Device During Downhill Running. Journal of human kinetics. 2017;57:73-83. doi: 10.1515/hukin-2017-0048. PubMed PMID: 28713460; PubMed Central PMCID: PMC5504580.
46. Apostolopoulos NC, Lahart IM, Plyley MJ, Taunton J, Nevill AM, Koutedakis Y, et al. The effects of different passive static stretching intensities on recovery from unaccustomed eccentric exercise - a randomized controlled trial. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme. 2018;43(8):806-15. Epub 2018/03/13. doi: 10.1139/apnm-2017-0841. PubMed PMID: 29529387.
47. Arazi H, Eston R, Asadi A, Roozbeh B, Saati Zarei A. Type of Ground Surface during Plyometric Training Affects the Severity of Exercise-Induced Muscle Damage. Sports. 2016;4(1). doi: 10.3390/sports4010015. PubMed PMID: 29910263; PubMed Central PMCID: PMC5968928.
48. Ascensao A, Rebelo A, Oliveira E, Marques F, Pereira L, Magalhaes J. Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. Clinical biochemistry. 2008;41(10-11):841-51. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.04.008. PubMed PMID: 18457670.
49. Avela J, Kyrolainen H, Komi PV, Rama D. Reduced reflex sensitivity persists several days after long-lasting stretch-shortening cycle exercise. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 1999;86(4):1292-300. Epub 1999/04/08. doi: 10.1152/jappl.1999.86.4.1292. PubMed PMID: 10194215.
50. Banzet S, Chennaoui M, Girard O, Racinais S, Drogou C, Chalabi H, et al. Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 2013;115(9):1237-44. doi: 10.1152/japplphysiol.00075.2013. PubMed PMID: 23950168.
51. Baumann CW, Green MS, Doyle JA, Rupp JC, Ingalls CP, Corona BT. Muscle injury after low-intensity downhill running reduces running economy. Journal of strength and conditioning research. 2014;28(5):1212-8. Epub 2014/02/18. doi: 10.1519/jsc.0000000000000422. PubMed PMID: 24531437.
52. Baumert P, Consortium GR, Lake MJ, Drust B, Stewart CE, Erskine RM. TRIM63 (MuRF-1) gene polymorphism is associated with biomarkers of exercise-induced muscle damage. Physiological genomics. 2018;50(3):142-3. doi: 10.1152/physiolgenomics.00103.2017. PubMed PMID: 29212849; PubMed Central PMCID: PMC5899231.
53. Black CD, Tynes BK, Gonglach AR, Waddell DE. Local and Generalized Endogenous Pain Modulation in Healthy Men: Effects of Exercise and Exercise-Induced Muscle Damage. Pain medicine. 2016;17(12):2422-33. doi: 10.1093/pm/pnw077. PubMed PMID: 28025376.
54. Bridgeman LA, Gill ND, Dulson DK, McGuigan MR. The Effect of Exercise-Induced Muscle Damage After a Bout of Accentuated Eccentric Load Drop Jumps and the Repeated Bout Effect. Journal of strength and conditioning research. 2017;31(2):386-94. Epub 2016/11/29. doi: 10.1519/jsc.0000000000001725. PubMed PMID: 27893481.
55. Burt DG, Twist C. The effects of exercise-induced muscle damage on cycling time-trial performance. Journal of strength and conditioning research. 2011;25(8):2185-92. Epub 2011/05/17. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181e86148. PubMed PMID: 21572353.

56. Chatzinikolaou A, Fatouros IG, Gourgoulis V, Avloniti A, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, et al. Time course of changes in performance and inflammatory responses after acute plyometric exercise. Journal of strength and conditioning research. 2010;24(5):1389-98. Epub 2010/04/14. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181d1d318. PubMed PMID: 20386477.
57. Chrismas BC, Taylor L, Siegler JC, Midgley AW. A Reduction in Maximal Incremental Exercise Test Duration 48 h Post Downhill Run Is Associated with Muscle Damage Derived Exercise Induced Pain. Frontiers in physiology. 2017;8:135. doi: 10.3389/fphys.2017.00135. PubMed PMID: 28337151; PubMed Central PMCID: PMC5343012.
58. Coratella G, Chemello A, Schena F. Muscle damage and repeated bout effect induced by enhanced eccentric squats. The Journal of sports medicine and physical fitness. 2016;56(12):1540-6. Epub 2015/12/17. PubMed PMID: 26671347.
59. Crystal NJ, Townson DH, Cook SB, LaRoche DP. Effect of cryotherapy on muscle recovery and inflammation following a bout of damaging exercise. European journal of applied physiology. 2013;113(10):2577-86. doi: 10.1007/s00421-013-2693-9. PubMed PMID: 23873339.
60. Dabbs NC, Chander H. The Effects of Exercise Induced Muscle Damage on Knee Joint Torque and Balance Performance. Sports. 2018;6(3). doi: 10.3390/sports6030101. PubMed PMID: 30235812; PubMed Central PMCID: PMC6162636.
61. Dantas G, Barros A, Silva B, Belém L, Ferreira V, Fonseca A, et al. Cold-Water Immersion Does Not Accelerate Performance Recovery After 10-km Street Run: Randomized Controlled Clinical Trial. Research quarterly for exercise and sport. 2020;91(2):228-38. Epub 2019/10/28. doi: 10.1080/02701367.2019.1659477. PubMed PMID: 31652109.
62. Davies RW, Carson BP, Jakeman PM. Sex Differences in the Temporal Recovery of Neuromuscular Function Following Resistance Training in Resistance Trained Men and Women 18 to 35 Years. Frontiers in physiology. 2018;9:1480. doi: 10.3389/fphys.2018.01480. PubMed PMID: 30405436; PubMed Central PMCID: PMC6206044.
63. Easthope CS, Hausswirth C, Louis J, Lepers R, Vercruyssen F, Brisswalter J. Effects of a trail running competition on muscular performance and efficiency in well-trained young and master athletes. European journal of applied physiology. 2010;110(6):1107-16. doi: 10.1007/s00421-010-1597-1. PubMed PMID: 20703499.
64. Easthope CS, Nosaka K, Caillaud C, Vercruyssen F, Louis J, Brisswalter J. Reproducibility of performance and fatigue in trail running. Journal of science and medicine in sport. 2014;17(2):207-11. doi: 10.1016/j.jsams.2013.03.009. PubMed PMID: 23660298.
65. Ferguson RA, Dodd MJ, Paley VR. Neuromuscular electrical stimulation via the peroneal nerve is superior to graduated compression socks in reducing perceived muscle soreness following intense intermittent endurance exercise. European Journal of Applied Physiology. 2014;114(10):2223-32. doi: 10.1007/s00421-014-2943-5.
66. Giandolini M, Horvais N, Rossi J, Millet GY, Morin JB, Samozino P. Acute and delayed peripheral and central neuromuscular alterations induced by a short and intense downhill trail run. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2016;26(11):1321-33. doi: 10.1111/sms.12583. PubMed PMID: 26584478.
67. Huang MJ, Nosaka K, Wang HS, Tseng KW, Chen HL, Chou TY, et al. Damage protective effects conferred by low-intensity eccentric contractions on arm, leg and trunk muscles. European journal of applied physiology. 2019;119(5):1055-64. doi: 10.1007/s00421-019-04095-9. PubMed PMID: 30778759.
68. Joseph CW, Bradshaw EJ, Kemp J, Clark RA. Musculoskeletal stiffness during hopping and running does not change following downhill backwards walking. Sports biomechanics. 2014;13(3):241-58. doi: 10.1080/14763141.2014.914240. PubMed PMID: 25325769.
69. Keane KM, Salicki R, Goodall S, Thomas K, Howatson G. Muscle Damage Response in Female Collegiate Athletes After Repeated Sprint Activity. Journal of strength and conditioning research. 2015;29(10):2802-7. Epub 2015/04/09. doi: 10.1519/jsc.0000000000000961. PubMed PMID: 25853920.
70. Lin MJ, Chen TC, Chen HL, Wu BH, Nosaka K. Low-intensity eccentric contractions of the knee extensors and flexors protect against muscle damage. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme. 2015;40(10):1004-11. Epub 2015/09/01. doi: 10.1139/apnm-2015-0107. PubMed PMID: 26319562.
71. Lombard W, Muir G, McKune A. Minimal changes in indirect markers of muscle damage after indoor pre-season fast bowling. South African Journal for Research in Sport, Physical Education and Recreation. 2012;34:105-14.
72. Machado AF, Almeida AC, Micheletti JK, Vanderlei FM, Tribst MF, Netto Junior J, et al. Dosages of cold-water immersion post exercise on functional and clinical responses: a randomized controlled trial.

Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2017;27(11):1356-63. doi: 10.1111/sms.12734. PubMed PMID: 27430594.
73. Maeo S, Ochi Y, Yamamoto M, Kanehisa H, Nosaka K. Effect of a prior bout of preconditioning exercise on muscle damage from downhill walking. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme. 2015;40(3):274-9. doi: 10.1139/apnm-2014-0390. PubMed PMID: 25693898.
74. Maeo S, Yamamoto M, Kanehisa H, Nosaka K. Prevention of downhill walking-induced muscle damage by non-damaging downhill walking. PloS one. 2017;12(3):e0173909. doi: 10.1371/journal.pone.0173909. PubMed PMID: 28288187; PubMed Central PMCID: PMC5348007.
75. Maeo S, Saito A, Otsuka S, Shan X, Kanehisa H, Kawakami Y. Localization of muscle damage within the quadriceps femoris induced by different types of eccentric exercises. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2018;28(1):95-106. doi: 10.1111/sms.12880. PubMed PMID: 28314055.
76. Marcora SM, Bosio A. Effect of exercise-induced muscle damage on endurance running performance in humans. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2007;17(6):662-71. doi: 10.1111/j.1600-0838.2006.00627.x. PubMed PMID: 17346288.
77. McHugh MP, Connolly DA, Eston RG, Gartman EJ, Gleim GW. Electromyographic analysis of repeated bouts of eccentric exercise. Journal of sports sciences. 2001;19(3):163-70. doi: 10.1080/026404101750095295. PubMed PMID: 11256821.
78. Paschalis V, Nikolaidis MG, Giakas G, Jamurtas AZ, Pappas A, Koutedakis Y. The effect of eccentric exercise on position sense and joint reaction angle of the lower limbs. Muscle & nerve. 2007;35(4):496-503. doi: 10.1002/mus.20723. PubMed PMID: 17221879.
79. Pincheira PA, Hoffman BW, Cresswell AG, Carroll TJ, Brown NAT, Lichtwark GA. The repeated bout effect can occur without mechanical and neuromuscular changes after a bout of eccentric exercise. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2018;28(10):2123-34. doi: 10.1111/sms.13222. PubMed PMID: 29790207.
80. Pournot H, Bieuzen F, Duffield R, Lepretre PM, Cozzolino C, Hausswirth C. Short term effects of various water immersions on recovery from exhaustive intermittent exercise. European journal of applied physiology. 2011;111(7):1287-95. doi: 10.1007/s00421-010-1754-6. PubMed PMID: 21132438.
81. Romero-Moraleda B, La Touche R, Lerma-Lara S, Ferrer-Pena R, Paredes V, Peinado AB, et al. Neurodynamic mobilization and foam rolling improved delayed-onset muscle soreness in a healthy adult population: a randomized controlled clinical trial. PeerJ. 2017;5:e3908. doi: 10.7717/peerj.3908. PubMed PMID: 29043110; PubMed Central PMCID: PMC5642244.
82. Stults-Kolehmainen MA, Bartholomew JB, Sinha R. Chronic psychological stress impairs recovery of muscular function and somatic sensations over a 96-hour period. Journal of strength and conditioning research. 2014;28(7):2007-17. Epub 2013/12/18. doi: 10.1519/jsc.0000000000000335. PubMed PMID: 24343323.
83. Tekus E, Vaczi M, Horvath-Szalai Z, Ludany A, Koszegi T, Wilhelm M. Plasma Actin, Gelsolin and Orosomucoid Levels after Eccentric Exercise. Journal of human kinetics. 2017;56:99-108. doi: 10.1515/hukin-2017-0027. PubMed PMID: 28469748; PubMed Central PMCID: PMC5384057.
84. Thompson HS, Hyatt JP, De Souza MJ, Clarkson PM. The effects of oral contraceptives on delayed onset muscle soreness following exercise. Contraception. 1997;56(2):59-65. Epub 1997/08/01. doi: 10.1016/s0010-7824(97)00093-0. PubMed PMID: 9315413.
85. Tofari PJ, Kemp JG, Cormack SJ. Self-Paced Team-Sport Match Simulation Results in Reductions in Voluntary Activation and Modifications to Biological, Perceptual, and Performance Measures at Halftime and for up to 96 Hours Postmatch. Journal of strength and conditioning research. 2018;32(12):3552-63. doi: 10.1519/JSC.0000000000001875. PubMed PMID: 28240711.
86. Twist C, Sykes D. Evidence of exercise-induced muscle damage following a simulated rugby league match. European Journal of Sport Science. 2011;11(6):401-9. doi: 10.1080/17461391.2010.536575.
87. Vaczi M, Rio-Rodriguez D, Negyesi J, Fernandez Del Olmo M. Acute neuromechanical modifications and 24-h recovery in quadriceps muscle after maximal stretch-shortening cycle exercise. Journal of electromyography and kinesiology : official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology. 2018;40:64-71. doi: 10.1016/j.jelekin.2018.03.003. PubMed PMID: 29631118.
88. Vila-Cha C, Hassanlouei H, Farina D, Falla D. Eccentric exercise and delayed onset muscle soreness of the quadriceps induce adjustments in agonist-antagonist activity, which are dependent on the motor task. Experimental brain research. 2012;216(3):385-95. doi: 10.1007/s00221-011-2942-2. PubMed PMID: 22094715; PubMed Central PMCID: PMC3262141.
89. Xu J, Fu SN, Zhou D, Huang C, Hug F. Relationship between pre-exercise muscle stiffness and muscle damage induced by eccentric exercise. European journal of sport science. 2019;19(4):508-16. doi: 10.1080/17461391.2018.1535625. PubMed PMID: 30362889.

90. Aminian-Far A, Hadian MR, Olyaei G, Talebian S, Bakhtiary AH. Whole-body vibration and the prevention and treatment of delayed-onset muscle soreness. Journal of athletic training. 2011;46(1):43-9. Epub 2011/01/11. doi: 10.4085/1062-6050-46.1.43. PubMed PMID: 21214349; PubMed Central PMCID: PMCPmc3017487.
91. Arroyo E, Wells AJ, Gordon JA, 3rd, Varanoske AN, Gepner Y, Coker NA, et al. Tumor necrosis factor-alpha and soluble TNF-alpha receptor responses in young vs. middle-aged males following eccentric exercise. Experimental gerontology. 2017;100:28-35. doi: 10.1016/j.exger.2017.10.012. PubMed PMID: 29038027.
92. Barker T, Henriksen VT, Martins TB, Kjeldsberg CR, Hill HR. Fluctuations in the skeletal muscle power-velocity relationship and interferon-gamma after a muscle-damaging event in humans. Extreme physiology & medicine. 2012;1(1):6. Epub 2012/01/01. doi: 10.1186/2046-7648-1-6. PubMed PMID: 23849351; PubMed Central PMCID: PMCPmc3707101.
93. Behrens M, Mau-Moeller A, Bruhn S. Effect of exercise-induced muscle damage on neuromuscular function of the quadriceps muscle. International journal of sports medicine. 2012;33(8):600-6. doi: 10.1055/s-0032-1304642. PubMed PMID: 22510801.
94. Black CD, Gonglach AR, Hight RE, Renfroe JB. Time-course of recovery of peak oxygen uptake after exercise-induced muscle damage. Respiratory physiology & neurobiology. 2015;216:70-7. doi: 10.1016/j.resp.2015.06.008. PubMed PMID: 26102253.
95. Brown MA, Howatson G, Keane KM, Stevenson EJ. Adaptation to Damaging Dance and Repeated-Sprint Activity in Women. Journal of strength and conditioning research. 2016;30(9):2574-81. Epub 2016/01/29. doi: 10.1519/jsc.0000000000001346. PubMed PMID: 26817742.
96. Burt D, Lamb K, Nicholas C, Twist C. Effects of repeated bouts of squatting exercise on sub-maximal endurance running performance. European journal of applied physiology. 2013;113(2):285-93. doi: 10.1007/s00421-012-2437-2. PubMed PMID: 22684335.
97. Burt D, Lamb K, Nicholas C, Twist C. Effects of muscle-damaging exercise on physiological, metabolic, and perceptual responses during two modes of endurance exercise. Journal of Exercise Science & Fitness. 2012;10(2):70-7. doi: 10.1016/j.jesf.2012.10.003.
98. Burt DG, Lamb K, Nicholas C, Twist C. Effects of exercise-induced muscle damage on resting metabolic rate, sub-maximal running and post-exercise oxygen consumption. European journal of sport science. 2014;14(4):337-44. doi: 10.1080/17461391.2013.783628. PubMed PMID: 23566074.
99. Burt D, Lamb K, Nicholas C, Twist C. Lower-volume muscle-damaging exercise protects against high-volume muscle-damaging exercise and the detrimental effects on endurance performance. European journal of applied physiology. 2015;115(7):1523-32. doi: 10.1007/s00421-015-3131-y. PubMed PMID: 25697150.
100. Camacho MA, Herrera E, Barela JA, Delgado-Diaz DC. Kinesiotaping Diminishes Delayed Muscle Soreness but does not Improve Muscular Performance. International journal of sports medicine. 2020;41(9):596-602. Epub 2020/05/13. doi: 10.1055/a-1088-5223. PubMed PMID: 32396966.
101. Chen TC, Nosaka K, Lin MJ, Chen HL, Wu CJ. Changes in running economy at different intensities following downhill running. Journal of sports sciences. 2009;27(11):1137-44. doi: 10.1080/02640410903062027. PubMed PMID: 19714546.
102. Davies RC, Eston RG, Fulford J, Rowlands AV, Jones AM. Muscle damage alters the metabolic response to dynamic exercise in humans: a 31P-MRS study. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 2011;111(3):782-90. doi: 10.1152/japplphysiol.01021.2010. PubMed PMID: 21719720.
103. Deschenes MR, Brewer RE, Bush JA, McCoy RW, Volek JS, Kraemer WJ. Neuromuscular disturbance outlasts other symptoms of exercise-induced muscle damage. Journal of the neurological sciences. 2000;174(2):92-9. Epub 2000/03/23. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00258-6. PubMed PMID: 10727694.
104. Dobbin N, Lamb KL, Twist C. Selected Physiological, Perceptual, and Physical Performance Changes During Two Bouts of Prolonged High-Intensity Intermittent Running Separated by 72 Hours. Journal of strength and conditioning research. 2017;31(12):3474-81. doi: 10.1519/JSC.0000000000001767. PubMed PMID: 28002177.
105. Doguet V, Nosaka K, Guével A, Ishimura K, Guilhem G, Jubeau M. Influence of fascicle strain and corticospinal excitability during eccentric contractions on force loss. Experimental physiology. 2019;104(10):1532-43. Epub 2019/08/03. doi: 10.1113/ep087664. PubMed PMID: 31374136.
106. Fonda B, Sarabon N. Effects of intermittent lower-body negative pressure on recovery after exercise-induced muscle damage. International journal of sports physiology and performance. 2015;10(5):581-6. doi: 10.1123/ijspp.2014-0311. PubMed PMID: 25473823.
107. Foure A, Nosaka K, Wegrzyk J, Duhamel G, Le Troter A, Boudinet H, et al. Time course of central and peripheral alterations after isometric neuromuscular electrical stimulation-induced muscle damage. PloS one.

2014;9(9):e107298. doi: 10.1371/journal.pone.0107298. PubMed PMID: 25215511; PubMed Central PMCID: PMC4162582.
108. Gleeson N, Eston R, Minshull C, Bailey A, Al Kitani AH, Darain H, et al. Effects of antecedent flexibility conditioning on neuromuscular and sensorimotor performance during exercise-induced muscle damage. Journal of Exercise Science & Fitness. 2013;11(2):107-17. doi: 10.1016/j.jesf.2013.11.003.
109. Gordon JA, 3rd, Hoffman JR, Arroyo E, Varanoske AN, Coker NA, Gepner Y, et al. Comparisons in the Recovery Response From Resistance Exercise Between Young and Middle-Aged Men. Journal of strength and conditioning research. 2017;31(12):3454-62. Epub 2017/09/01. doi: 10.1519/jsc.0000000000002219. PubMed PMID: 28859014.
110. Guilhem G, Doguet V, Hauraix H, Lacourpaille L, Jubeau M, Nordez A, et al. Muscle force loss and soreness subsequent to maximal eccentric contractions depend on the amount of fascicle strain in vivo. Acta physiologica. 2016;217(2):152-63. doi: 10.1111/apha.12654. PubMed PMID: 26786411.
111. Hasson SM, Daniels JC, Divine JG, Niebuhr BR, Richmond S, Stein PG, et al. Effect of ibuprofen use on muscle soreness, damage, and performance: a preliminary investigation. Medicine and science in sports and exercise. 1993;25(1):9-17. Epub 1993/01/01. PubMed PMID: 8423760.
112. Highton JM, Twist C, Eston RG. The Effects of Exercise-Induced Muscle Damage on Agility and Sprint Running Performance. Journal of Exercise Science & Fitness. 2009;7(1):24-30. doi: https://doi.org/10.1016/S1728-869X(09)60004-6.
113. Hody S, Rogister B, Leprince P, Laglaine T, Croisier JL. The susceptibility of the knee extensors to eccentric exercise-induced muscle damage is not affected by leg dominance but by exercise order. Clinical Physiology and Functional Imaging. 2013;33(5):373-80. doi: 10.1111/cpf.12040.
114. Larsen RG, Hirata RP, Madzak A, Frokjaer JB, Graven-Nielsen T. Eccentric exercise slows in vivo microvascular reactivity during brief contractions in human skeletal muscle. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 2015;119(11):1272-81. doi: 10.1152/japplphysiol.00563.2015. PubMed PMID: 26429869.
115. MacIntyre DL, Reid WD, Lyster DM, Szasz IJ, McKenzie DC. Presence of WBC, decreased strength, and delayed soreness in muscle after eccentric exercise. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 1996;80(3):1006-13. Epub 1996/03/01. doi: 10.1152/jappl.1996.80.3.1006. PubMed PMID: 8964718.
116. Millet GY, Tomazin K, Verges S, Vincent C, Bonnefoy R, Boisson RC, et al. Neuromuscular consequences of an extreme mountain ultra-marathon. PloS one. 2011;6(2):e17059. doi: 10.1371/journal.pone.0017059. PubMed PMID: 21364944; PubMed Central PMCID: PMC3043077.
117. Minahan C, Joyce S, Bulmer AC, Cronin N, Sabapathy S. The influence of estradiol on muscle damage and leg strength after intense eccentric exercise. European journal of applied physiology. 2015;115(7):1493-500. doi: 10.1007/s00421-015-3133-9. PubMed PMID: 25694209.
118. Nelson MR, Conlee RK, Parcell AC. Inadequate carbohydrate intake following prolonged exercise does not increase muscle soreness after 15 minutes of downhill running. International journal of sport nutrition and exercise metabolism. 2004;14(2):171-84. Epub 2004/05/01. PubMed PMID: 15118191.
119. Nederveen JP, Major B, Paterson DH, Murias JM. Faster VO(2) kinetics after eccentric contractions is explained by better matching of O(2) delivery to O(2) utilization. European journal of applied physiology. 2014;114(10):2169-81. doi: 10.1007/s00421-014-2937-3. PubMed PMID: 24974262.
120. Nikolaidis MG, Paschalis V, Giakas G, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D, et al. Decreased blood oxidative stress after repeated muscle-damaging exercise. Medicine and science in sports and exercise. 2007;39(7):1080-9. doi: 10.1249/mss.0b013e31804ca10c. PubMed PMID: 17596775.
121. Nottle C, Nosaka K. The magnitude of muscle damage induced by downhill backward walking. Journal of science and medicine in sport. 2005;8(3):264-73. Epub 2005/10/27. PubMed PMID: 16248467.
122. Oakley E, Pardeiro R, Powell J, Millar A. The effects of multiple daily applications of ice to the hamstrings on biochemical measures, signs, and symptoms associated with exercise-induced muscle damage. Journal of Strength and Conditioning Research. 2013;27(10).
123. Okamoto T, Kobayashi R, Hashimoto Y, Nosaka K. Changes in arterial stiffness after eccentric versus concentric cycling. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme. 2019;44(5):533-8. Epub 2018/10/12. doi: 10.1139/apnm-2018-0379. PubMed PMID: 30308126.
124. Pointon M, Duffield R, Cannon J, Marino FE. Cold application for neuromuscular recovery following intense lower-body exercise. European journal of applied physiology. 2011;111(12):2977-86. doi: 10.1007/s00421-011-1924-1. PubMed PMID: 21445604.
125. Szczyglowski MK, Ade CJ, Campbell JA, Black CD. The effects of exercise-induced muscle damage on critical torque. European journal of applied physiology. 2017;117(11):2225-36. doi: 10.1007/s00421-017-3710-1. PubMed PMID: 28900719.

126. Twist C, Gleeson N, Eston R. The effects of plyometric exercise on unilateral balance performance. Journal of Sports Sciences. 2008;26(10):1073-80. doi: 10.1080/02640410801930168.
127. Willoughby DS, McFarlin B, Bois C. Interleukin-6 expression after repeated bouts of eccentric exercise. International journal of sports medicine. 2003;24(1):15-21. Epub 2003/02/13. doi: 10.1055/s-2003-37197. PubMed PMID: 12582947.
128. Yanagisawa O, Kurihara T, Okumura K, Fukubayashi T. Effects of strenuous exercise with eccentric muscle contraction: physiological and functional aspects of human skeletal muscle. Magnetic resonance in medical sciences : MRMS : an official journal of Japan Society of Magnetic Resonance in Medicine. 2010;9(4):179-86. Epub 2010/12/29. doi: 10.2463/mrms.9.179. PubMed PMID: 21187687.
129. Yanagisawa O, Kurihara T, Kobayashi N, Fukubayashi T. Strenuous resistance exercise effects on magnetic resonance diffusion parameters and muscle-tendon function in human skeletal muscle. Journal of magnetic resonance imaging : JMRI. 2011;34(4):887-94. doi: 10.1002/jmri.22668. PubMed PMID: 21769968.
130. Ahmadi S, Sinclair PJ, Davis GM. Muscle oxygenation after downhill walking-induced muscle damage. Clinical physiology and functional imaging. 2008;28(1):55-63. doi: 10.1111/j.1475-097X.2007.00777.x. PubMed PMID: 18005166.
131. Aldayel A, Jubeau M, McGuigan MR, Nosaka K. Less indication of muscle damage in the second than initial electrical muscle stimulation bout consisting of isometric contractions of the knee extensors. European journal of applied physiology. 2010;108(4):709-17. doi: 10.1007/s00421-009-1278-0. PubMed PMID: 19908060.
132. Alemany JA, Delgado-Diaz DC, Mathews H, Davis JM, Kostek MC. Comparison of acute responses to isotonic or isokinetic eccentric muscle action: differential outcomes in skeletal muscle damage and implications for rehabilitation. International journal of sports medicine. 2014;35(1):1-7. doi: 10.1055/s-0032-1327652. PubMed PMID: 23780898.
133. Brown SJ, Child RB, Day SH, Donnelly AE. Exercise-induced skeletal muscle damage and adaptation following repeated bouts of eccentric muscle contractions. Journal of sports sciences. 1997;15(2):215-22. doi: 10.1080/026404197367498. PubMed PMID: 9258852.
134. Chen TC, Chung C-J, Chen H-L, Wu C-J. Effects of a 4-day low-intensity run after downhill running on recovery of muscle damage and running economy. Journal of Exercise Science and Fitness. 2007;5.
135. Chen CH, Nosaka K, Chen HL, Lin MJ, Tseng KW, Chen TC. Effects of flexibility training on eccentric exercise-induced muscle damage. Medicine and science in sports and exercise. 2011;43(3):491-500. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181f315ad. PubMed PMID: 20689450.
136. Chen CH, Chen TC, Jan MH, Lin JJ. Acute effects of static active or dynamic active stretching on eccentric-exercise-induced hamstring muscle damage. International journal of sports physiology and performance. 2015;10(3):346-52. doi: 10.1123/ijspp.2014-0206. PubMed PMID: 25229605.
137. Chen CH, Ye X, Wang YT, Chen YS, Tseng WC. Differential Effects of Different Warm-up Protocols on Repeated Sprints-Induced Muscle Damage. Journal of strength and conditioning research. 2018;32(11):3276-84. doi: 10.1519/JSC.0000000000002310. PubMed PMID: 29084097.
138. Cleary MA, Sitler MR, Kendrick ZV. Dehydration and symptoms of delayed-onset muscle soreness in normothermic men. Journal of athletic training. 2006;41(1):36-45. Epub 2006/04/19. PubMed PMID: 16619093; PubMed Central PMCID: PMCPMC1421497.
139. Deli CK, Fatouros IG, Paschalis V, Georgakouli K, Zalavras A, Avloniti A, et al. A Comparison of Exercise-Induced Muscle Damage Following Maximal Eccentric Contractions in Men and Boys. Pediatric exercise science. 2017;29(3):316-25. doi: 10.1123/pes.2016-0185. PubMed PMID: 28165870.
140. Doguet V, Nosaka K, Plautard M, Gross R, Guilhem G, Guevel A, et al. Neuromuscular Changes and Damage after Isoload versus Isokinetic Eccentric Exercise. Medicine and science in sports and exercise. 2016;48(12):2526-35. doi: 10.1249/MSS.0000000000001042. PubMed PMID: 27434079.
141. Eston RG, Finney S, Baker S, Baltzopoulos V. Muscle tenderness and peak torque changes after downhill running following a prior bout of isokinetic eccentric exercise. Journal of sports sciences. 1996;14(4):291-9. doi: 10.1080/02640419608727714. PubMed PMID: 8887208.
142. Hedayatpour N, Falla D, Arendt-Nielsen L, Vila-Cha C, Farina D. Motor unit conduction velocity during sustained contraction after eccentric exercise. Medicine and science in sports and exercise. 2009;41(10):1927-33. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181a3a505. PubMed PMID: 19727019.
143. Howatson G, Milak A. Exercise-induced muscle damage following a bout of sport specific repeated sprints. Journal of strength and conditioning research. 2009;23(8):2419-24. Epub 2009/10/15. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181bac52e. PubMed PMID: 19826279.
144. Jakeman JR, Macrae R, Eston R. A single 10-min bout of cold-water immersion therapy after strenuous plyometric exercise has no beneficial effect on recovery from the symptoms of exercise-induced muscle damage. Ergonomics. 2009;52(4):456-60. doi: 10.1080/00140130802707733. PubMed PMID: 19401897.

145. Jakeman JR, Eston RG. Joint angle-torque characteristics of the knee extensors following eccentric exercise-induced muscle damage in young, active women. Journal of Exercise Science & Fitness. 2013;11(1):50-6. doi: 10.1016/j.jesf.2013.05.001.
146. Macgregor LJ, Fairweather MM, Bennett RM, Hunter AM. The Effect of Foam Rolling for Three Consecutive Days on Muscular Efficiency and Range of Motion. Sports medicine - open. 2018;4(1):26. doi: 10.1186/s40798-018-0141-4. PubMed PMID: 29884972; PubMed Central PMCID: PMC5993692.
147. Maeo S, Yamamoto M, Kanehisa H. Muscular adaptations to short-term low-frequency downhill walking training. International journal of sports medicine. 2015;36(2):150-6. doi: 10.1055/s-0034-1385885. PubMed PMID: 25285470.
148. Maeo S, Yamamoto M, Kanehisa H. Downhill walking training with and without exercise-induced muscle damage similarly increase knee extensor strength. Journal of sports sciences. 2016;34(21):2018-26. doi: 10.1080/02640414.2016.1149607. PubMed PMID: 26920254.
149. Magalhaes J, Rebelo A, Oliveira E, Silva JR, Marques F, Ascensao A. Impact of Loughborough Intermittent Shuttle Test versus soccer match on physiological, biochemical and neuromuscular parameters. European journal of applied physiology. 2010;108(1):39-48. doi: 10.1007/s00421-009-1161-z. PubMed PMID: 19756713.
150. Minshull C, Eston R, Rees D, Gleeson N. Knee joint neuromuscular activation performance during muscle damage and superimposed fatigue. Journal of sports sciences. 2012;30(10):1015-24. doi: 10.1080/02640414.2012.682084. PubMed PMID: 22574708.
151. Nasrabadi R, Izanloo Z, Sharifnezad A, Hamedinia MR, Hedayatpour N. Muscle fiber conduction velocity of the vastus medilais and lateralis muscle after eccentric exercise induced-muscle damage. Journal of electromyography and kinesiology : official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology. 2018;43:118-26. doi: 10.1016/j.jelekin.2018.06.008. PubMed PMID: 30273919.
152. Paschalis V, Koutedakis Y, Baltzopoulos V, Mougios V, Jamurtas AZ, Theoharis V. The effects of muscle damage on running economy in healthy males. International journal of sports medicine. 2005;26(10):827-31. doi: 10.1055/s-2005-837461. PubMed PMID: 16320165.
153. Paschalis V, Nikolaidis MG, Theodorou AA, Panayiotou G, Fatouros IG, Koutedakis Y, et al. A weekly bout of eccentric exercise is sufficient to induce health-promoting effects. Medicine and science in sports and exercise. 2011;43(1):64-73. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181e91d90. PubMed PMID: 20508540.
154. Petrofsky J, Berk L, Bains G, Khowailed IA, Lee H, Laymon M. The Efficacy of Sustained Heat Treatment on Delayed-Onset Muscle Soreness. Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine. 2017;27(4):329-37. Epub 2016/07/28. doi: 10.1097/jsm.0000000000000375. PubMed PMID: 27454218.
155. Satkunskiene D, Kamandulis S, Brazaitis M, Snieckus A, Skurvydas A. Effect of high volume stretch-shortening cycle exercise on vertical leg stiffness and jump performance. Sports biomechanics. 2018:1-17. doi: 10.1080/14763141.2018.1522366. PubMed PMID: 30411999.
156. Serrao FV, Serrao PR, Foerster B, Tannus A, Monteiro Pedro V, Salvini TF. Assessment of the quadriceps femoris muscle in women after injury induced by maximal eccentric isokinetic exercise with low angular speed. Journal of sports science & medicine. 2007;6(1):106-16. Epub 2007/01/01. PubMed PMID: 24149232; PubMed Central PMCID: PMCPmc3778686.
157. Torres R, Pinho F, Duarte JA, Cabri JM. Effect of single bout versus repeated bouts of stretching on muscle recovery following eccentric exercise. Journal of science and medicine in sport. 2013;16(6):583-8. doi: 10.1016/j.jsams.2013.01.002. PubMed PMID: 24139151.
158. Tsatalas T, Giakas G, Spyropoulos G, Paschalis V, Nikolaidis MG, Tsaopoulos DE, et al. The effects of muscle damage on walking biomechanics are speed-dependent. European journal of applied physiology. 2010;110(5):977-88. doi: 10.1007/s00421-010-1589-1. PubMed PMID: 20668871.
159. Tsatalas T, Giakas G, Spyropoulos G, Sideris V, Lazaridis S, Kotzamanidis C, et al. The effects of eccentric exercise-induced muscle damage on running kinematics at different speeds. Journal of sports sciences. 2013;31(3):288-98. doi: 10.1080/02640414.2012.729135. PubMed PMID: 23046390.
160. Vassilis P, Vassilios B, Vassilis M, Athanasios JZ, Vassilis T, Christina K, et al. Isokinetic eccentric exercise of quadriceps femoris does not affect running economy. Journal of strength and conditioning research. 2008;22(4):1222-7. Epub 2008/06/12. doi: 10.1519/JSC.0b013e318173da21. PubMed PMID: 18545185.
161. Wahl P, Sanno M, Ellenberg K, Frick H, Bohm E, Haiduck B, et al. Aqua Cycling Does Not Affect Recovery of Performance, Damage Markers, and Sensation of Pain. Journal of strength and conditioning research. 2017;31(1):162-70. doi: 10.1519/JSC.0000000000001462. PubMed PMID: 27135478.

B. Annexe 4 : Étude 2

Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes. **Chalchat E,** Charlot K, Garcia-Vicencio S, Hertert P, Baugé S, Bourdon S, Bompard J, Farges C, Martin V, Bourrilhon C, Siracusa J. Scand J Med Sci Sports. 2021 Sep;31(9):1782-1795. doi: 10.1111/sms.14000. Epub 2021 Jun 7.

Received: 4 May 2021 | Accepted: 17 May 2021

DOI: 10.1111/sms.14000

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes

Emeric Chalchat[1,2] | **Keyne Charlot**[1,3] | **Sebastian Garcia-Vicencio**[1,3] | **Pierre Hertert**[4] | **Stéphane Baugé**[1,3] | **Stéphanie Bourdon**[1,3] | **Julie Bompard**[5] | **Cédric Farges**[6] | **Vincent Martin**[2,7] | **Cyprien Bourrilhon**[1,3,4] | **Julien Siracusa**[1,3]

[1]Unité de Physiologie des Exercices et Activités en Conditions Extrêmes, Département Environnements Opérationnels, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Bretigny-Sur-Orge, France

[2]AME2P, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

[3]LBEPS, Univ Evry, IRBA, Université Paris Saclay, Evry, France

[4]Fédération française d'athlétisme, Paris Cedex, France

[5]Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Clamart, France

[6]Centre Hospitalier d'Albi, Albi, France

[7]Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

Correspondence
Julien Siracusa, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 1 place du général Valérie André, 91223 Bretigny-Sur-Orge, France.
Email: siracusa.julien@gmail.com

Abstract

Ultra-endurance sports are growing in popularity but can be associated with adverse health effects, such as exercise-induced muscle damage (EIMD), which can lead to exertional rhabdomyolysis. Circulating microRNAs (miRNAs) may be useful to approach the degree of EIMD. We aimed to (1) investigate the relevance of circulating miRNAs as biomarkers of muscle damage and (2) examine the acute response of skeletal/cardiac muscle and kidney biomarkers to a 24-h run in elite athletes. Eleven elite athletes participated in the 24-h run World Championships. Counter-movement jump (CMJ), creatine kinase (CK), myoglobin (Mb), creatinine (Cr), high-sensitive cardiac troponin T (hs-cTnT), and muscle-specific miRNA (myomiR) levels were measured before, immediately after, and 24 and 48h after the race. CMJ height was reduced immediately after the race ($-84.0 \pm 25.2\%$, $p < 0.001$) and remained low at 24 h ($-43.6 \pm 20.4\%$, $p = 0.002$). We observed high CK activity ($53\,239 \pm 63\,608$ U/L, $p < 0.001$) immediately after the race, and it remained elevated 24h after ($p < 0.01$). Circulating myomiR levels (miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b, miR-208a-3p, miR-208b-3p, and miR-499a-5p) were elevated immediately after the 24-h run (fold changes: 18–124,723, $p<0.001$) and significantly ($p < 0.05$) correlated or tended to significantly ($p < 0.07$) correlate with the reduction in CMJ height at 24 h. We found no significant correlation between CMJ height loss at 24 h and CK ($p = 0.23$) or Mb ($p = 0.41$) values. All elite ultramarathon runners included in our study were diagnosed with exertional rhabdomyolysis after the 24-h ultramarathon race. MyomiR levels may be useful to approach the degree of muscle damage.

KEYWORDS

acute kidney injury, biomarkers, cardiac stress, exercise-induced muscle damage, muscle function, rhabdomyolysis, ultra-endurance

Cyprien Bourrilhon and Julien Siracusa authors contributed equally to this work.

© 2021 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

Ultra-endurance and ultramarathon events (>42.195 km) have experienced considerable growth in recent years. Their growing popularity, along with the constant pursuit of overcoming one's limitations, has given rise to extremely challenging sports events. A 24-h run is a form of ultramarathon in which a competitor runs as far as possible in 24 h on a short loop (400–2,500 m). The current world records are 303.5 km for men and 270.1 km for women, corresponding to mean running speeds of ~12.6 and ~11.3 km/h, respectively. To achieve a good performance, athletes must efficiently manage their exercise work rate by adopting a pacing strategy[1] and managing their energy and fluid intake.[2] On the other hand, the extreme duration and high number of stretch-shortening cycles performed by exercising muscles over the 24-h race result in a high level of exercise-induced muscle fatigue and damage, which translates into an acute reduction in performance.[3]

The evidence that strenuous ultra-endurance exercise can cause alterations in metabolism[4] and the cardiovascular[5] and musculoskeletal systems[3] is well-established. Prior studies have shown that prolonged exercise, such as that encountered in ultra-endurance events, is associated with cardiac stress,[6] exertional rhabdomyolysis, and sometimes acute kidney injury.[7] Exertional rhabdomyolysis can manifest as myalgia, weakness, and edema and is characterized by muscle breakdown and necrosis, resulting in leakage of intracellular muscle constituents, such as electrolytes and sarcoplasmic proteins, including myoglobin (Mb) and creatine kinase (CK), into circulation and the extracellular space. The accumulation of sarcoplasmic proteins, specifically myoglobin, in the circulation is a potential complication for the kidneys.[8] Acute kidney injury is a final-stage complication of massive rhabdomyolysis and is defined as a rapid decline in renal functionality (hours to days).[9] Although the impact of ultra-endurance exercise on cardiac damage biomarkers and the risk of exertional rhabdomyolysis and acute kidney injury have been largely evaluated,[7] it is known that training status can affect the markers of muscle damage after exercise-induced muscle damage (EIMD).[10] However, the effect of ultra-endurance racing on elite runners is still poorly documented.

Although the delayed loss of muscle function (i.e., 24–48 h) is considered to be the best indirect marker for evaluating the magnitude of exercise-induced muscle damage,[11] early measurement (i.e., within a few hours after the end of exercise) may reflect a combination of muscle damage and muscle fatigue rather than muscle damage alone.[11,12] This marker is therefore not suitable in clinical practice due to the necessity of immediate diagnosis of muscle damage. Indeed, rapid countermeasures are required to prevent the risk of exertional rhabdomyolysis and acute kidney injury. Serum CK and Mb levels are the most commonly used biomarkers of exertional rhabdomyolysis,[13] but there is no accepted cutoff threshold for these biomarkers (CK: 5 – 10X the upper limit range or >5000–10 000 U/L, Mb: 400–4000 ng/ml).[14,15] Indeed, the interpretation of these biomarkers is affected by high interindividual variability and does not necessarily reflect the magnitude of delayed loss of muscle function.[16] Moreover, there are currently no markers considered to be a "gold standard" for the evaluation of the degree of exertional rhabdomyolysis.[17] It is therefore necessary to search for new relevant biomarkers that increase within the first hours after exercise and accurately predict the magnitude of muscle damage.

MicroRNAs (miRNAs), small noncoding RNA involved in the post-transcriptional regulation of gene expression, may potentially serve as alternative biomarkers of muscle damage.[18,19] Indeed, some miRNAs (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-486, and miR-499) have been described as muscle-specific/enriched (cardiac and skeletal muscle), two of which are specifically found in skeletal muscle (miR-133b and miR-206) and one in the cardiac muscle (miR-208a).[20] These specific/enriched miRNAs (also called myomiRs) can be actively secreted by or passively leak out of injured myocytes and measured in the blood. High levels of serum/plasma myomiRs have been found in muscular dystrophy and myocardial infarction (MI) patients relative to healthy subjects.[21,22] In the healthy organism, the elevation of myomiR has been observed after toxic muscle injury in rats[20] and after marathon running.[19] Moreover, it has been reported that the ability of myomiR to discriminate damaged from non-damaged muscle is higher than that of CK,[18,20] suggesting that myomiR may more accurately diagnose muscle damage. Although no study has investigated the relationship between myomiR levels and skeletal muscle function, Corsten et al.[23] found a good correlation between miR-499 and troponin T levels in MI patients, suggesting that this miRNA could be useful for determining the degree of muscle damage.

Here, we aimed to (1) investigate the relevance of circulating miRNA as biomarkers of muscle damage and (2) examine the acute response of skeletal/cardiac muscle and kidney biomarkers to the 24-h run World Championships in elite athletes. We hypothesized that the present athletes would be diagnosed with exertional rhabdomyolysis, acute kidney injury, and present cardiac stress in response to the 24-h run. Moreover, myomiR levels would be more representative of muscle damage than those of CK and Mb (ie, more associated with muscle function loss at 24 h).

2 | METHODS

2.1 | Participants

Athletes of the French national team (5 men and 6 women) gave their written informed consent and agreed to participate in this study. The participant's characteristics are

provided in Table 1. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Ile-de-France 8, France, Registration Number: 2019-A02445-52, Etude LemuR).

2.2 | Experimental design

This study was conducted during the 2019 IAU 24H World Championships held in Albi (France) from October 26 to 27, 2019. The race consisted of running the greatest distance possible over 24 h (start of the race at 10:00 am the first day) on a loop of 1.491 km combining asphalt (~75%) and tartan track (~25%; see Figure 1).

Vertical jump height (as an indicator of muscle function) and muscle soreness were assessed 26 h before (between 7:00 am and 9:00 am, PRE), within 1 h after finishing (POST), and 24 and 48 h after the race. Blood samples were obtained at the same time points for biological analysis. A blood test was completed each morning in a fasted state. Dietary intakes were recorded during the race (Lavoué et al.[2]). As the medical staff did not permit some participants to perform CMJ due to medical monitoring, one participant (POST), two participants (+24), and four participants (+48) did not perform the CMJ. Participants were asked to refrain from performing any physical activity the two days after the race.

2.3 | Functional measurements

2.3.1 | Vertical jump

Counter-movement jump (CMJ) height was assessed using an Optojump photocell system (Microgate, Bolzano, Italy) and used as a measure of muscle function. Participants were asked to keep their hands on their hips and jump as high as possible. They had two attempts to achieve their best maximal jump height, which was used for further analysis. A self-determined range of motion for the knee was permitted, and they received verbal encouragement.

2.3.2 | Muscle soreness

The magnitude of muscle soreness of the quadriceps was assessed using a visual analog scale, consisting of a 100-mm line representing "no pain" at one end (0 mm), and "very, very painful" at the other (100 mm), while performing a squat in 90° knee range of motion. Due to severe range of motion limitation observed immediately after the end of the race, the participants performed a squat on a self-determined range motion, that is, as flexed as possible.

2.4 | Biological measurements

2.4.1 | Sampling

Blood was drawn from the antecubital vein at each time point and collected into two separate tubes (5 ml; Becton Dickinson Vacutainer, Franklin Lakes, USA), one containing EDTA and the other lithium heparin. The collected blood was conserved at 4°C until plasma was separated by centrifugation (2000 × g, 10 min) within 1 h of collection. Lithium heparin plasma was used within 2 h for standard biochemical analyses, and EDTA plasma was aliquoted and frozen at −20°C for further analyses.

2.4.2 | Biochemical analyses

Plasma CK activity and Mb concentration were measured using a Roche Cobas c501 autoanalyzer and high-sensitive cardiac troponin T (hs-cTnT) and creatinine (Cr) concentrations using a Roche Cobas e501/e601 autoanalyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the CKD-EPI (CKD Epidemiology Collaboration) equation. Before the race, several participants presented Mb and hs-cTnT values below the detection limit of 21 ng/mL (5 of 11 PRE values) and 5 ng/L (8 of 11), respectively. For statistical analysis, such samples were given the value of the detection limit.

Plasma miRNA extraction

Total RNA was extracted from plasma as previously described.[18,20] Briefly, total RNA was extracted from 200 µl plasma using the mirVana PARIS Kit (Ambion, Austin, USA) and low-binding tubes (1.5 ml; DNA LoBind Tubes, Eppendorf, Hamburg, Germany) according to the manufacturer's protocol. An additional precipitation step was performed as follows. Column elution was performed with 180 µL sterile water. Then, 18µl 3 M sodium acetate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), 400 µl 70% ethanol, and 1 µL GlycoBlue (Ambion) were added. Tubes were vortexed, and the RNA was allowed to precipitate for 20 min at −20°C. After centrifugation (12 000 × g, 4°C, 10 min), the supernatants were carefully removed and the pellets were allowed to dry for 30 min. The RNA was finally suspended in 12 µl sterile water, incubated 10 min at 50°C, and frozen at −80°C until cDNA synthesis.

TABLE 1 Participant characteristics

No.	Sex (M or F)	Age (years)	Height (cm)	Weight (kg)	BMI (kg/m^2)	Fat mass (% of weight)	Performance* (km (% vs. PB))	Ranking**	Experience in UM		Training volume (h/week)
									Years	Number of 24-h	
1	M	39	181	75	22,9	4,2	272 (+7)	4	20	1	15
2	M	53	170	60	20,8	6,2	259 (−2)	12	9	20	27
3	M	53	172	63,1	21,3	8,9	248 (−1)	19	5	4	6
4	M	46	188	73,8	20,9	14,5	236 (−6)	31	9	6	15
5	M	50	175	69,5	22,7	9,7	236 (−6)	34	4	8	14
6	F	37	160	42,9	16,8	10,1	241 (+12)	7	4	1	12
7	F	52	166	53,1	19,3	23,5	222 (−7)	21	13	16	6
8	F	45	160	51,9	20,3	19,1	219 (+4)	26	6	3	8
9	F	46	160	62,9	24,6	18,6	209 (−7)	36	13	2	10
10	F	31	171	58	19,8	12	201 (−4)	49	8	3	10
11	F	52	169	61,4	21,5	22,2	193 (−9)	58	9	2	8
Mean (M)		48.2 ± 5.9	177 ± 7	68.3 ± 6.6	21.7 ± 1.0	8.7 ± 3.9	250 ± 15	20 ± 13	9.4 ± 6.3	7.8 ± 7.3	15 ± 8
Mean (F)		43.8 ± 8.4	164 ± 5	55.0 ± 7.4	20.4 ± 2.6	17.6 ± 5.4	214 ± 17	33 ± 19	8.8 ± 3.6	4.5 ± 5.7	9 ± 2
Mean		45.8 ± 7.4	170 ± 9	61.1 ± 9.6	21.0 ± 2.1	13.5 ± 6.5	231 ± 24	27 ± 17	9.1 ± 4.8	6.0 ± 6.4	12 ± 6

Abbreviation: BMI: body mass index, UM: ultramarathon, PB: personal best previous performance in 24-h races.

NOTE:*Values into brackets represent the difference between the performance in this race and their previous best performance (PB)

**214 and 147 participants started the race in male and female categories, respectively.

FIGURE 1 Aerial view of the race loop. The aerial view was extracted from ®Google Maps

Reverse transcription

cDNAs were synthesized from 5 µl total RNA diluted 1:6 in a 10 µl reaction volume, including the UniSp6 RNA spike-in using the miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol.

Real-Time Quantitative qPCR

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed on a 96-well LightCycler 480 instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) with 4 µL cDNA (diluted 1:40 in sterile water), 1 µl PCR primer mix, and 5 µl 2x miRCURY SYBR Green Master Mix (Qiagen) in a 10 µl reaction volume. First, a quality control for extraction and reverse transcription was performed by measuring endogenous homo sapiens (hsa)-miR-103a-3p (cutoff of ≤32 Cq) and synthetic UniSp6 RNA (cutoff of ≤20 Cq). Then, we measured hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378a-3p, and hsa-miR-499a-5p. We chose these miRNAs due to their muscle-specific expression (Lee et al.[24]) and their documented responses to toxic (Siracusa et al.[20]) and exercise-related muscle damage (Banzet et al.[18]; Mooren et al.[25]; Baggish et al.[19]). PCR protocol consisted of 1 activation cycle (95℃, 2 min), 52 amplification cycles (denaturation 95℃, 10 s, and annealing/amplification 56℃, 1 min), and a melting curve analysis step, as recommended by the manufacturer. Undetectable values were handled as described by De Ronde et al.[26] by adding one quantification cycle (Cq) to the highest Cq observed for a miRNA.

The stability of potent reference miRNAs (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-210-3p, and hsa-miR-320a-3p) was assessed using geNorm, BestKeeper, NormFinder, the ΔCT method, and RefFinder. The optimal number of reference miRNAs was determined using geNorm. Five reference miRNAs (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-185-5p, and hsa-miR-320a-3p) were deemed sufficient for normalization. Final quantifications are expressed as arbitrary unit (AU) and consist of the geometrical mean of the quantification performed with each reference miRNA. The raw Cq and qPCR primer information is supplied for the target and reference miRNA in Table S1.

2.5 | Statistics

Statistical analyses were performed to assess the changes between the PRE, POST, and 24 and 48 h measurements. Due to the limited sample size of our study and the absence of a normal distribution of the data according to the Shapiro–Wilk tests, we performed non-parametric Friedman analysis of variance. Statistical differences between time points were assessed using Dunn's multiple comparisons test. The Friedman test statistic χ^2 and the effect size (Kendall's W test value) are reported. Kendall's W coefficient value ranges from 0 (no relationship) to 1 (a perfect relationship). Missing data were imputed using the missMDA R package.

Correlations were performed between CMJ height loss at 24 h and changes in CK, Mb, myomiRs, and muscle soreness. Indeed, as muscle function (i.e., CMJ height) loss at 24h is considered to be the best indirect marker for evaluating the magnitude of exercise-induced muscle damage,[11] any significant correlation suggests that the associated measure could be useful to approach the magnitude of muscle damage. The level of association between parameters was assessed using Spearman's rank correlation coefficient (ρ).

Significance was defined as $p < 0.05$. Analyses were performed using GraphPad Prism (Version 8.4.3, GraphPad Software, CA, USA) and R (version 3.6.1, R Core Team (2017). R: A Language and Environment for Statistical

TABLE 2 Initial absolute values of the different measurements.

CMJ (cm)	19.6 ± 3.7
Creatine kinase (U/L)	137.3 ± 112.4
Myoglobin (ng/ml)	34.2 ± 18.7
Hs-cTnT (ng/L)	6.3 ± 2.3
Creatinine (μmol/L)	75.6 ± 14.3

Abbreviation: CMJ, counter-movement jump; Hs-cTnT, high-sensitive cardiac troponin T. Mean ± SD.

Computing, available at https://www.R-project.org/). All data are presented as the mean ± standard deviation (SD) throughout the manuscript.

3 | RESULTS

3.1 | Functional measurements

3.1.1 | Vertical jump

The Friedman test showed a significant effect of time on CMJ height ($p < 0.001$, $\chi^2 = 28.64$, Kendall's W = 0.87). The initial jump height was 19.6 ± 3.7 cm (Table 2). CMJ height was reduced by ~84% (2.8 ± 4.1 cm, $p < 0.001$) immediately after the race with five of the participants unable to jump (Figure 2). CMJ height remained low, by ~44% (10.9 ± 5.0 cm, $p = 0.002$; Figure 2) 24 h after the end of the race. Despite not being statistically different from the PRE values ($p = 0.19$), jump height was still reduced by ~30% at 48 h (13.0 ± 4.6 cm; Figure 2).

3.1.2 | Muscle soreness

The Friedman test showed a significant effect of time on quadriceps muscle soreness ($p < 0.001$, $\chi^2 = 19.36$, Kendall's W = 0.587). The muscle soreness of the athletes was significantly higher immediately and 24 h after the end of the race (Figure 2).

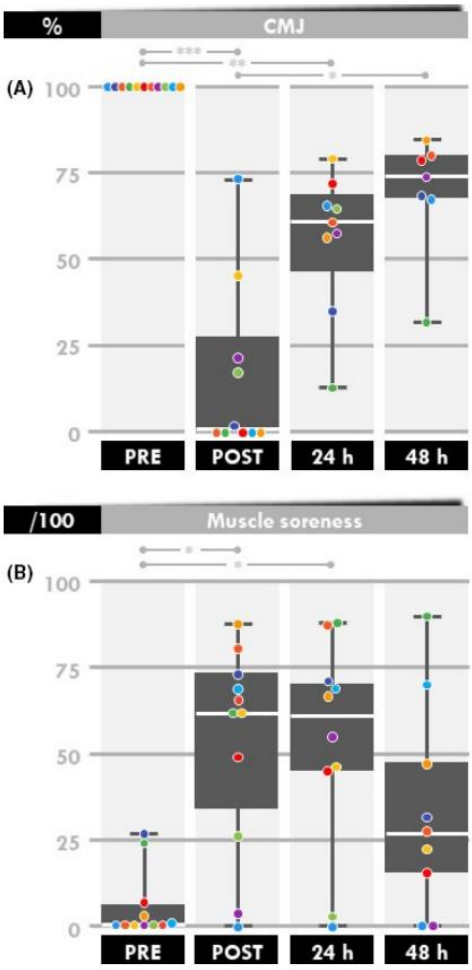


FIGURE 2 Changes in counter-movement jump (CMJ) height (A) and muscle soreness of the quadriceps (B) after the 24-h ultramarathon run. CMJ height and muscle soreness values are expressed as %PRE and mm (on 0-100mm scale), respectively. Data are displayed as interquartile ranges (25th and 75th percentiles, colored boxes), medians (horizontal white bars), minimum–maximum (whiskers), and individual values (dots). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$

3.2 | Biological measurements

3.2.1 | Biochemical analyses

The Friedman test showed a significant effect of time on CK ($p < 0.001$, $\chi^2 = 31.91$, Kendall's W = 0.97), Mb ($p < 0.001$, $\chi^2 = 30.00$, Kendall's W = 1.0) (Figure 3A), hs-cTnT ($p < 0.001$, $\chi^2 = 28.90$, Kendall's W = 0.88), Cr ($p < 0.001$, $\chi^2 = 23.53$, Kendall's W = 0.71), and eGFR ($p < 0.001$, $\chi^2 = 24.63$, Kendall's W = 0.75). CK activity was significantly higher between PRE (137 ± 112 U/L; Table 2) and POST (53,239 ± 63,608 U/L, $p < 0.001$) and 24 h (19 432 ± 20 947 U/L, $p = 0.003$), but there was no significant difference between the PRE and 48 h (9456 ± 13 767 U/L, $p = 0.29$) values (Figure 3A). Mb concentrations were significantly higher between PRE (34 ± 19 ng/ml; Table 2) and POST (9,748 ± 7997 ng/mL, $p < 0.001$) and 24 h (669 ± 585 ng/ml, $p = 0.002$) but were not significantly different between PRE and 48 h (242 ± 255 ng/ml, $p = 0.42$) values (Figure 3B). The hs-cTnT values were significantly higher in POST (34.1 ± 18.3 ng/L) compared with PRE (6.3 ± 2.3 ng/L, $p < 0.001$; Table 2), but there was no significant difference between PRE and 24 h (14.6 ± 8.0 ng/L,

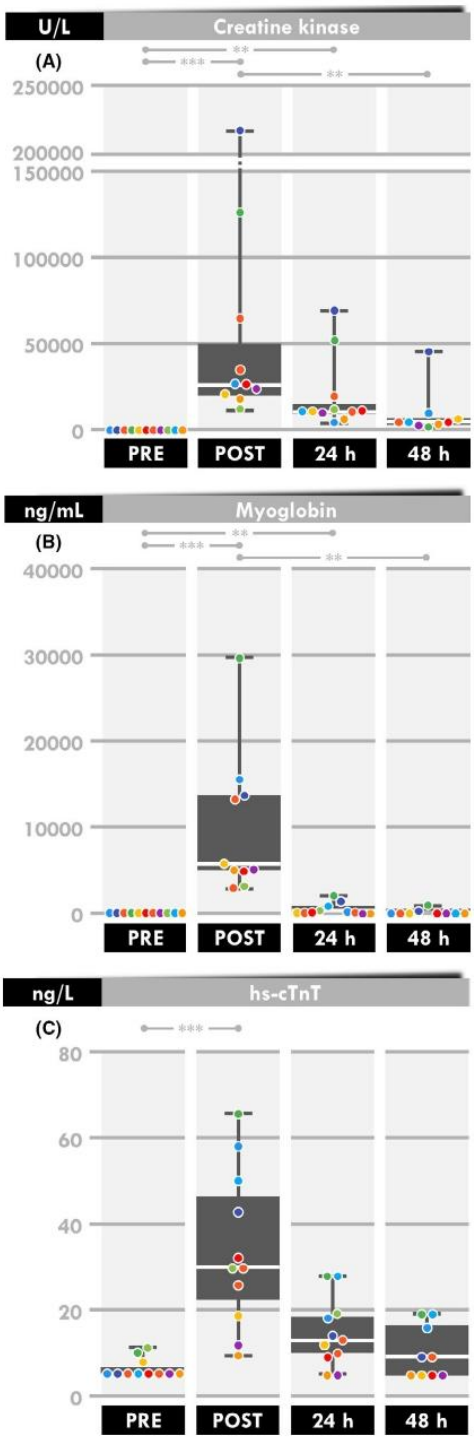


FIGURE 3 Changes in creatine kinase activity (A), myoglobin concentration (B), and high-sensitive cardiac troponin T (hs-cTnT) concentration (C) after the 24-h ultramarathon run. Data are expressed as interquartile ranges (25th and 75th percentiles, colored boxes), medians (horizontal white bars), minimum–maximum (whiskers), and individual values (dots). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$

$p = 0.06$) or 48 h (8.3 ± 6.9 ng/L, $p = 1.00$) values (Figure 3C). There were no significant differences in Cr levels between PRE (75.6 ± 14.3 µmol/L; Table 2) and POST (89.7 ± 15.0 µmol/L, $p = 0.12$), 24 h (75.0 ± 18.1 µmol/L, $p = 1.00$), or 48 h (67.2 ± 13.8 µmol/L, $p = 0.10$), but the values were significantly lower at 24 h and 48 h than at POST (24 h: $p = 0.008$, 48 h: $p < 0.001$). Similarly, there were no significant differences in the eGFR between PRE (93.8 ± 9.9 ml/min/1.73 m²) and POST (78.0 ± 12.8 ml/min/1.73 m², $p = 0.12$), 24 h (94.9 ± 13.0 ml/min/1.73 m², $p = 1.00$), or 48 h (102.6 ± 8.9 ml/min/1.73 m², $p = 0.06$), but the values were significantly lower at 24 and 48 h than at POST (24 h: $p = 0.01$, 48 h: $p < < 0.001$).

3.2.2 | Circulating miRNA levels

The Friedman test showed a significant effect of time on the levels of hsa-miR-1-3p ($p < 0.001$, $\chi^2 = 23.18$, Kendall's W = 0.70), hsa-miR-133a-3p ($p < 0.001$, $\chi^2 = 24.49$, Kendall's W = 0.74), hsa-miR-133b ($p < 0.001$, $\chi^2 = 24.05$, Kendall's W = 0.73), hsa-miR-206 ($p < 0.001$, $\chi^2 = 22.75$, Kendall's W = 0.69), hsa-miR-208a-3p ($p < 0.001$, $\chi^2 = 20.78$, Kendall's W = 0.63), hsa-miR-208b-3p ($p < 0.001$, $\chi^2 = 26.02$, Kendall's W = 0.79), hsa-miR-378-3p ($p < 0.001$, $\chi^2 = 21.87$, Kendall's W = 0.66), and hsa-miR-499a-5p ($p < 0.001$, $\chi^2 = 28.96$, Kendall's W = 0.88). We observed a significant increase in circulating miRNA levels (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378-3p, and hsa-miR-499a-5p) immediately after the 24-h run (fold changes to PRE: 18 to 124,723, $p < 0.001$). Circulating levels of hsa-miR-499a-5p remained elevated ($p = 0.02$) and hsa-miR-208b-3p tended to remain elevated ($p = 0.08$) 24 h after the end of the run (Figure 4).

3.3 | Correlations with reduced jump height

Circulating levels of hsa-miR-208a-3p and 208b-3p at the end of the 24-h ultramarathon significantly correlated with the reduction in CMJ height at 24 h ($p < 0.05$) and approached significance for hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, and hsa-miR-499a-5p ($p < 0.07$) (Figure 5). However, none of these myomiRs were correlated with CMJ height measured immediately after the race. We found no significant correlation between the reduction in CMJ height at 24 h and CK ($p = 0.23$) or Mb

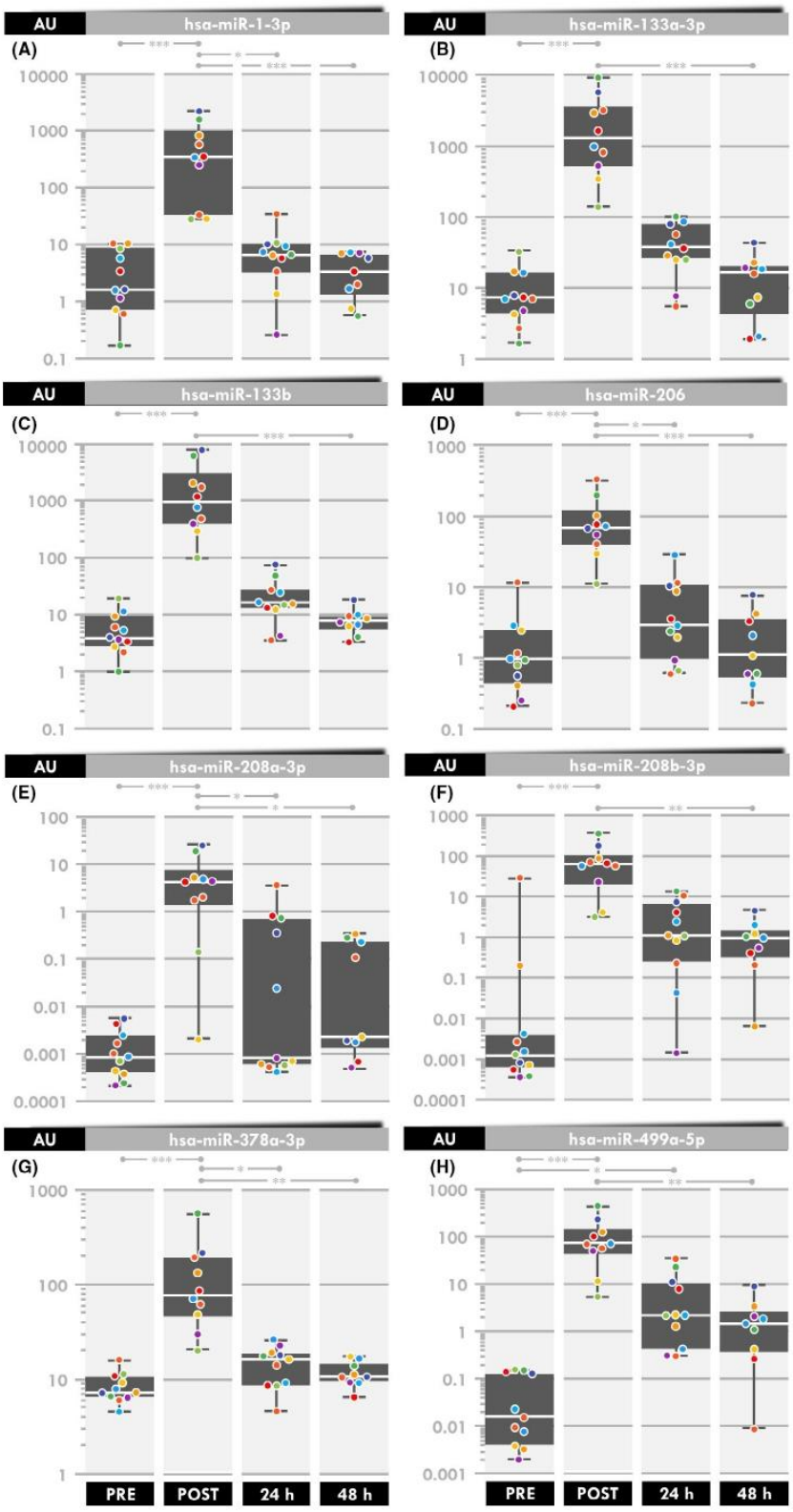

AU
hsa-miR-1-3p
(A)
AU
hsa-miR-133a-3p
(B)
AU
hsa-miR-133b
(C)
AU
hsa-miR-206
(D)
AU
hsa-miR-208a-3p
(E)
AU
hsa-miR-208b-3p
(F)
AU
hsa-miR-378a-3p
(G)
AU
hsa-miR-499a-5p
(H)
PRE
POST
24 h
48 h

FIGURE 4 Changes in plasma miRNA levels after the 24-h ultramarathon run for homo sapiens (hsa)-miR-1-3p (A), hsa-miR-133a-3p (B), hsa-miR-133b (C), hsa-miR-206 (D), hsa-miR-208a-3p (E), hsa-miR-208b-3p (F), hsa-miR-378a-3p (G), and hsa-miR-499a-5p (H). Data are expressed as the relative abundance arbitrary unit (AU) and are displayed as interquartile ranges (25th and 75th percentiles, colored boxes), medians (horizontal white bars), minimum, maximum (whiskers), and individual values (dots). $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$

($p = 0.31$) levels measured at the end of the 24-h ultramarathon (Figure 5). Finally, no significant correlations were found between CK, Mb, cTnT, muscle soreness, and myomiRs at each time points.

4 | DISCUSSION

The main purpose of this study was to investigate the relevance of circulating miRNA levels as biomarkers of muscle damage. We observed an increase in the level of all our target muscle-specific miRNAs immediately after the end of the exercise, which often correlated with muscle function measured 24 h after the end of the ultramarathon race. By contrast, CK and Mb levels did not correlate with muscle function, confirming the hypothesis that myomiR levels may be more representative of muscle damage than most commonly used biomarkers. Our second objective was to examine the acute response of skeletal/cardiac muscle and kidney biomarkers to the 24-h run World Championships in elite athletes. The

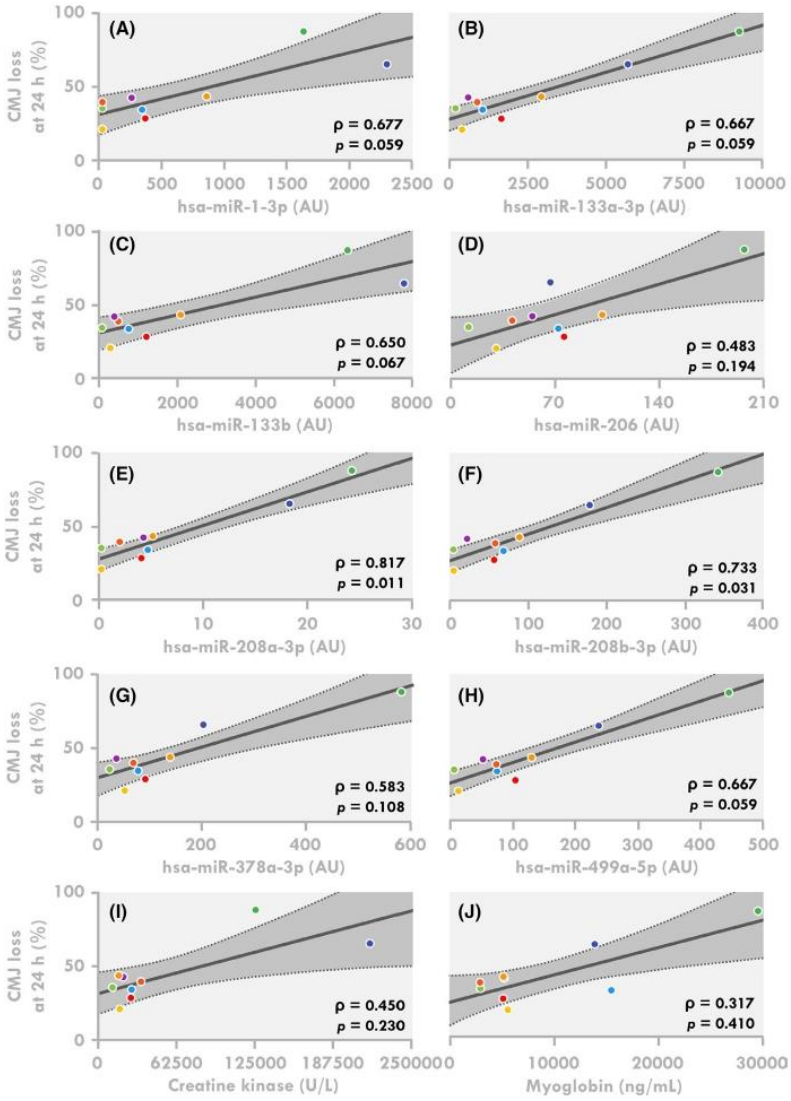


FIGURE 5 Correlation between the magnitude of the reduction in countermovement jump (CMJ) height measured 24 h after the end of the 24-h ultramarathon run and plasma miRNA levels measured immediately after the end of the race. Data are displayed for homo sapiens (hsa)-miR-1-3p (A), hsa-miR-133a-3p (B), hsa-miR-133b (C), hsa-miR-206 (D), hsa-miR-208a-3p (E), hsa-miR-208b-3p (F), hsa-miR-378a-3p (G), hsa-miR-499a-5p (H), creatine kinase (I), and myoglobin (J). CMJ height loss values are expressed as %PRE, plasma miRNA levels as relative abundance arbitrary unit (AU), creatine kinase activity as U/L, and myoglobin concentration as (ng/ml)

results confirm the hypothesis that all participants would be diagnosed with exertional rhabdomyolysis immediately after the race, based on increases in CK and Mb levels.[14] Hs-cTnT values measured immediately after the race were higher than the 99th percentile upper reference limit (URL), suggesting a high level of cardiac stress. The normal Cr and eGFR values reported after the race suggest that no significant deterioration of kidney function was induced by the 24-h ultramarathon run. Moreover, despite the high level of sarcoplasmic proteins in the bloodstream, kidney function did not seem to be significantly affected.

4.1 | Acute effect of an ultramarathon on muscle and kidney

In our study, muscle function measured 24 h after the end of the exercise was reduced by ~44% and was still diminished by ~30% 48 h post-exercise. Only one study has previously described the recovery of lower-limb muscle function in the days following an ultramarathon run.[12] The authors[12] assessed muscle function differently from our study and reported a smaller decrease in muscle function (a loss of ~10%–15% of knee extension and plantar flexion torque at 48 h post-exercise). This smaller reduction in muscle function is consistent with the smaller CK activity (~16 000 U/L vs. ~43 000 U/L) and Mb concentration (~1400 ng/ml vs. ~9700 ng/ml) measured immediately after the 166-km mountain ultramarathon[12] relative to the results reported here, which suggests a higher degree of muscle damage in our study.

Indeed, all our participants were diagnosed with exertional rhabdomyolysis (CK >10 000 U/L) immediately after the race and 8 of 11 still had CK levels above 10 000 U/L 24 h later. A 24-h ultramarathon run is known to induce exertional rhabdomyolysis. However, the CK and Mb responses were higher in our study than those of Martin et al. [3] and Waśkiewicz et al.[4] The higher distance covered by our athletes relative to those of the above-mentioned studies [3,4] (~230 km vs. 150–170 km) may explain the higher CK activity. Indeed, the duration of exercise may increase the degree of muscle damage.[27] Accordingly, the CK activity observed after the race in our study is consistent with the values reported after the 246-km Spartathlon running race.[28] On the other hand, despite the higher level of muscle damage markers observed after the 24-h ultramarathon relative to those reported by Millet et al.,[12] our participants reported a similar level of muscle soreness, suggesting that elite athletes are less susceptible to muscle soreness.

Despite the large increase in intramuscular protein content in the blood, in particular Mb, only 1 of 11 participants showed a significant change in acute kidney injury biomarker levels immediately after the race (absolute increase in Cr: 29 µmol, eGFR: 60 ml/min/1.73 m²). These biomarker values were not beyond the pathological limit (defined by an absolute increase in Cr >26.5 µmol and eGFR <60 ml/min/1.73 m²)[9] for the 10 other athletes and returned to normal 24 h after the ultramarathon for all runners. The transient and low-to-moderate alterations of kidney function we observed in the elite athletes are different than those observed by Hoffman and Weiss.[29] Indeed, they reported that more than 40% of the 585 runners were diagnosed with acute kidney injury, whereas none of our participants met the criterion (1.5X baseline Cr values). Although our study was not designed to assess this question, external (e.g., race characteristics, environmental conditions) or internal factors (e.g., training level, genetic profiles, sex) may at least partially explain these discrepancies.[7]

All our participants presented a hs-cTnT value higher than the 99th percentile URL (10 ng/g for women and 15 ng/L for men[30]) at this time point, whereas none of them showed any such values before the race. Our results thus suggest a high level of cardiac stress immediately after the 24-h ultramarathon race. This finding is consistent with the increase in cardiac-specific troponin T levels observed immediately after another 24-h ultramarathon run.[5] Although the troponin assay was of a different generation in this study, the values for well-trained athletes (~0.01 ng/ml[5]) were comparable to our values (34 ng/L). Indeed, Sandoval et al.[30] reported that a hs-cTnT value of 30 ng/L is similar to a fourth-generation troponin T value of 0.01 ng/mL. However, the values we measured immediately after the race were lower than those reported after a marathon run (~60 ng/L vs. 34 ng/L[31]). This is probably due to the lower exercise intensity during an ultra-long distance run than during a marathon.[32] In our study, the hs-cTnT values measured 24 and 48 h after the end of the race decreased relatively rapidly (Figure 3C). Only 6 of the 11 participants still had values above the 99th percentile URL at 24 h and only three of them at 48 h. Consequently, the relatively small increase in hs-cTnT levels relative to the MI cutoff threshold (> 100 ng/L[30]), the rapid recovery kinetics (Figure 3C), and the absence of symptoms in our study suggest the non-pathological release of cTnT that is likely explained by the release of unbound cytosolic cTnT rather than cardiomyocyte necrosis.[32]

4.2 | Change in circulating miRNA levels

The levels of all our target plasma miRNAs significantly increased immediately after the race relative to baseline values, suggesting that myomiR levels are sensitive to ultra-endurance exercise. This response to exercise has been already observed under various conditions of exercise.[18,25,33-35] Although no study has investigated circulating myomiR levels after ultra-endurance races (known to be a good model of muscle damage[3,12]), several have shown an increase after

marathon runs.[25,34,35] Similar to our results, these studies described an increase in circulating miR-1, miR-133a, miR-206, miR-208b, and miR-499a immediately after the exercise. However, the magnitude of the increase was smaller than that reported here, maybe due to shorter exercise duration and therefore less exercise-induced muscle damage and/or a shorter duration of release. Indeed, these studies [25,34,35] reported lower CK responses (~600 U/L, ~4X baseline value, ~2000 U/L) than observed in our study. Circulating miRNA has often been reported to have a short half-life in the blood and a large body of evidence suggests rapid clearance from the circulation following acute tissue injury (skeletal and cardiac muscles and liver), possibly through renal elimination[36] or tissue uptake/biodistribution.[37] However, the clearance mechanisms of circulating miRNA are poorly understood and it cannot be excluded that the rate of miRNA liberation into the blood exceeds the rate of clearance in the context of EIMD extended over 24 h. On the other hand, not all previous studies that investigated miRNA responses after exercise interpreted elevated levels of circulating miRNA as being indicative of muscle damage. For example, Mooren et al.[25] suggested that myomiRs could be biomarkers of aerobic exercise capacity. Ramos et al.[33] showed that circulating miR-1 and miR-133a levels were related to the intensity and duration of endurance running, suggesting that miRNAs could mediate physiological adaptation to exercise. Indeed, Guescini et al.[38] showed that extracellular vesicles originating from the skeletal muscle may be enriched in myomiRs, which are known to be involved in muscle homeostasis.[39]

Whether the circulating miRNAs quantified in our study are released in the blood due to active secretion or passively leaked from injured myocytes due to EIMD cannot be determined with the current experimental setting. However, post-exercise fold changes reported in the previous studies[19,25,33] were considerably lower than those reported here (fold changes: 18–124 723). Ramos et al.[33] found that miR-1 and miR-133a fold changes were up to 5 after 90 min running, and other authors (Baggish et al.[19]; De Gonzalo-Calvo et al.[40]) found that miR-1, miR-133a, mir-133b, and miR-499 fold changes were up to 18.5 after a marathon run. Thus, the large increases in circulating miRNA levels that we observed were unlikely solely due to exercise-induced secretion[33] but also due to leakage from injured myocytes.[18] Indeed, the increase in circulating miRNA levels observed after the 24-h ultramarathon in our study is higher than that reported after toxic muscle injury in rats.[20] High circulating miRNA levels have also been reported in human studies on pathological[21,22] and physiological[18] muscle damage. Banzet et al.[18] reported an elevation in the level of several circulating myomiRs in the plasma after an eccentric exercise known to induce EIMD but not after a concentric exercise. A positive correlation was found between miR-133a and CK levels [25] and between miR-1/miR-133a and CK/troponin T levels,[35] suggesting that these myomiRs may be useful for the diagnosis of muscle damage and cardiac stress. Although we did not find a correlation between myomiR and CK/troponin T levels in our study, the positive correlations observed between the level of some myomiRs and muscle function loss 24 h after the race suggest that circulating myomiRs were representative of the level of muscle damage. However, whether the release was actively secreted by or passively leaked out of injured myocytes remains to be documented.

4.3 | Interest of biomarkers of delayed muscle function loss

In the present study, the CK activity and Mb concentration measured immediately after the end of exercise did not correlate with the muscle function measured 24 h later, suggesting that these biomarkers do not reflect the magnitude of exercise-induced muscle damage. These results are consistent with those of Damas et al.,[16] who observed high interindividual variability of CK activity relative to the degree of muscle function loss after eccentric elbow flexor contractions. Our results are also consistent with the lack of an accepted cutoff threshold for CK activity (eg, 5-10X the upper limit range or >5000–10 000 U/L)[14] and Mb concentration (400–4000 ng/ml)[15] to determine a pathological state. Thus, although these commonly used biomarkers of exertional rhabdomyolysis are still of great utility to detect the presence of muscle damage their ability to quantify the magnitude of muscle damage appears to be limited.

We found significant or nearly significant correlations between the level of most of our target circulating miRNAs measured immediately after the 24-h ultramarathon and muscle function measured 24 h later. However, we found no correlations between loss of muscle function at 24 h and CK activities or Mb levels, suggesting that myomiRs may be more relevant than CK or Mb to represent the magnitude of muscle damage in our study (Figure 5). Although more studies are required to confirm this assumption, these results are consistent with those of Siracusa et al.,[20] who reported that the accuracy in discriminating damaged from nondamaged muscle in rats was lower for CK than myomiRs. Moreover, our results are also concordant with those of another study,[18] which reported that circulating myomiR levels are able to discriminate between uphill and downhill walking exercises, whereas CK activity and Mb concentration were not, suggesting that myomiRs may be more sensitive and specific to muscle damage.

In addition, hsa-miR-206, hsa-miR-208b-3p, and hsa-miR-499a-5p may be of additional interest due to their low circulating levels, as they are often undetectable in the absence of muscle damage (Figure 4).[18,20] Indeed, it has been shown that hsa-miR-206 was undetectable after low-level

muscle damage (loss of ~15% of muscle function at 24 h[18]), whereas a high level was detected after a marathon run [25] and in the present study. Moreover, hsa-miR-208b-3p and hsa-miR-499a-5p appear to have additional utility relative to other myomiRs because their plasma levels were still elevated 24 h after the end of the 24-h ultramarathon (Figure 4). We found no significant correlation between the circulating levels of these miRNAs measured 24 h after the end of the ultramarathon and muscle function, suggesting limited utility for monitoring recovery after muscle injury (24–48 h). Previous work has shown that some myomiRs could remain elevated up to 24 h after tissue injury. For instance, miR-1 was still elevated at 24 h in the serum of rats after an acute myocardial infarctus (Cheng et al.[41]). Similar patterns were also reported in the plasma of rats following an acute myotoxic injury, where miR-208b remained elevated at 24 h but not the others myomiRs (Siracusa et al.[20]). However, there are no strong arguments to explain these kinetics. MyomiRs appear to exert various roles in muscle biology. For instance, miR-1 and miR-206 target Pax3 during the process of myogenesis (Goljanek-Whysall et al.[42]), while miR-208b and miR-499 have a redundant role in maintaining slow myofiber and repressing fast myofiber phenotype (Van Rooij et al.[43]). Given that the circulating levels of all our myomiRs correlated well with each other, it may not be necessary to simultaneously measure them all in clinical practice. As suggested by Siracusa et al.,[20] the assessment of cardiac-specific and skeletal muscle-specific miRNA (ie, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, and hsa-miR-133b or miR-206) could provide sufficient information to diagnose muscle damage.

Surprisingly, hsa-miR-208a-3p strongly correlated with muscle function in the present study, although this myomiR is cardiac-specific[22] and is not detected after toxic muscle injury in rats[20] and downhill walking in humans.[18] It is possible that subjects exhibiting high levels of cardiac stress were also those who underwent a high degree of muscle damage. Covariates, such as exercise intensity or training experience, may affect both muscle damage[44] and cardiac stress[32] and may therefore explain this surprising correlation. We found no significant correlation between hs-cTnT levels measured immediately after the race and CMJ measured 24 h later, which does not support this hypothesis. However, no correlation has been found between miR-208a, troponin, and cardiac function parameters in acute myocardial infarction and coronary heart disease.[45] Consequently, more studies are required to interpret the magnitude of the change in the levels of cardiac damage biomarkers.

4.4 | Limitations of the study

Our study had several limitations. First, we included a relatively small number of participants due to the limited number of athletes on the French national team, which did not allow to test a potential effect of sex. However, Duttagupta et al.[46] showed that myomiRs were not mentioned among miRNAs differently expressed between males and females. Nielsen et al.[47] found an effect of sex on myomiR expression (mice; 133a and 133b) in resting skeletal muscle in relation to testosterone; however, they also found that aerobic exercise training seems to override any effects of testosterone. Therefore, it seems that the potential difference in myomiR expression in skeletal muscle does not seem to translate into a different circulating myomiR level. Moreover, Siracusa et al.[20] found similar circulating myomiR levels between female and male rats at baseline and in response to muscle damage. Taken together, these results suggest that circulating myomiRs were likely not substantially affected by sex in our study. Second, the experimental group of this study was restricted to elite athletes in a world championship context. On one hand, more studies are required to determine whether the present miRNA results may be replicated and applied to a wider population. On the other hand, this kind of competitive event may lead to an important physiological stress. Therefore, it could induce health problems requiring rigorous medical monitoring.[7] In this context, the assessment of scientific measures could be secondary and therefore reduce the access to the athletes. Third, as dietary intakes were not controlled during the present race because it is impossible in the context of ultra-endurance competitions (Lavoue et al.[2]), interindividual differences could have affected circulating miRNA levels (Mantilla-Escalente et al.[48]). Fourth, despite the use of a reliable and reproducible RT-qPCR normalization technique,[49] it is impossible to compare results from different studies without considering control values (i.e., healthy resting subject values). Therefore, no clinical recommendation can be provided with this type of normalization. Finally, as plasma miRNA level assessment is a long process (~6 h; including RNA extraction and RT-qPCR), this biomarker is not compatible with medical emergency (e.g., exertional rhabdomyolysis, acute kidney injury). Therefore, further research is needed for the development of faster analytic methods that may be appropriate for point-of-care tests. Recently developed novel PCR-free techniques[50] may allow more widespread use of circulating miRNA as biomarkers of muscle damage in the future.

5 | PERSPECTIVES

All elite ultramarathon runners included in our study were diagnosed with exertional rhabdomyolysis (CK >10 000 U/L) after the 24-h run World Championships. However, despite the high level of sarcoplasmic proteins in the bloodstream, the deterioration of kidney function was relatively moderate and transient in this population. Further research is needed to investigate factors explaining the

potential lower susceptibility of world-class/elite athletes to acute kidney injury. The elevation of cardiac biomarkers was likely due to exercise-related cytosolic release rather than cardiac necrosis. Importantly, the present study is the first to show that muscle-specific miRNAs were more associated with the magnitude of muscle function loss than CK and Mb, suggesting that myomiRs may be useful to approach the magnitude of muscle damage. Specifically, the assessment of both cardiac-specific and skeletal muscle-specific miRNAs such as hsa-miR-208a, hsa-miR-208b and hsa-miR-133b, or hsa-miR-206 could be a good approach to diagnose muscle damage.

MyomiRs may have a future interest in the diagnosis of muscle damage both in sport medicine and in the monitoring of physical activity. However, further research is needed for a better understanding of the release mechanisms and intercellular communication roles of these circulating miRNAs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the athletes and technical staff of Emmanuel FONTAINE, Patrice BINELLI, Frédéric BARREDA, and Cindie DECHAMBRE for their time. We also thank Laura BILLON, Carole BOIVERT, Pascal CHOURROUT, and the IRBA Molecular Biology Unit for their technical support. Finally, we thank Keyne CHARLOT (Laboratoire Graphique) for designing the figures.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise. Furthermore, the authors declare that the results of the study are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Emeric Chalchat https://orcid.org/0000-0002-5747-0236

REFERENCES

1. Bossi AH, Matta GG, Millet GY, et al. Pacing strategy during 24-hour ultramarathon-distance running. *Int J Sports Physiol Perform*. 2017;12(5):590-596.
2. Lavoué C, Siracusa J, Chalchat É, Bourrilhon C, Charlot K. Analysis of food and fluid intake in elite ultra-endurance runners during a 24-h world championship. *J Int Soc Sports Nutr*. 2020;17(1):36.
3. Martin V, Kerherve H, Messonnier LA, et al. Central and peripheral contributions to neuromuscular fatigue induced by a 24-h treadmill run. *J Appl Physiol*. 2010;108(5):1224-1233.
4. Waśkiewicz Z, Kłapcińska B, Sadowska-Krępa E, et al. Acute metabolic responses to a 24-h ultra-marathon race in male amateur runners. *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(5):1679-1688.
5. Hohl R, Nazario de Rezende F, Millet GY, Ribeiro da Mota G, Marocolo M. Blood cardiac biomarkers responses are associated with 24 h ultramarathon performance. *Heliyon*. 2019;5(6):e01913.
6. Donnellan E, Phelan D. Biomarkers of cardiac stress and injury in athletes: What do they mean? *Curr Heart Fail Rep*. 2018;15(2):116-122.
7. Rojas-Valverde D, Sanchez-Urena B, Crowe J, Timon R, Olcina GJ. Exertional rhabdomyolysis and acute kidney injury in endurance sports: a systematic review. *European Journal of Sport Science*. 2020;21(2):261-274.
8. Petejova N, Martinek A. Acute kidney injury due to rhabdomyolysis and renal replacement therapy: a critical review. *Crit Care*. 2014;18(3):224.
9. Makris K, Spanou L. Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes. *Clin Biochem Rev*. 2016;37(2):85-98.
10. Maeo S, Yamamoto M, Kanehisa H. Downhill walking training with and without exercise-induced muscle damage similarly increase knee extensor strength. *J Sports Sci*. 2016;34(21):2018-2026.
11. Warren GL, Lowe DA, Armstrong RB. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Medicine*. 1999;27(1):43-59.
12. Millet GY, Tomazin K, Verges S, et al. Neuromuscular consequences of an extreme mountain ultra-marathon. *PLoS One*. 2011;6(2):e17059.
13. Lippi G, Schena F, Ceriotti F. Diagnostic biomarkers of muscle injury and exertional rhabdomyolysis. *Clin Chem Lab Med*. 2018;57(2):175-182.
14. Stahl K, Rastelli E, Schoser B. A systematic review on the definition of rhabdomyolysis. *J Neurol*. 2020;267(4):877-882.
15. Servonnet A, Dubost C, Martin G, et al. Myoglobin: still a useful biomarker in 2017? *Ann Biol Clin*. 2018;76(2):137-141.
16. Damas F, Nosaka K, Libardi CA, Chen TC, Ugrinowitsch C. Susceptibility to exercise-induced muscle damage: a cluster analysis with a large sample. *Int J Sports Med*. 2016;37(8):633-640.
17. Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise Immunology Review*. 2012;18:42-97.
18. Banzet S, Chennaoui M, Girard O, et al. Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. *J Appl Physiol*. 2013;115(9):1237-1244.
19. Baggish AL, Park J, Min PK, et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol*. 2014;116(5):522-531.
20. Siracusa J, Koulmann N, Bourdon S, Goriot ME, Banzet S. Circulating miRNAs as biomarkers of acute muscle damage in rats. *Am J Pathol*. 2016;186(5):1313-1327.
21. Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, et al. miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med*. 2011;3(5):258-265.
22. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31(22):2765-2773.
23. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation*. 2010;3(6):499-506.
24. Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA*. 2008;14(1):35-42.

25. Mooren FC, Viereck J, Kruger K, Thum T. Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306(4):H557-563.
26. De Ronde MWJ, Ruijter JM, Lanfear D, et al. Practical data handling pipeline improves performance of qPCR-based circulating miRNA measurements. *RNA*. 2017;23(5):811-821.
27. Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002;81(11 Suppl):S52-69.
28. Skenderi KP, Kavouras SA, Anastasiou CA, Yiannakouris N, Matalas AL. Exertional Rhabdomyolysis during a 246-km continuous running race. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38(6):1054-1057.
29. Hoffman MD, Weiss RH. Does acute kidney injury from an ultramarathon increase the risk for greater subsequent injury? *Clin J Sport Med*. 2016;26(5):417-422.
30. Sandoval Y, Jaffe AS. Using high-sensitivity cardiac troponin T for acute cardiac care. *Am J Med*. 2017;130(12):1358-1365.e1351.
31. Baker P, Leckie T, Harrington D, Richardson A. Exercise-induced cardiac troponin elevation: An update on the evidence, mechanism and implications. *Int J Cardiol*. 2019;22:181-186.
32. Gresslien T, Agewall S. Troponin and exercise. *Int J Cardiol*. 2016;221:609-621.
33. Ramos AE, Lo C, Estephan LE, et al. Specific circulating microRNAs display dose-dependent responses to variable intensity and duration of endurance exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(2):H273-H283.
34. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol*. 2011;589(Pt 16):3983-3994.
35. Clauss S, Wakili R, Hildebrand B, et al. MicroRNAs as biomarkers for acute atrial remodeling in marathon runners (the Mirathon Study–a sub-study of the Munich Marathon Study). *PLoS One*. 2016;11(2):e0148599.
36. Cheng Y, Wang X, Yang J, et al. A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;53(5):668-676.
37. Bala S, Csak T, Momen-Heravi F, et al. Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice. *Sci Rep*. 2015;5:10721.
38. Guescini M, Canonico B, Lucertini F, et al. Muscle releases alpha-sarcoglycan positive extracellular vesicles carrying miRNAs in the bloodstream. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125094.
39. Diniz GP, Wang DZ. Regulation of skeletal muscle by microRNAs. *Compreh Physiol*. 2016;6(3):1279-1294.
40. de Gonzalo-Calvo D, Dávalos A, Montero A, et al. Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. *J Appl Physiol*. 2015;119(2):124-134.
41. Cheng Y, Tan N, Yang J, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci*. 2010;119(2):87-95.
42. Goljanek-Whysall K, Sweetman D, Abu-Elmagd M, et al. MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(29):11936-11941.
43. van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*. 2009;17(5):662-673.
44. Ertel KA, Hallam JE, Hillman AR. The effects of training status and exercise intensity on exercise-induced muscle damage. *J Sports Med Phys Fit*. 2020;60(3):449-455.
45. Nabiałek E, Wańha W, Kula D, et al. Circulating microRNAs (miR-423-5p, miR-208a and miR-1) in acute myocardial infarction and stable coronary heart disease. *Min Cardioangiol*. 2013;61(6):627-637.
46. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One*. 2011;6(6):e20769.
47. Nielsen S, Hvid T, Kelly M, et al. Muscle specific miRNAs are induced by testosterone and independently upregulated by age. *Front Physiol*. 2013;4:394.
48. Mantilla-Escalante DC, de Las L, Hazas MC, et al. Postprandial circulating miRNAs in response to a dietary fat challenge. *Nutrients*. 2019;11(6):1326.
49. Faraldi M, Gomarasca M, Banfi G, Lombardi G. Free circulating miRNAs measurement in clinical settings: the still unsolved issue of the normalization. *Adv Clin Chem*. 2018;87:113-139.
50. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, Calin GA. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(9):541-563.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Chalchat E, Charlot K, Garcia-Vicencio S, et al. Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes. *Scand J Med Sci Sports*. 2021;00:1–14. https://doi.org/10.1111/sms.14000

C. Annexe 5 : Étude 3a

Circulating microRNAs levels after exercise-induced muscle damage and the repeated bout effect. **Chalchat E**, Martin V, Charlot K, Bourrilhon C, Baugé S, Bourdon S, Gruel A, Lepetit B, Banzet S, Garcia-Vicencio S, Siracusa J. Soumis dans l'*American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* le 29/04/2022.

Circulating microRNA levels after exercise-induced muscle damage and the repeated bout effect

Emeric Chalchat[1,2*], Vincent Martin[2,3], Keyne Charlot[1,4], Cyprien Bourrilhon[1,4], Stéphane Baugé[1,4], Stéphanie Bourdon[1,4], Arnaud Gruel[1,4], Benoit Lepetit[1,4], Sébastien Banzet[5,6], Sebastian Garcia-Vicencio[1,4,7,#], and Julien Siracusa[1,4, #]

[1] Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Unité de Physiologie des Exercices et Activités en Conditions Extrêmes, Département Environnements Opérationnels, 91223 Bretigny-Sur-Orge, France

[2] Université Clermont Auvergne, AME2P, F-63000, Clermont-Ferrand, France

[3] Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

[4] LBEPS, Univ Evry, IRBA, Université Paris Saclay, 91025 Evry, France

[5]Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Clamart, France

[6]INSERM UMRS-MD 1197, Université de Paris-Saclay, Clamart, France

[7]Human Motion Analysis, Humanfab, Aix-en-Provence, France

[#]These authors contributed equally to this work and share last authorship.

***Corresponding author**

Emeric Chalchat, PhD

Institut de Recherche Biomédicale des Armées,

1 place du général Valérie André,

91223 Bretigny-Sur-Orge, France

Phone: + 33 (0)178651458

Fax: +33 (0)178651643

E-mail: emchalchat@gmail.com

Running title: Circulating microRNA levels after EIMD

Abstract

Introduction: The neuromuscular system is able to quickly adapt to exercise-induced muscle damage (EIMD), such that it is less affected by subsequent damaging exercise, a phenomenon known as the repeated bout effect (RBE). Circulating muscle-specific microRNAs (myomiRs) may be able to potentially predict the long-lasting maximal voluntary contraction (MVC) torque deficit (> 24 h), an indicator of EIMD. We aimed to investigate: (1) how plasma myomiR levels are modified by the RBE and (2) whether plasma myomiRs can predict the long-lasting MVC torque deficit.

Methods: Nineteen participants performed two identical bouts of loaded downhill walking separated by two weeks. MVC torque, creatine kinase (CK) activity, myoglobin (Mb) concentration, and myomiR levels were measured before and up to 48h after exercise. Correlation and multiple regression analyses were performed to assess the ability of these markers to predict the largest MVC torque loss beyond 24 h post-exercise.

Results: As MVC torque, CK activity, and the Mb concentration, the level of certain myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p) were less affected after the second bout of exercise relative to the first bout. The CK activity, Mb concentration and level of several myomiR (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-206) correlated with long-lasting MVC torque loss. Multiple regression showed that the best combination included several myomiRs, Mb, and CK.

Conclusion: Certain myomiR levels increased less after exercise bout 2 than after exercise bout 1, indicating the presence of the RBE. The measurement of myomiR levels in combination with Mb concentrations and CK activity could improve the prediction of the long-lasting MVC torque deficit.

Keywords: MyomiRs, creatine kinase, myoglobin, eccentric exercise, biomarkers

Introduction

Performing unaccustomed, prolonged and/or vigorous exercise may result in muscle damage, usually called exercise-induced muscle damage (EIMD). This results in the disruption of structural proteins in muscle fibers and/or connective tissues, characterized by a long-lasting deficit (> 24 h) of force generating capacity[1]. In the clinical and/or sports context, it is important to monitor and accurately quantify the magnitude of EIMD to apply a recovery strategy as early as possible and accordingly modify the training loads of athletes. Long-lasting maximal voluntary contraction (MVC) torque deficit (*i.e.*, > 24 h) is generally considered to be a reliable and valid marker for the magnitude of EIMD[1,2]. However, short-term (*i.e.*, hours following exercise) MVC torque loss does not provide an accurate estimation of EIMD due to the confounding influence of muscle fatigue[2]. Therefore, increases in plasma levels of intramyocellular constituents (*e.g.*, creatine kinase, myoglobin) are often used to evaluate the magnitude of EIMD. However, the ability of these markers to predict the magnitude of the long-lasting MVC torque deficit (*i.e.*, magnitude of EIMD) is limited[3]. It is therefore necessary to search for alternative markers that increase rapidly after the end of exercise (*i.e.*, within the first hours) and accurately predict the magnitude of MVC torque loss at 24 h post-exercise to adapt the recovery strategy and training loads as soon as possible.

MicroRNAs (miRNAs), small noncoding RNAs involved in the post-transcriptional regulation of gene expression, could potentially serve as alternative markers of EIMD[4-6]. Indeed, muscle-specific or muscle-enriched miRNAs (also called myomiRs), such as miR-1, -133a, -133b, -208a, -208b, and -499a[7], can be actively secreted by or passively leak out of injured myocytes and measured in the blood[5,6]. A large increase in plasma myomiRs has been reported in response to various muscle-injury models, such as toxic muscle injury in rats[6] or after prolonged exercise, such as marathon[8-10] and ultra-marathon runs[5]. It has been found that the ability of myomiRs to distinguish damaged from nondamaged muscle is better than that of creatine kinase (CK)[4-6], suggesting that myomiRs could more correctly diagnose muscle damage. However, the ability to predict the magnitude of EIMD, as evaluated by the long-lasting MVC torque deficit, was not evaluated in these studies.

Recently, we reported that myomiRs could better represent the magnitude of height jump loss at 24 h post-exercise (*i.e.*, magnitude of EIMD) than CK or myoglobin (Mb) after a 24-h ultramarathon in 11 elite runners[5]. However, whether these observations from an extreme ultra-endurance exercise can be transposed to the monitoring of milder muscle damage is unknown. Indeed, slight differences in MVC torque loss need to be detected to better adapt the recovery strategies and training loads of athletes. An interesting paradigm to gain insight into the accuracy

of myomiRs to predict the long-lasting (> 24 h) MVC torque deficit is the repeated bout effect (RBE)[11]. The RBE refers to adaptations in which a single "damaging exercise bout" (*e.g.*, eccentrically-biased exercise) confers protection against EIMD from subsequent bouts. Indeed, a repeat bout within the first weeks after the initial bout results in reduced symptoms of EIMD (*e.g.*, torque loss, CK activity, Mb concentration) and enhanced recovery[11]. Although it is known that a second eccentrically-biased exercise bout can result in a reduced level of EIMD, circulating myomiR levels may be lower than after the first bout. Direct evidence is currently lacking to support this assumption.

The aim of the present study was to examine the response of circulating myomiRs after two identical bouts of eccentrically-biased exercise to investigate: (1) how plasma myomiR levels are modified by the RBE and (2) whether plasma myomiR levels can predict the long-lasting MVC torque deficit (> 24 h). We hypothesized that circulating myomiR levels would: (1) increase less after the second bout than after the first of eccentric exercise and (2) display a stronger association with MVC torque loss than conventional markers (*i.e.*, CK activity and Mb concentration).

Materials and methods

Participants

Nineteen young males (age: 31.3 ± 5.6 years, body mass: 78.0 ± 10.7 kg, height: 1.80 ± 0.06 m, body mass index: 24.0 ± 2.3 $kg.m^{-2}$, and fat mass: 16.0 ± 5.1 %) were fully informed of the experimental procedures, gave their written informed consent, and agreed to participate in this study. Participants performed regular activity (between 3 and 8 $h.w^{-1}$), had no recent history of muscular, joint, or bone disorders, and did not take any medication that could affect neuromuscular responses. None of them had experienced strenuous mountain trekking and/or downhill walking (DW) and none had been involved in a resistance-training program in the previous six months. Participants were instructed not to perform unaccustomed activities or any interventions that could affect recovery, such as massage, icing, nutritional supplementation, or nonsteroidal anti-inflammatory drugs, during the experimental period. Breakfast was standardized throughout the experiment. Each participant participated in an inclusion session, consisting of a complete medical examination, including the collection of anthropometric data and complete familiarization with the experimental procedures. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki[12] and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Ile-de-France 8, France, registration number: 2019-A01210-57, SMILE).

Protocol

Participants performed two bouts of DW on a treadmill (pulsar 3p 4.0, HP cosmos, Warwickshire, UK) for 45 min while carrying a load equivalent to 30 % of their body mass (carrying: a weighted vest of 10 % of the body mass and a backpack of 20 % of the body mass) separated by two weeks (Figure 1). The treadmill gradient was set to -25 % and the velocity to 4.5 $km.h^{-1}$ and the participants were instructed to walk at their own preferred stride length and frequency. Five participants were unable to finish the walking bout and performed the first exercise to exhaustion (30.2 ± 8.6 min). These participants performed the same exercise for the same duration during the second exercise. MVC torque was assessed before (PRE), immediately after (POST), and 24 and 48 h after the two bouts. Blood samples were obtained at PRE, POST, and 2, 6, 24, and 48 h after the two exercise bouts.

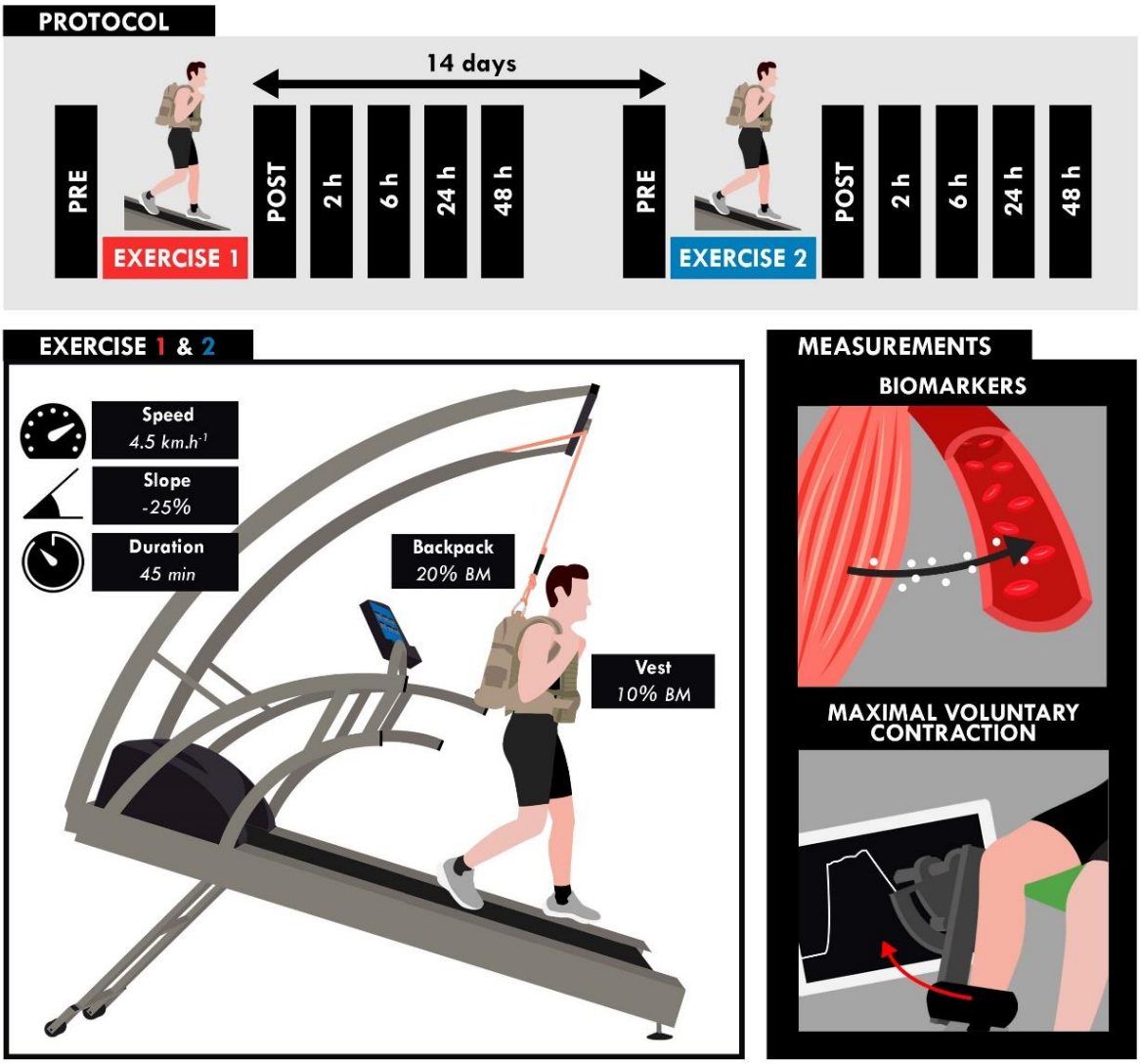


Figure 1. Design of the study. Participants performed two bouts of downhill walking on a treadmill for 45 min while carrying a load equivalent to 30% of their body mass (treadmill gradient: -25%, speed: 4.5 $km.h^{-1}$) separated by two weeks (left). Measurements (right) were assessed at various time points as shown on the timeline (top).

MVC torque

MVC torque was measured using an isokinetic dynamometer (Cybex Norm, Lumex, Ronkonkoma, NY, United States). Participants were comfortably positioned on an adjustable chair with the hip joint flexed at 70° (0° = neutral supine position). The axis of rotation of the dynamometer was aligned with the femoral condyles of the femur and the lever arm was attached 1 to 2 cm above the malleolus with a Velcro strap. Measurements were taken from the participant's right leg, which was fixed at 90° (0° = knee fully extended). Torque data were corrected for gravity, digitized, and exported at a rate of 2 kHz to an external analog-to-digital converter (Powerlab 16/35; ADInstrument, New South Wales, Australia) driven by Labchart pro 8.1 software (ADInstrument, New South Wales, Australia). During each MVC, the participants were instructed to grip the lateral handles of the seat to stabilize the pelvis and strongly encouraged by the investigator. The MVC torque was determined as the peak torque reached during the maximal effort.

Biological measurements

Blood was drawn from the antecubital vein into two separate tubes (5 mL, Becton Dickinson vacutainer, Franklin Lakes, USA), one containing EDTA and the other being a serum-separating tube (SST). Blood in the SST was allowed to clot at ambient temperature for 30 min and centrifuged (2,000 g, 4°C, 10 min). Serum from the STT and EDTA plasma was aliquoted and frozen at -80°C for further analysis. Serum CK activity and Mb concentration were analyzed using an autoanalyzer (Advia 1800; Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) and plasma miRNAs were analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR).

Plasma miRNA extraction

Total RNA was extracted from plasma as previously described[4-6]. Briefly, total RNA was extracted from 200 µl plasma using the mirVana PARIS Kit (Ambion, Austin, USA) and low-binding tubes (1.5 ml; DNA LoBind Tubes, Eppendorf, Hamburg, Germany) according to the manufacturer's protocol. An additional precipitation step was performed as follows. Column elution was performed with 180 µL sterile water. Then, 18 µl 3M sodium acetate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), 396 µl 100% ethanol, and 1 µL GlycoBlue (Ambion) were added. Tubes were vortexed and the RNA allowed to precipitate for 20 min at −20°C. After centrifugation (12,000 g, 4°C, 10 min), the pellet was washed with 400 µL 70 % ethanol and allowed to dry for 30 min. The RNA was finally suspended in 12 µl sterile water, incubated 10 min at 50°C, and frozen at −80°C until cDNA synthesis.

Reverse transcription

cDNA was synthesized from 5 µl total RNA diluted 1:6 in a 10-µl reaction volume, including the UniSp6 RNA spike-in, using the miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol.

Real-time quantitative qPCR

RT-qPCR was performed on a 96-well LightCycler 480 instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) with 4 µL cDNA (diluted 1:40 in sterile water), 1 µl PCR primer mix, and 5 µl 2x miRCURY SYBR Green Master Mix (Qiagen) in a 10 µl reaction volume. We measured hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378a-3p, and hsa-miR-499a-5p. We chose these miRNAs due to their muscle-specific expression[13] and their documented responses to toxic[6] and exercise-related muscle damage[4,5]. The PCR protocol consisted of one activation cycle (95°C, 2 min), 52 amplification cycles (denaturation 95°C, 10 s, and annealing/amplification 56°C, 1 min), and a melting curve analysis step, as recommended by the manufacturer. Undetectable values were handled as described by De Ronde et al.[14] by adding one quantification cycle (Cq) to the highest Cq observed for a miRNA.

The stability of reference miRNAs (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-192-5p, and hsa-miR-320a-3p) was assessed using geNorm, BestKeeper, NormFinder, the ΔCT method, and RefFinder. GeNorm determined that all reference miRNAs were necessary for optimal normalization of the target miRNAs. Final quantification is expressed as arbitrary unit (AU) and consist of the geometrical mean of the quantification performed with each reference miRNA.

Index of protection

To assess the magnitude of the protective effect conferred by the first bout of DW, an index of protection (IP) was calculated for MVC torque using an equation adapted from Chen et al.[15]: [relative changes from PRE after exercise bout 2 - relative changes from PRE after exercise bout 1], with PRE corresponding to 100% and relative changes corresponding to the lower MVC torque value between 24 h and 48 h (*i.e.*, the largest decrease). For example, if the MVC torque represents 70% (*i.e.*, -30 %) of the PRE value after the first exercise and 90% after the second exercise, the calculation is: 90 – 70 = 20. The result indicates that the decrease in MVC torque is attenuated by 20% after the second exercise relative to the first. The equation was adapted because the initial version from Chen et al.[15] was applicable to mean values but not individual values.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed to assess: (1) the changes between the PRE and, POST, 2, 6, 24, and 48 h post-exercise for both DW bouts and (2) the effect of exercise (*i.e.*, DW bout). Due to the absence of a normal distribution according to the Shapiro-Wilk test, we performed a non-parametric Friedman analysis of variance for miRNA, CK activity, and Mb concentration levels. Statistical differences between time points were assessed using Dunn's multiple comparisons test. MVC torque results were analyzed by two-way ANOVA (time × exercise) for paired values. When appropriate, Holm post-hoc tests were applied to test for differences between the means.

Absolute PRE values of exercise bout 1 and exercise bout 2 were compared using a Wilcoxon test to identify the presence of any adaptations from exercise bout 1. Correlations were performed between changes in myomiR levels from PRE exercise bout 1 to PRE exercise bout 2 and the IP for MVC torque to investigate whether long-term adaptations in myomiR levels could be involved in the protection conferred by the initial bout. Similarly, correlations were performed between peak changes in myomiR levels from PRE exercise bout 1 (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378a-3p, and hsa-miR-499a-5p) and the IP for MVC torque to investigate whether myomiR levels could be representative of the adaptations conferred by the initial exercise bout.

Correlations were performed between peak changes in myomiR levels and peak changes in CK activity and Mb concentration (*i.e.*, conventional EIMD markers). Correlations were also performed between the long-lasting MVC torque deficit (> 24 h) and miRNA levels, CK activities, and Mb concentrations measured at POST, 2 h, and 6 h to assess the ability of these markers to predict the largest MVC torque loss beyond 24 h post-exercise. The level of association between parameters was assessed using Spearman's rank correlation coefficient (ρ). To determine whether a combination of circulating markers measured at POST, 2 h, or 6 h post-exercise could improve the prediction of MVC torque loss at 24 h, we performed backward multiple linear regression analyses using IBM SPSS Statistics v26 software (IBM Corp, New York, USA). The independent variables entered into the analyses were hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378a-3p, and hsa-miR-499a-5p levels, CK activity, and Mb concentration. The results are presented as the means ± SD. Significance was defined as $p < 0.05$. Except for multiple linear regression, analyses were performed using GraphPad Prism (Version 8.4.3, GraphPad Software, CA, USA).

Results

PRE exercise measurements

The statistical analyses showed no significant differences between exercise bout 1 and exercise bout 2 for the absolute PRE values of any parameters (Table 1).

Absolute PRE values	Exercise bout 1	Exercise bout 2	p
MVC torque (N.m)	312 ± 51	311 ± 67	0.98
hsa-miR-1-3p (AU)	7.9 ± 6.2	10.0 ± 10.9	0.83
hsa-miR-133a-3p (AU)	14.1 ± 13.0	11.3 ± 9.0	0.77
hsa-miR-133b (AU)	10.0 ± 10.4	10.6 ± 14.0	0.77
hsa-miR-206 (AU)	1.55 ± 2.78	1.09 ± 1.53	0.95
hsa-miR-208a-3p (AU)	0.02 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.83
hsa-miR-208b-3p (AU)	0.26 ± 0.86	0.12 ± 0.41	0.77
hsa-miR-378a-3p (AU)	24.1 ± 14.1	25.5 ± 18.6	0.99
hsa-miR-499a-5p (AU)	0.45 ± 1.27	0.34 ± 1.03	0.80
CK activity (U/L)	200 ± 135	154 ± 52	0.40
Mb concentration (ng/mL)	72 ± 14	71 ± 20	0.42

Table 1. Absolute PRE values of Exercise bout 1 and Exercise bout 2 for all parameters. MVC: maximal voluntary torque, hsa: homo sapiens, CK: creatine kinase, Mb: myoglobin. Results with a P-value < 0.05 were considered significant.

MVC torque

ANOVA showed a significant interaction (time × exercise, $p < 0.001$) for MVC torque (Figure 2). MVC torque was below the baseline value up to 48 h after exercise bout 1, whereas it was only lower immediately after (POST) the second bout of exercise (quicker recovery, Figure 2).

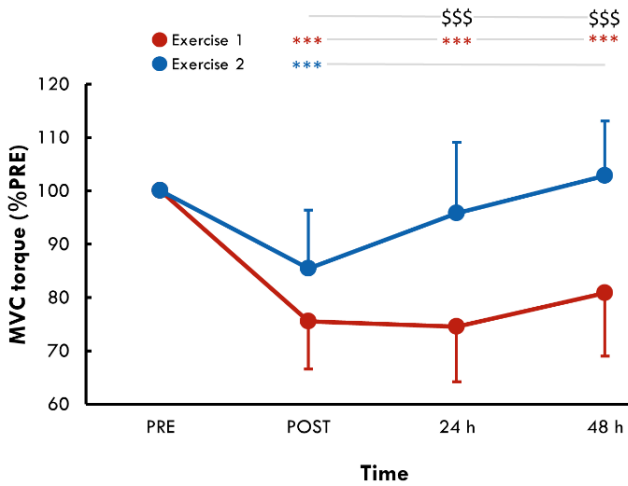


Figure 2. Time-course of maximal voluntary contraction (MVC) torque from PRE to POST, 24 h and 48 h for both exercise bout 1 and exercise bout 2. ***: significantly different from the PRE value: $p < 0.05$, Significant difference between exercise bout 1 and exercise bout 2: $^{\$\$}p < 0.01$.

Circulating miRNA levels

The Friedman test showed a significant effect of time on hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, and hsa-miR-206 levels ($p < 0.001$) (Figure 3) but not for those of hsa-miR-208a-3p ($p = 0.583$), hsa-miR-208b-3p ($p = 0.481$), hsa-miR-378-3p ($p = 0.436$), or hsa-miR-499a-5p ($p = 0.053$) (Supplementary Table 1). After the first bout of exercise, the levels were significantly higher for hsa-miR-1-3p (Figure 3a), hsa-miR-133a-3p (Figure 3b), hsa-miR-133b (Figure 3c), and hsa-miR-206 (Figure 3d) after 2 and 6 h. After the second bout of exercise, the levels were significantly higher for hsa-miR-1-3p (Figure 3a), hsa-miR-133b (Figure 3c), and hsa-miR-206 (Figure 3d) after 2 h and for hsa-miR-133a-3p (Figure 3b) and hsa-miR-133b (Figure 3c) after 6 h. Moreover, the levels were significantly lower for hsa-miR-1-3p (Figure 3a) and hsa-miR-133a-3p (Figure 3b) 6 h after the second bout of exercise than after the first.

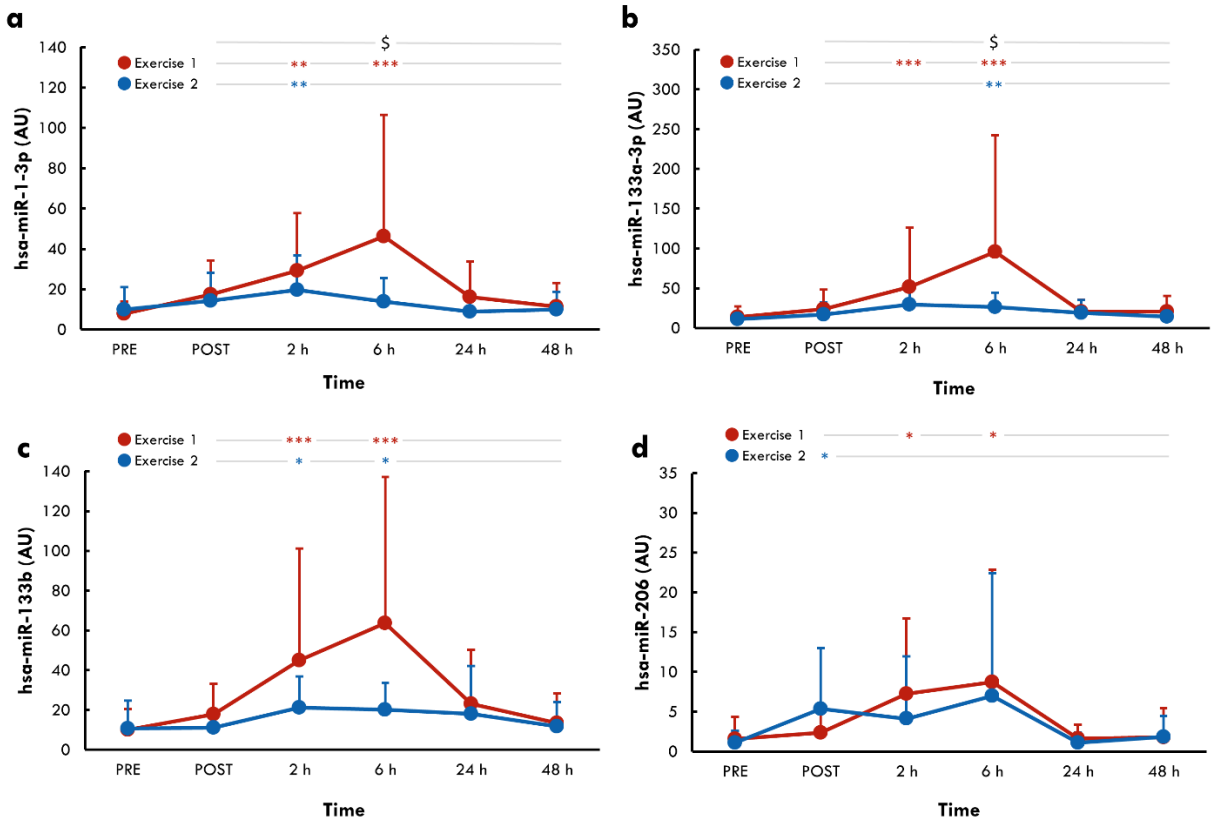


Figure 3. Time course of (a) homo sapiens (hsa)-miR-1-3p, (b) hsa-miR-133a-3p, (c) hsa-miR-133b, and (d) hsa-miR-206 levels from PRE to 48 h after exercise bout 1 (PRE (1), POST (1), 2 h (1), 6 h (1), 24 h (1), and 48 h (1)) and exercise bout 2 (PRE (2), POST (2), 2 h (2), 6 h (2), 24 h (2), and 48 h (2)). Data are expressed as relative abundance arbitrary units (AU). Significant differences from the PRE value are indicated: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$. Significant difference between exercise bout 1 and exercise bout 2: $^{\$}p < 0.05$.

Creatine kinase activity

The Friedman test showed a significant effect of time on CK activity ($p < 0.001$). Indeed, CK activity was increased up to 48 h after both exercises. CK activity was significantly lower 6 h and 24 h after the second bout of exercise than after the first (Figure 4a).

Myoglobin concentration

The Friedman test showed a significant effect of time on Mb concentration ($p < 0.001$). Indeed, the Mb concentration was significantly higher up to 6 h after both exercises (Figure 4b). The Mb concentration was significantly lower 2 and 6 h after the second bout of exercise than after the first (Figure 4b).

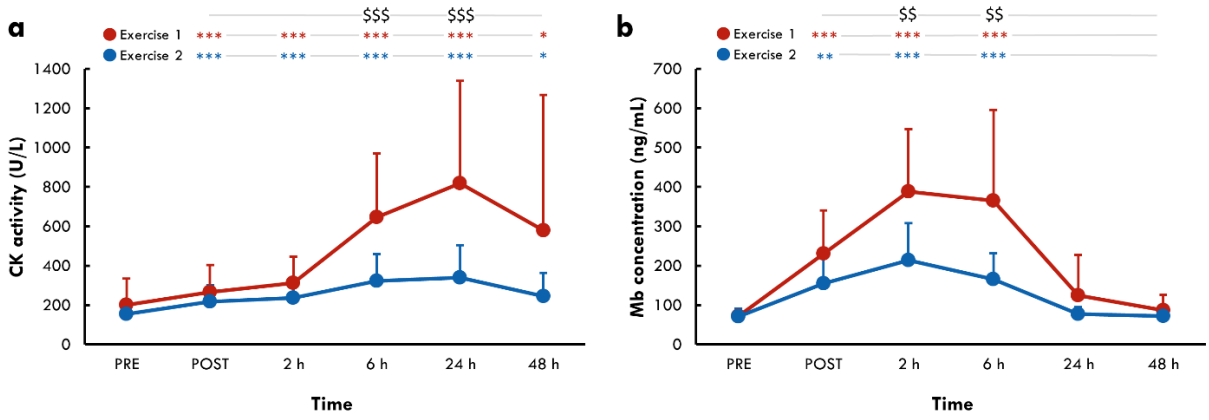


Figure 4. Time course of (a) creatine kinase (CK) activity and (b) Myoglobin (Mb) concentration from PRE to 48 h after exercise bout 1 (PRE (1), POST (1), 2 h (1), 6 h (1), 24 h (1), and 48 h (1)) and exercise bout 2 (PRE (2), POST (2), 2 h (2), 6 h (2), 24 h (2), and 48 h (2)). Data are expressed as relative abundance arbitrary units (AU). Significant differences from the PRE value are indicated: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$. Significant differences between exercise bout 1 and exercise bout 2 are indicated: $^{\$\$}p < 0.01$ and $^{\$\$\$}p < 0.001$.

Correlation between changes in myomiR levels from PRE exercise 1 and the IP for MVC torque

There was no correlation between peak changes in myomiR levels from PRE exercise 1 and the IP for MVC torque (Supplementary Table 2a). Similarly, there was no correlation between changes in myomiR levels from PRE exercise 1 to PRE exercise 2 and the IP for MVC torque (Supplementary Table 2b).

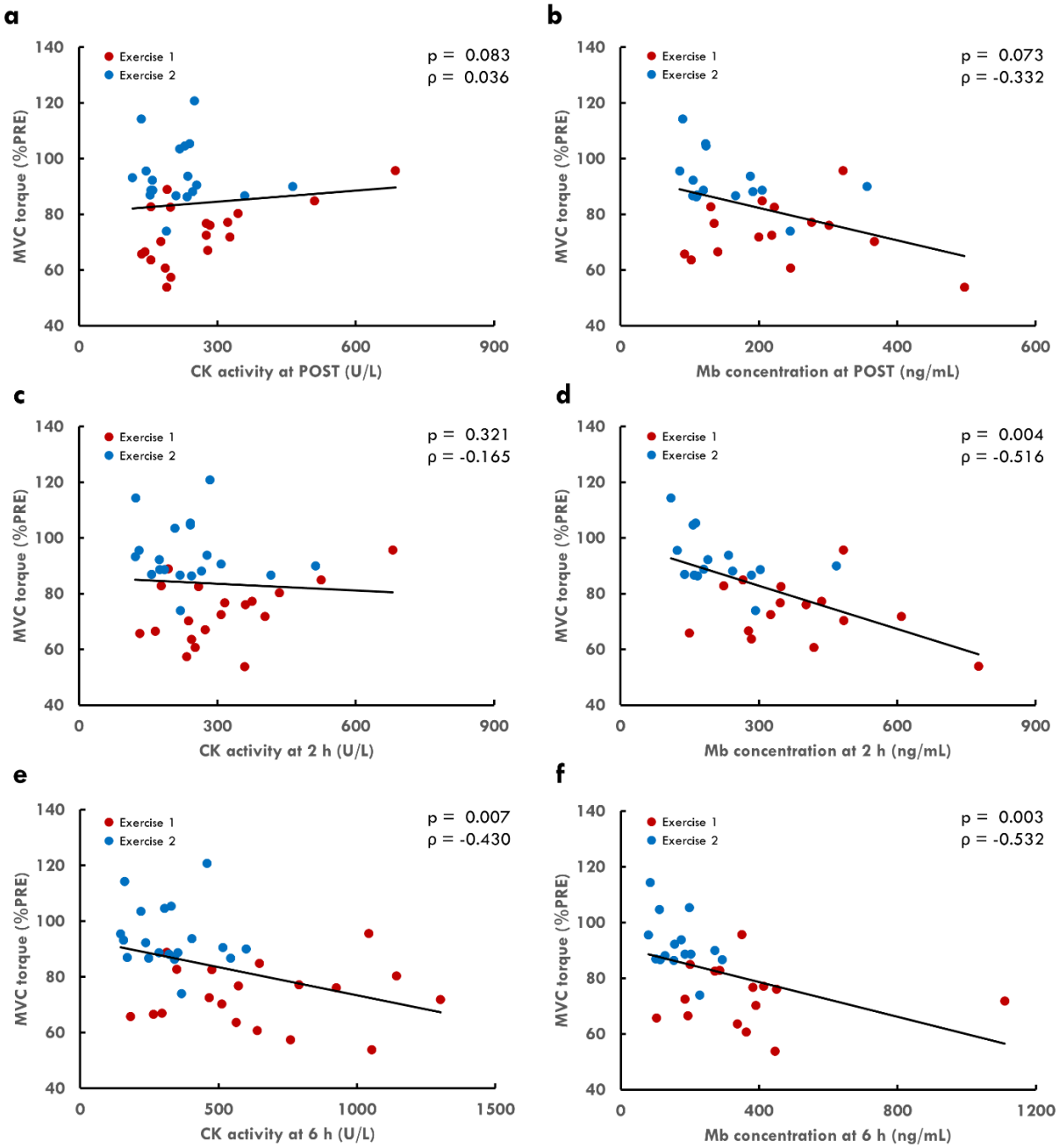
Correlation between CK activity, Mb concentration, and circulating myomiR levels

Peak changes in CK activity and Mb concentration significantly correlated with peak changes in hsa-miR-1-3p (CK: $p < 0.001$, $\rho = 0.54$; Mb: $p = 0.005$, $\rho = 0.50$), hsa-miR-133a-3p (CK: $p < 0.001$, $\rho = 0.58$; Mb: $p = 0.048$, $\rho = 0.36$), hsa-miR-133b (CK: $p = 0.002$, $\rho = 0.50$; Mb: $p = 0.056$, $\rho = 0.35$), and hsa-miR-206 (CK: $p = 0.03$, $\rho = 0.35$; Mb: $p = 0.007$, $\rho = 0.48$).

Correlation between markers and long-lasting (> 24 h) MVC torque loss

There was no correlation between long-lasting (> 24 h) MVC torque loss and CK activity (Figures 5a and 5c) or miRNA levels measured POST and 2 h post-exercise, whereas there was a significant correlation with Mb concentration at 2 h post-exercise (Figure 5b and 5d). Moreover, there was a significant correlation between long-lasting MVC torque loss and the measurements at 6 h post-exercise for CK activity (Figure 5e), Mb concentration (Figure 5f), and hsa-miR-1-3p (Figure 6a), hsa-miR-133a-3p (Figure 6b; nearly significant, $p = 0.053$), and hsa-miR-206 (Figure 6d) levels. However, there was no significant correlation between long-lasting MVC torque loss and hsa-miR-133b (Figure 6c), miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-378, or hsa-miR-499a-5p levels (Table 2). At POST, multiple linear regression showed the best combination of markers to include: Mb, CK, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133b, and hsa-miR-206 (r^2: 0.485, $p < 0.001$). The best combination included Mb and CK at 2 h post-exercise (r^2: 0.440, $p < 0.001$), whereas the combination of Mb and hsa-miR-1-3p (r^2: 0.300, $p = 0.002$) was better at 6 h post-exercise.

Figure 5. Correlations between the largest maximal voluntary contraction (MVC) torque loss measured beyond 24 h after the end of exercise and creatine kinase (CK) activity measured at POST (a), 2 h (c), and 6 h (e) after exercise and myoglobin (Mb) concentration measured at POST (b), 2 h (d), and 6 h (f) after the exercises. Significance (p) and Spearman rank correlation coefficient (ρ) values are presented.



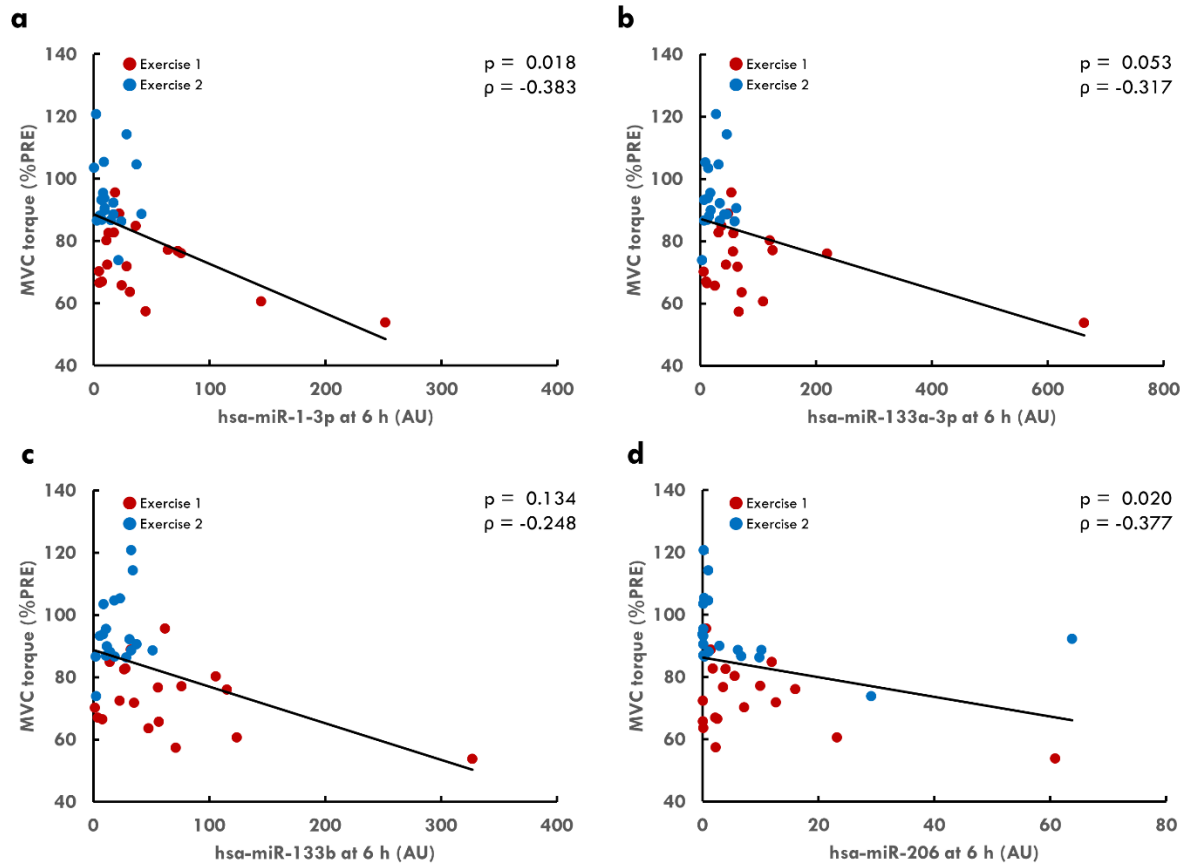


Figure 6. Correlations between the largest maximal voluntary contraction (MVC) torque loss measured beyond 24 h after the end of exercise and plasma miRNA levels measured 6 h after the end of the exercise. Data are displayed for (a) homo sapiens (hsa)-miR-1-3p, (b) hsa-miR-133a-3p, (c) hsa-miR-133b, and (d) hsa-miR-206. MVC torque loss values are expressed as %PRE and plasma miRNA levels as relative abundance arbitrary units (AU). Significance (p) and Spearman rank correlation coefficient (ρ) values are presented.

	POST		2 h		6 h	
	p	ρ	p	ρ	p	ρ
hsa-miR-1-3p (AU)	0.1426	-0.2424	0.0882	-0.2804	**0.0176**	**-0.3831**
hsa-miR-133a-3p (AU)	0.1609	-0.2321	0.1581	-0.2336	0.0528	-0.3166
hsa-miR-133b (AU)	0.1437	-0.2417	0.1022	-0.2692	0.1339	-0.2476
hsa-miR-206 (AU)	0.4619	0.1230	0.2375	-0.1963	**0.0197**	**-0.3767**
hsa-miR-208a-3p (AU)	0.7094	-0.0625	0.6809	0.0689	0.7007	-0.0645
hsa-miR-208b-3p (AU)	0.2831	-0.1787	0.9969	0.0007	0.7280	-0.0583
hsa-miR-378-3p (AU)	0.4367	-0.1318	0.9917	-0.0018	0.7285	-0.0590
hsa-miR-499a-5p (AU)	0.3134	-0.1680	0.8022	-0.0420	0.8108	0.0402
CK activity (U/L)	0.8306	0.0359	0.3211	-0.1654	**0.0071**	**-0.4295**
Mb concentration (ng/mL)	0.0729	-0.3321	**0.0035**	**-0.5159**	**0.0025**	**-0.5315**

Table 2. Correlations between the largest maximal voluntary contraction torque loss measured beyond 24 h after the end of the exercises and homo sapiens (hsa)-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-206, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378-3p, and hsa-miR-499a-5p levels, creatine kinase (CK) activity, and myoglobin (Mb) concentration. Significance (p) and Spearman rank correlation coefficient (ρ) values are shown. Results with a P-value < 0.05 were considered significant and are shown in bold.

Discussion

The main purpose of this study was to investigate (1) how plasma myomiR levels are modified by the RBE and (2) whether plasma myomiR levels can predict the long-lasting deficit (> 24 h) of MVC torque (*i.e.*, the magnitude of EIMD). We observed an increase in several miRNA levels (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, and hsa-miR-206) after both exercise bouts 1 and 2. The levels of certain myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p) were less affected after the second bout of exercise than after the first, thus confirming our first hypothesis. However, we did not confirm our second hypothesis that the association of myomiR levels with the largest MVC torque loss measured beyond 24 h after the exercises would be stronger than the association between MVC force loss and CK activity/Mb concentration.

Circulating levels in response to downhill walking exercises

As expected, the repetition of exercise bouts induced a RBE: MVC torque loss was less and recovered more rapidly after exercise bout 2 than after exercise bout 1. Moreover, CK activity and the Mb concentration increased less after exercise bout 2 than exercise bout 1. This result is consistent with those of previous studies[15-17], which reported an attenuation of several symptoms of EIMD after the second eccentrically-biased bout of exercise relative to the first. Importantly, our study obtained original results concerning the evolution of miRNA levels after two eccentric exercise bouts.

Circulating miRNA levels in response to the first bout of eccentric exercise

We found hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, and hsa-miR-206 to increase after exercise bout 1. These results are consistent with those of several studies[4,5,8,9,18], which found an increase in the level of these myomiRs after DW or a marathon or ultra-marathon run. Conversely, we did not observe significant increases in the hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p, hsa-miR-378-3p, or hsa-miR-499a-5p levels in the present study, whereas their circulating levels were shown to increase after backward DW[4] and marathon[8,9], and/or ultra-marathon runs[5]. Discrepancies between circulating myomiR profiles following a session of eccentric exercise have already been reported[4,9] and could involve several factors. One possible explanation is that the observed discrepancies are due to differences in basal circulating levels between miRNAs, as previously suggested[4,5]. Here, we found that the circulating levels of certain myomiRs (hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-208b-3p and hsa-miR-499a-5p) were too low to be accurately detected both at baseline levels and in response to moderate damaging exercise. Among the 228 samples (12 time points for 19 subjects), miRNAs were detected in 223 for hsa-miR-1-3p (97.8 %), 207 for hsa-miR-

133a-3p (90.8 %), 213 for hsa-miR-133b (93.4 %), 188 for hsa-miR-206 (82.5 %), 30 for hsa-miR-208a-3p (13.2 %), 43 for hsa-miR-208b-3p (18.9 %), 218 for hsa-miR-378-3p (95.6 %), and 104 for hsa-miR-499a-5p (45.6 %). This result is consistent with those of several studies[4-19], such as that of Banzet et al.[4], which reported low levels of hsa-miR-208a-3p (not detectable), hsa-miR-208b-3p (not detectable in 6 of 9 participants), and hsa-miR-499a-5p after 30 min of a DW exercise. However, we recently demonstrated that the levels of these myomiRs can substantially increase after severe muscle damage induced by extreme endurance exercise (24-h ultra-marathon run)[5], suggesting that large differences in exercise duration and EIMD magnitude could differently affect the levels of certain circulating myomiRs. A second factor that could explain the observed differences in circulating profiles after EIMD may be linked to the differential expression of myomiRs according to the muscle type, as well as skeletal muscle fiber contractile phenotype. Indeed, hsa-miR-208a-3p is specific to cardiac muscle, explaining why we did not find a significant increase in this myomiR after the bouts of DW, in which a low level of cardiac stress is expected. Interestingly, the two participants who showed the largest increases in hsa-miR-208a-3p levels in the present study correspond to two of the five participants who performed the exercise to exhaustion, suggesting that this myomiR may be an indicator of cardiac stress. However, as this was not the aim of the present study, we neither evaluated cardiac function nor measured other blood markers of cardiac stress. Hsa-miR-499a-5p has been shown to be more highly expressed in type I than type II fibers[6]. As type I fibers have been shown to be less susceptible to EIMD than type II fibers[20], this could partially explain why hsa-miR-499a-5p levels did not increase after the DW exercise in the present study. Hsa-miR-378-3p levels did not significantly increase after DW in the present study. This miRNA is not considered to be a myomiR but is among the most highly expressed miRNAs in muscle tissue[7,21] and increases in its blood levels have been consistently reported after toxic muscle injury in the rat[6] or an ultra-marathon run[5] and in various animal models of Duchenne muscular dystrophy (DMD)[22-24]. As hsa-miR-378-3p was already abundant in the plasma in the control condition (*e.g.*, healthy organism at rest), it is possible that any muscle damage induced in the present study was not sufficient to raise the circulating level above the "background noise".

Comparison of circulating miRNA levels between exercise bouts 1 and 2

Among the myomiRs that showed an increase in the level after the first bout of exercise (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, and hsa-miR-206), only hsa-miR-1-3p and hsa-miR-133a-3p showed a differential profile, *i.e.*, smaller increase, after the second. The fact that we observed different circulating profiles among miRNAs in response to one or two bouts of eccentric

exercise is striking and could be due to a combination of several factors. Interestingly, we observed that the peak changes in CK activity and Mb concentration correlated with peak changes in hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, and hsa-miR-206 levels. Although still speculative, such a relationship suggests that these myomiRs may share, at least partially, mechanisms of release to those of CK and Mb (*i.e.*, passive release). However, it is likely that this hypothesis cannot fully explain the observed differences in circulating profiles reported here. First, it cannot be excluded that the first bout of eccentric exercise led to modifications of the abundance of myomiRs in the skeletal muscle tissue, as they are known to be involved in muscle homeostasis and regeneration[25,26]. Despite the fact that no study has evaluated the effect of an acute bout of eccentric exercise on muscle myomiR levels, several authors[27,28] have shown that an acute bout of resistance exercise can reduce the expression of miR-1, miR-133a, and miR-133b in skeletal muscle tissue 2 to 6 h post-exercise. Whether such modifications are transient or persist for a longer period of time and whether this could result in variations in their circulating levels is unknown. Circulating levels of members of the let-7 miRNA family, abundantly expressed in muscle tissue, did not increase in response to myofiber damage[23-25,29], suggesting that active secretion mechanisms are involved. In a recent review, Coenen-Stass et al.[29] discussed the clinical utility of extracellular miRNAs as biomarkers of DMD, as well as their possible contribution to muscle physiology. These authors proposed that the release of miRNAs in response to muscle damage may be due to a combination of passive leakage resulting from myonecrosis and the impairment of the sarcolemma, as well as an active secretion process that could accompany muscle differentiation and regeneration. Interestingly, pioneering *in vitro* studies have shown that miR-133a, miR-133b, miR-206, and miR-378 are actively released in extracellular vesicles from myotubes[30] and myogenic progenitor cells[31] and may regulate myoblast differentiation and extracellular matrix remodeling. Interestingly, these physiological mechanisms have been identified to contribute to the RBE[11]. Despite the different context, we believe that the EIMD induced in our experimental model may share some of these release mechanisms.

In an attempt to evaluate whether the magnitude of changes in circulating miRNA levels after exercise could be an indicator of the functional adaptations induced by the RBE, we searched for correlates between peak changes in acute (< 48 h) and long-term (2 weeks; PRE exercise 2) circulating myomiR levels and IP for torque change, but failed to observe a significant correlation. Despite these negative results, a role for circulating myomiRs in RBE adaptations cannot be excluded, as their abundance in the blood compartment depends on complex and interrelated factors, such as varying half-lives[32], kinetics, and mechanisms of release. Thus, it cannot be

excluded that myomiRs may play a role in RBE adaptations. However, further research is needed to obtain evidence to directly support this hypothesis.

Association between EIMD markers and long-lasting MVC torque loss

We found that the long-lasting MVC torque deficit correlated with the levels of hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p (tendency; $p = 0.053$), hsa-miR-206, CK activity, and Mb concentration measured at 6 h post-exercise. However, we did not confirm our hypothesis that the association between myomiR levels and the largest MVC torque loss measured beyond 24 h after the bouts of exercise would be stronger than the association between MVC torque loss and CK activity/Mb concentration. These results are not consistent with those of our previous study[5], which showed that myomiR levels were more highly correlated with the height jump loss measured at 24 h than CK activity or Mb concentration after a 24-h ultra-marathon run in elite athletes. These discrepancies could be explained by differences in exercise duration and intensity, as well as in the training status of the participants between studies (elite *vs.* moderately trained in the present study). Furthermore, our results also suggest that a combination of several markers, including Mb, CK, and certain myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133b, and hsa-miR-206) could improve our ability to predict MVC torque reduction in the days following exercise. Therefore, the concomitant measurement of circulating myomiR levels, Mb concentrations, and CK activity could improve the diagnosis of EIMD.

Limitations

Our study had several limitations. First, we included only men, limiting any conclusions for women. However, our previous work has shown that myomiR levels increase after toxic muscle injury in female rats[6] and after a 24-h ultra-marathon in women[5]. Siracusa et al.[6] also found similar circulating myomiR levels between male and female rats in control conditions and in response to muscle damage. This is in accordance with the observations of Duttagupta et al.[33], who reported that myomiRs were not mentioned among miRNAs differently expressed between men and women. Second, as Ramos et al.[34] showed that certain circulating myomiRs can be affected by the duration and intensity of exercise, differences between participants could be a limitation. In the present study, the relative intensity and duration of the exercise could have been different between the participants, as five of the 19 participants performed the exercise to exhaustion and stopped before the 45-min limit. However, all participants performed the same exercise two weeks later, allowing comparison of circulating myomiR levels under similar conditions. Third, as plasma miRNA level assessment is a lengthy process (~6 h from RNA extraction from the plasma to the end of RT-qPCR), this

marker is not yet compatible with the clinical and/or sports context, in which it is important to predict long-lasting MVC torque loss (*i.e.*, quantify EIMD) as early as possible to adapt the training loads and recovery of athletes accordingly. Therefore, further research is needed for the development of more rapid analytical methods that may be appropriate for point-of-care tests.

Conclusion

The levels of several myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, and hsa-miR-206) increased in response to loaded DW, known to induce EIMD. The levels of two (hsa-miR-1-3p and hsa-miR-133a-3p) measured 6 h post-exercise increased less after exercise bout 2 than bout 1, suggesting that the levels of these circulating myomiRs could represent the adaptations conferred by the RBE, although these changes were not associated with functional adaptations of the neuromuscular system. The levels of several myomiRs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, and hsa-miR-206), CK activity, and Mb concentration measured at 6 h post-exercise correlated with the long-lasting MVC torque deficit (>24 h) (*i.e.*, the magnitude of EIMD), suggesting that myomiR levels were not better predictors of MVC torque reduction than conventional markers (*e.g.*, CK and Mb). Finally, the combined measurement of certain myomiRs with myoglobin and creatine kinase could improve the prediction of long-lasting MVC torque loss. These results confirm that the RBE has an effect on myomiR levels. The mechanisms accounting for their limited release after the second bout of eccentric exercise are yet to be identified, as well as their functional relevance.

Acknowledgments

We would like to thank Phillippe Colin, Caroline Dussault, Walid Bouaziz, Pierre-Emmanuel Tardo-Dino, Olivier Nespoulous, and Alexandra Malgoyre for their technical and medical support during the data collection and the IRBA Biological Analyses and Molecular Biology Units for their technical support for the data analysis.

Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

Authors' contributions

EC, JS, SGV, and VM designed the study and drafted the manuscript. EC, JS, BL, and SGV collected the data. EC, JS, SBau, SBo, AG, and BL participated in the data analysis. All the authors contributed to the interpretation of the data and editing of the manuscript.

References

1. Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? Exercise immunology review. 2012;18:42-97.

2. Warren GL, Lowe DA, Armstrong RB. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. Sports medicine. 1999;27(1):43-59.

3. Damas F, Nosaka K, Libardi CA, Chen TC, Ugrinowitsch C. Susceptibility to Exercise-Induced Muscle Damage: a Cluster Analysis with a Large Sample. International journal of sports medicine. 2016;37(8):633-640.

4. Banzet S, Chennaoui M, Girard O, et al. Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 2013;115(9):1237-1244.

5. Chalchat E, Charlot K, Garcia-Vicencio S, et al. Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2021;31(9):1782-1795.

6. Siracusa J, Koulmann N, Bourdon S, Goriot ME, Banzet S. Circulating miRNAs as Biomarkers of Acute Muscle Damage in Rats. The American journal of pathology. 2016;186(5):1313-1327.

7. Ludwig N, Leidinger P, Becker K, et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. Nucleic Acids Res. 2016;44(8):3865-3877.

8. Baggish AL, Park J, Min PK, et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 2014;116(5):522-531.

9. Mooren FC, Viereck J, Kruger K, Thum T. Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2014;306(4):H557-563.

10. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. The Journal of physiology. 2011;589(Pt 16):3983-3994.

11. Hyldahl RD, Chen TC, Nosaka K. Mechanisms and Mediators of the Skeletal Muscle Repeated Bout Effect. Exercise and sport sciences reviews. 2017;45(1):24-33.

12. Schuklenk U. Helsinki Declaration revisions. Issues Med Ethics. 2001;9(1):29.

13. Lee, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. Rna. 2008;14(1):35-42.

14. De Ronde MWJ, Ruijter JM, Lanfear D, et al. Practical data handling pipeline improves performance of qPCR-based circulating miRNA measurements. Rna. 2017;23(5):811-821.

15. Chen, Chen HL, Pearce AJ, Nosaka K. Attenuation of eccentric exercise-induced muscle damage by preconditioning exercises. Medicine and science in sports and exercise. 2012;44(11):2090-2098.

16. Clarkson PM, Nosaka K, Braun B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. Medicine and science in sports and exercise. 1992;24(5):512-520.

17. Maeo S, Yamamoto M, Kanehisa H. Downhill walking training with and without exercise-induced muscle damage similarly increase knee extensor strength. Journal of sports sciences. 2016;34(21):2018-2026.

18. Clauss S, Wakili R, Hildebrand B, et al. MicroRNAs as Biomarkers for Acute Atrial Remodeling in Marathon Runners (The miRathon Study--A Sub-Study of the Munich Marathon Study). PloS one. 2016;11(2):e0148599-e0148599.

19. Aoi W, Ichikawa H, Mune K, et al. Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. Frontiers in physiology. 2013;4:80.

20. Choi SJ. Differential susceptibility on myosin heavy chain isoform following eccentric-induced muscle damage. Journal of exercise rehabilitation. 2014;10(6):344-348.

21. Kavakiotis I, Alexiou A, Tastsoglou S, Vlachos IS, Hatzigeorgiou AG. DIANA-miTED: a microRNA tissue expression database. Nucleic Acids Res. 2022;50(D1):D1055-d1061.

22. Jeanson-Leh L, Lameth J, Krimi S, et al. Serum profiling identifies novel muscle miRNA and cardiomyopathy-related miRNA biomarkers in Golden Retriever muscular dystrophy dogs and Duchenne muscular dystrophy patients. The American journal of pathology. 2014;184(11):2885-2898.

23. Roberts TC, Godfrey C, McClorey G, et al. Extracellular microRNAs are dynamic non-vesicular biomarkers of muscle turnover. Nucleic Acids Res. 2013;41(20):9500-9513.

24. Vignier N, Amor F, Fogel P, et al. Distinctive serum miRNA profile in mouse models of striated muscular pathologies. PloS one. 2013;8(2):e55281.

25. Siracusa J, Koulmann N, Banzet S. Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine. Journal of cachexia, sarcopenia and muscle. 2018;9(1):20-27.

26. Kirby TJ, Chaillou T, McCarthy JJ. The role of microRNAs in skeletal muscle health and disease. Front Biosci (Landmark Ed). 2015;20(1):37-77.

27. Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, Esser KA, Rasmussen BB. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2008;295(6):E1333-1340.

28. Rivas DA, Lessard SJ, Rice NP, et al. Diminished skeletal muscle microRNA expression with aging is associated with attenuated muscle plasticity and inhibition of IGF-1 signaling. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2014;28(9):4133-4147.

29. Coenen-Stass AML, Wood MJA, Roberts TC. Biomarker Potential of Extracellular miRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy. Trends Mol Med. 2017;23(11):989-1001.

30. Forterre A, Jalabert A, Chikh K, et al. Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. Cell Cycle. 2014;13(1):78-89.

31. Fry CS, Kirby TJ, Kosmac K, McCarthy JJ, Peterson CA. Myogenic Progenitor Cells Control Extracellular Matrix Production by Fibroblasts during Skeletal Muscle Hypertrophy. Cell Stem Cell. 2017;20(1):56-69.

32. Coenen-Stass AML, Pauwels MJ, Hanson B, et al. Extracellular microRNAs exhibit sequence-dependent stability and cellular release kinetics. RNA Biol. 2019;16(5):696-706.

33. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. PloS one. 2011;6(6):e20769.

34. Ramos AE, Lo C, Estephan LE, et al. Specific circulating microRNAs display dose-dependent responses to variable intensity and duration of endurance exercise. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2018;315(2):H273-H283.

D. Annexe 6 : Étude 3b

Muscle shear elastic modulus provides an indication of the protection conferred by the repeated bout effect. **Chalchat E,** Siracusa J, Bourrilhon C, Charlot K, Martin V, Garcia-Vicencio S. Front Physiol. 2022. April 29; 13:877485 Doi: 10.3389/fphys.2022.877485.

frontiers | Frontiers in Physiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 29 April 2022
doi: 10.3389/fphys.2022.877485

Muscle Shear Elastic Modulus Provides an Indication of the Protection Conferred by the Repeated Bout Effect

Emeric Chalchat[1,2]*, *Julien Siracusa*[1,3], *Cyprien Bourrilhon*[1,3], *Keyne Charlot*[1,3], *Vincent Martin*[2,4†] *and Sebastian Garcia-Vicencio*[1,3†]

[1]Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Unité de Physiologie des Exercices et Activités en Conditions Extrêmes, Département Environnements Opérationnels, Bretigny-Sur-Orge, France, [2]AME2P, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, [3]LBEPS, Univ Evry, IRBA, Université Paris Saclay, Evry, France, [4]Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Ryota Akagi,
Shibaura Institute of Technology, Japan

Reviewed by:
Fábio Juner Lanferdini,
Federal University of Santa Catarina, Brazil
Lilian Lacourpaille,
Université de Nantes, France

***Correspondence:**
Emeric Chalchat
emchalchat@gmail.com

[†]These authors have contributed equally to this work and share last authorship

Specialty section:
This article was submitted to Striated Muscle Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: 16 February 2022
Accepted: 08 March 2022
Published: 29 April 2022

Citation:
Chalchat E, Siracusa J, Bourrilhon C, Charlot K, Martin V and Garcia-Vicencio S (2022) Muscle Shear Elastic Modulus Provides an Indication of the Protection Conferred by the Repeated Bout Effect. Front. Physiol. 13:877485. doi: 10.3389/fphys.2022.877485

Background: The neuromuscular system is able to quickly adapt to exercise-induced muscle damage (EIMD), such that it is less affected by subsequent damaging exercise, a phenomenon known as the repeated bout effect (RBE). The objective was to determine whether the mechanical properties of the quadriceps, as evaluated by shear wave elastography (SWE), were less affected when a second bout of eccentric-biased exercise was performed 2 weeks later. It was hypothesized that the first bout would confer protection against extensive muscle damage through an adaptation of the muscle stiffness before the second bout (i.e., higher muscle stiffness).

Methods: Sixteen males performed two identical bouts of downhill walking separated by 2 weeks (45 min at 4.5 km.h^{-1}; gradient: 25%; load: 30% of the body mass). *Rectus femoris* (RF) and *vastus lateralis* (VL) resting shear elastic modulus (μ) and EIMD symptoms were measured before and up to 7 days following the exercise bouts. Changes in neuromuscular function was evaluated by maximal voluntary contraction torque, voluntary activation level, evoked mechanical response to single and double (10 and 100 Hz doublets) electrical stimulation. An index of protection (IP) was calculated for EIMD symptoms to assess magnitude the RBE.

Results: EIMD symptoms were less affected after the second than the first exercise bout. RF and VL-μ increased ($p < 0.001$) only after the first exercise. RF μ was elevated up to 2 weeks after the end of the first exercise ($p < 0.001$) whereas VL μ was only increased up to 24 h. The increase in μ observed 2 weeks after the end of the first exercise was correlated with the IP; i.e., attenuation of alterations in muscle μ, 10 Hz-doublet amplitude and rate of torque development after the second exercise bout ($p < 0.05$).

Abbreviations: CK, creatine kinase; Db10, doublet at 10 Hz; Db100, doublet at 100 Hz; DW, downhill walking; E-C, excitation-contraction; ECC, eccentric exercise; EIMD, exercise-induced muscle damage; IP, index of protection; MT, muscle thickness; NM, neuromuscular; PA, pennation angle; PPT, pain pressure threshold; RBE, repeated bout effect; RF, rectus femoris; ROI, region of interest; ROM, range of motion; RTD, rate of torque development; SWE, Shear-wave elastography; μ, shear elastic modulus; VAL, voluntary activation level; VL, vastus lateralis

Conclusion: We showed that muscle μ assessed by SWE was sensitive to the RBE, with a differential effect between VL and RF. The persistent increase in μ was associated with the attenuation of neuromuscular impairments observed after the second bout, suggesting that the increased muscle stiffness could be a "protective" adaptation making muscles more resistant to the mechanical strain associated to eccentric contractions.

Keywords: eccentric exercise, neuromuscular function, shear wave elasotography, muscle stiffness, downhill walking, elasticity, muscle adaptation, ultrasound

INTRODUCTION

One of the major feature of the neuromuscular (NM) system is its degree of plasticity in response to endogenous and exogenous influences, such as changes in loading regimes (Narici, 1999). It can translate into adjustments of structural, neural, and functional properties (Kawakami et al., 1993; Škarabot et al., 2021) of the NM system. For instance, the high or repeated mechanical stress exerted by eccentric (lengthening) exercise (ECC) on the muscle-tendon complex leads to exercise-induced muscle damage (EIMD). EIMD results in a defined set of symptoms (e.g., force loss, muscle soreness, stiffness, decrease joint range of motion, increased circulating muscle proteins) consecutive to the disruption of intracellular muscle structure, sarcolemma and extracellular matrix in the days following exercise (Fridén et al., 1984; Proske and Morgan, 2001; Paulsen et al., 2012). However, the NM system is able to quickly adapt to EIMD, such that the NM system is less affected by subsequent damaging exercise. This phenomenon is widely known as the repeated bout effect (RBE). The occurrence of RBE relies on various mechanisms including cellular, neural, inflammatory, mechanical adaptations, and extracellular matrix remodeling that might work independently or synergistically to generate muscle protection against EIMD (e.g., reduced symptoms of EIMD and enhanced recovery) when a second bout of ECC is performed (Hyldahl et al., 2017).

Previous studies suggested that neural adaptations may occur during the second bout of ECC (Duclay et al., 2008; Dartnall et al., 2011; Howatson et al., 2011). Specifically, the central nervous system may adjust its recruitment strategies to distribute the mechanical stress over a greater motor unit pool to protect the muscle from damage. While several studies showed an increased supraspinal and spinal excitability in response to eccentric training (Duclay et al., 2008), less is known about short-term specific central adaptations after a single bout of ECC, such that the contribution of central factors to RBE is currently debated (Hyldahl et al., 2017).

At the peripheral level, studies have demonstrated changes in fascicle (e.g., reduced elongation) or myotendinous junction behavior (e.g., smaller displacement) during ECC between the first and the second bout partly explaining the reduced amount of EIMD (Lau et al., 2015; Penailillo et al., 2015). Hyldahl et al. (2017) also reported that skeletal muscle extracellular matrix remodeling could increase passive stiffness of the whole muscle the weeks following a bout of ECC to confer protection against a subsequent damaging exercise bout. As a result, muscles could become more resistant to the mechanical stress during the second bout. However, it has also been shown that the RBE can occur without changes in the mechanical properties of muscles (Hoffman et al., 2016). These divergent results may be associated with the fact that muscles are heterogeneously stretched during ECC due to differences in their anatomical (i.e., mono- and bi-articular muscles) properties, leading to inter-muscle variability in muscle damage (Green et al., 2012; Maeo et al., 2018). Ultimately, this may result in different mechanical behavior between muscles within the same muscle group after a second bout of ECC affecting the force generating capacity.

Shear-wave elastography (SWE) is a reliable quantitative real-time method (Gennisson et al., 2010) to assess both passive and active mechanical properties of muscles allowing to calculate an index of stiffness (i.e., shear elastic modulus; μ) of individual muscles in pathological (Bachasson et al., 2018) and physiological conditions (Siracusa et al., 2019). In response to EIMD, resting muscle μ is increased early (<1 h) and may remain elevated during the days following ECC (Lacourpaille et al., 2014; Lacourpaille et al., 2017; Heales et al., 2018; Ema et al., 2021). As Lacourpaille et al. (2017) found that the increase in muscle μ was associated to the magnitude of force loss measured at 48 h, muscle μ has been used an indicator of EIMD. Mechanisms such as calcium homeostasis disturbance due to sarcolemma disruption (Proske and Morgan, 2001), as well as the muscle volume changes due to edema exerting strain on the perimysium and epimysium connective tissues (Whitehead et al., 2001), could be involved in this increased μ after EIMD. A study has also reported an increased resting μ up to 21 days after an ECC of the elbow flexors (Lacourpaille et al., 2014). Whether this reflects the protective mechanical adaptation conferred by the RBE remains unknown (Hyldahl et al., 2017). To date, no study has evaluated the sensibility of the resting μ to RBE.

Therefore, this study was designed to determine whether the magnitude and time-course of the quadriceps resting μ would be differently affected after two identical eccentrically-biased exercises in healthy individuals. We hypothesized that resting μ would be increased to a smaller extent and for a shorter duration after the second damaging exercise bout compared to the same bout performed 2 weeks earlier. The first bout would confer protection against extensive muscle damage through an adaptation of the muscle stiffness before the second bout (i.e., higher resting μ). Moreover, we expected that the magnitude of the adaptive response would differ between the quadriceps muscles (*vastus lateralis vs rectus femoris*) owing to their different anatomical and architectural properties.

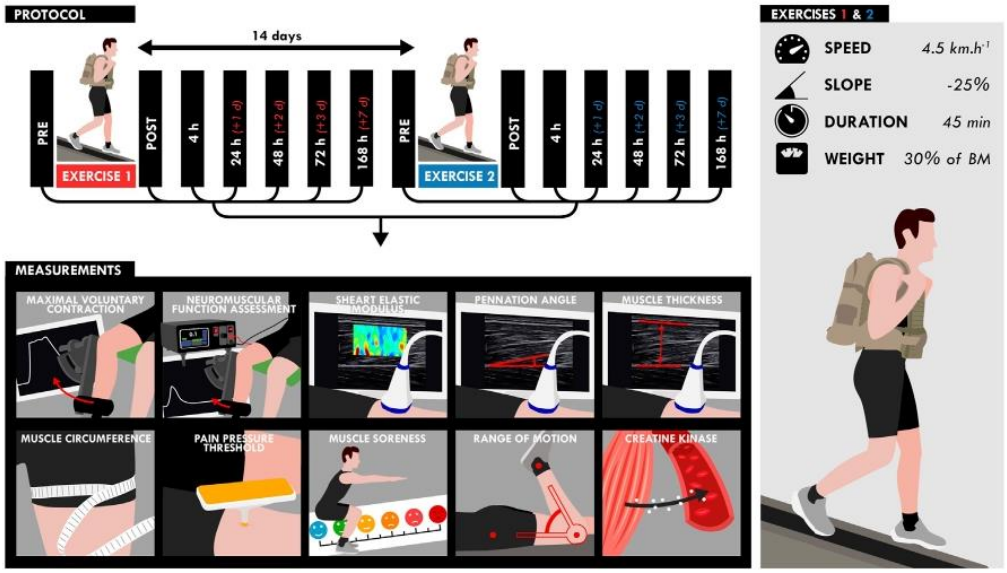


FIGURE 1 | Design of the study. Participants performed two bouts separated by 2 weeks of downhill walking on a treadmill for 45 min while carrying a load equivalent to 30% of the body mass (treadmill gradient: 25%; speed: 4.5 km.h^{-1}). All measurements (bottom) were assessed at different time points as shown on the timeline (top).

MATERIALS AND METHODS

Participants

Sixteen young males (age: 31.5 ± 5.9 years, body mass: 77.1 ± 11.1 kg, height: 1.80 ± 0.06 m, body mass index: 23.9 ± 2.4 kg m^{-2}, and fat mass: 15.9 ± 5.4%) were fully informed of the experimental procedures, gave their written informed consent and agreed to participate in this study. Participants performed regular activity (between 3 and 8 h.week^{-1}), had no recent history of muscular, joint, or bone disorders and did not take any medication that could affect NM responses. None of them experienced strenuous mountain trekking and/or downhill walking (DW) and none had been involved in a resistance-training program in the past 6 months. Participants were instructed not to perform unaccustomed activities and any interventions that may interfere with recovery such as massage, icing, nutritional supplementation and nonsteroidal anti-inflammatory drugs during the experimental period. Each participant realized an inclusion session, consisting of a complete medical examination, including the collection of anthropometric data and complete familiarization with the experimental NM and SWE procedures. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (Schuklenk, 2001) and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Ile-de-France 8, France, registration number: 2019-A01210-57, SMILE).

Protocol

Participants performed two 45-min DW bouts separated by 2 weeks on a treadmill (pulsar 3p 4.0, HP cosmos, Warwickshire, United Kingdom) while carrying a load equivalent to 30% of the body mass (carrying: a weighted vest: 10% of the body mass; a backpack: 20% of the body mass) (**Figure 1**). The treadmill gradient was set to −25%, velocity to 4.5 km.h^{-1} and the participants were instructed to walk at their own preferred stride length and frequency. Five participants were not able to finish the walking bout and performed the first exercise to exhaustion (30.2 ± 8.6 min). These participants performed the same exercise duration during the second exercise. NM assessments (voluntary and evoked torque), quadriceps muscle soreness, knee range of motion (ROM), muscle architecture and resting shear elastic modulus (μ) of the *vastus lateralis* (VL) and *rectus femoris* (RF) muscles measured by SWE were assessed on the right limb before (PRE), within 1 h (POST), and the hours/days (4, 24, 48, 72, and 168 h) after the two DW bouts. Blood samples were obtained before, immediately after (POST), and 2, 6, 24, 48, 72 and 168 h (7 days) after the two exercise bouts to analyze serum creatine kinase (CK) activity.

DATA COLLECTION

Traditional EIMD Symptoms

Neuromuscular Function Assessments

Voluntary and evoked torques were measured using an isokinetic dynamometer (Cybex Norm, Lumex, Ronkonkoma, NY, United States). Participants were comfortably positioned on an adjustable chair with the hip joint flexed at 70° (0° = neutral supine position). The axis of rotation of the dynamometer was aligned with the femoral condyles of the femur and the lever arm

was attached 1–2 cm above the malleolus with a Velcro strap. All measurements were taken from the participant's right leg (knee angle = 90°; 0° = knee fully extended). Torque data were corrected for gravity, digitized and exported at a rate of 2 kHz to an external analog-to-digital converter (Powerlab 16/35; ADInstruments, New South Wales, Australia) driven by the Labchart pro 8.1 software (ADInstruments, New South Wales, Australia). During each MVC, the participants were instructed to grip the lateral handles of the seat in order to stabilize the pelvis and were strongly encouraged by the investigator to push as fast and hard as possible.

Potentiated single (Twitch) and double electrical stimulations delivered at 10 and 100 Hz (Db10 and Db100, respectively) at rest. Briefly, quare-wave pulses with a width of 1 m at a maximal voltage of 400 V were delivered percutaneously to the femoral nerve using an electrical stimulator (Digitimer DS8R, Welwyn Garden City, United Kingdom) connected to a cathode (5 × 5 cm; Axelgaard manufacturing, Fallbrook, United States) placed over the femoral nerve in the femoral triangle and an anode (5 × 9 cm; Axelgaard manufacturing, Fallbrook, United States) placed on the gluteal fold. Intensity of stimulation ranged from 65 to 260 mA and corresponded to 130% of the optimal intensity (i.e., the intensity at which maximal non-potentiated single twitches started to plateau). Intensities were determined from single pulses delivered from 40 to 200 mA in 5-mA increments.

Blood Collection

Approximately 3.5 ml of blood was drawn from the antecubital vein into a serum separating tube (SST; 5 ml, Becton Dickinson vacutainer, Franklin Lakes, United States).

Muscle Soreness

The magnitude of muscle soreness of the whole quadriceps was assessed using a visual analog scale, consisting of a 100-mm line representing "no pain" at one end (0 mm), and "very, very painful" at the other (100 mm), while performing a squat over a 90°-knee range of motion.

Muscle Pain Pressure Threshold

An algometer (NOD, OT Bioelettronica, Turino, Italy) with a rigid plastic rod covered by a rubber surface with an area of 1.0 cm^2 and a scale ranging from 0 to 500 kPa was used to measure muscle pain pressure threshold (PPT). First, the procedures were explained clearly to the subject. The participants were evaluated in a sitting position with the knee placed at 90° of flexion (0° = knee fully extended), in a relaxed state. The compression pressure was applied on the mid portion of the VL and RF muscles. The pressure was applied vertically and it increased at a constant rate of 50 kPa per seconds. Participants were asked to say "stop" when they began to feel muscle pain or discomfort. Two repetitive measurements were performed for each muscle at an interval of 60 s.

Range of Motion

The passive knee ROM was measured using a universal goniometer marked in 1° increments. ROM assessment consisted of placing the participant prone with the hip at 0° of flexion. The femur was stabilized to avoid any hip flexion movement. The goniometer was aligned with the right lateral femoral epicondyle. The proximal part of the goniometer was placed along the lateral aspect of the femur using the greater trochanter as a reference and the distal part was placed along the fibula using the lateral malleolus as a reference. The starting position was fixed at 0° (knee fully extended) and ROM was measured while the investigator moved slowly the knee into flexion until the participant reported muscle soreness. To take into account of the effect of muscle thixotropy (Lakie and Campbell, 2019), measurements were performed six times for the right leg and the average value of the fifth and the sixth measurements was used for data analysis. ROM was considered as an indicator of joint stiffness.

Thigh Circumference

Circumference was measured at the mid portion of the right thigh (midpoint between the greater trochanter of the femur and the lateral femoral epicondyle) while the participant in a standing position with the feet placed shoulder-width apart. Thigh was marked at the mid portion with a horizontal line using a permanent marker and measured to the nearest 0.1 cm using a tape. Thigh circumference was considered as an indicator of thigh muscles swelling.

Ultrasound Measurements

An ultrafast ultrasound scanner (Aixplorer version 12.2; Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) coupled with a linear transducer array (SuperLinear 15–4; Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) was used in both SWE (musculoskeletal preset, penetration, no persistence) and research modes, as previously proposed (Bercoff et al., 2004). The B-mode ultrasound was first set to determine the optimal transducer location and maximize the alignment between the transducer and the direction of the RF and VL muscle fascicles. Transducer alignment was considered correct when muscle fascicles and aponeurosis could be delineated across the image without interruption. The transducer was then fixed at 50% of the total muscle length respectively using a dynamic probe fixation device (with 360° adjustments, USONO, Eindhoven, Netherlands) placed over the skin, which was coated with a water-soluble transmission gel (Aquasonic, Parker laboratory, Fairfield, NJ, United States) to ensure acoustic coupling. This fixation allows to avoid any movement which could affect the position and the orientation of the probe, and avoid excessive pressure applied to the muscle. The position of the probe was marked on the skin using a permanent marker to ensure the same positioning along the experiment.

A fixed-size rectangular region of interest (ROI), i.e., the region in which shear-wave propagation was analyzed within the muscle, was placed in the middle of the B-mode image below the superficial aponeurosis within the VL and RF muscle belly. The position of the ROI was carefully located on the B-mode image during the familiarization session to be sure to keep the same ROI along the experiment. 5-s SWE sequences (frame rate: 1–2 Hz) were performed at rest for VL and RF muscles with the knee joint positioned at 90° and 120° (0° = knee fully extended).

DATA ANALYSIS

Traditional EIMD Symptoms

Neuromuscular Function Assessments

Delayed (i.e., >24 h) NM function impairment and specifically maximal voluntary contraction (MVC) torque loss is usually considered as the most reliable and valid marker for the evaluation of the magnitude of EIMD (Warren et al., 1999; Paulsen et al., 2012). MVC torque was determined as the peak torque reached during the maximal effort.

Contractile properties of the knee extensors muscles were assessed by determining the amplitude of the responses to potentiated single (Twitch) and double electrical stimulations delivered at 10 and 100 Hz (Db10 and Db100, respectively) at rest (Verges et al., 2009). The Db10 Hz-to-Db100 Hz ratio was calculated and used to assess changes in excitation-contraction (E-C) coupling. The double pulse (at 100 Hz) superimposition technique, based on the interpolated-twitch method (Merton, 1954), enabled us to estimate the maximal voluntary activation level (VAL). The VAL (Merton, 1954) was computed as follows:

$$VAL = \left(\frac{1 - superimposed\ Db100}{potentiated\ Db100} \right) \times 100$$

Twitch rate of torque development (RTD) was calculated as the slope of the torque-time curve between the onset of torque development and the peak twitch torque occurring after a single electrical stimulation, and reflect the ability of muscle to rapidly produce torque (Maffiuletti et al., 2016). It should be noted that RTD could be influenced by muscle stiffness (Maffiuletti et al., 2016).

Creatine Kinase Activity

SST tube was allowed to clot at ambient temperature for 30 min, and centrifuged (2,000 g, 4°C, 10 min). One mL of serum was collected and frozen at −80°C until further analyses. CK activity was analyzed from 200 µl of serum using an auto analyzer (Advia 1,800; Siemens Healthineers, Erlangen, Germany).

Muscle Pain Pressure Threshold

The PPT test determines the minimal amount of pressure over a given area in which a steadily increasing painless stimulus turns into a painful sensation. The mean value of the two measurements was used for analysis.

Muscle Thickness

Muscle thickness (MT) of the RF and VL muscles was assessed from three B-mode images obtained by using the Aixplorer device at knee angle of 90° (0° = knee fully extended). B-mode images were exported to a workstation and analyzed *off-line* using the ImageJ software (version 1.42, National Institute of health, Bethesda, MA, United States). Briefly, calibration was performed on the sofware using the time Gain Compensation (TGC) that automatically adjust the B-mode gain at different depths and for different tissue attenuations provided by the ultrasound scanner (Aixplorer version 12.2; Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France). Overall brightness is also automatically adjusted depending on setting of auto TGC. MT was calculated as the length (in cm) between the superficial and depth aponeurosis. MT was calculated at distal, middle, and proximal part of the B-mode image and the average value of these three lengths was used for further analysis. MT was considered as an indicator of muscle swelling.

Shear-Wave Elastography Measurements

A two-dimensional real-time shear wave velocity (in $m.s^{-1}$) color map with a spatial resolution of 1 × 1 mm was obtained, as previously described (Siracusa et al., 2019; Chalchat et al., 2020) (**Figure 2**). The shear wave velocity raw data was then transferred to a workstation, converted to shear elastic modulus (µ) and analyzed using a MATLAB script developed in our laboratory (MathWorks, Natick, MA, United States). The µ was obtained as follows:

$$\mu = \rho . Vs^2$$

where ρ is the muscle density (1,000 $kg.m^{-3}$) and V_s is the shear-wave velocity (in $m.s^{-1}$).

The µ values were averaged over the ROI (a ~36 × 114 matrix) without the empty (0 $m.s^{-1}$) and saturated (16.32 $m.s^{-1}$) values, and the average of 5-8 consecutive reconstructed images from raw data (available for Aixplorer version 12.2 with research pack) was used for subsequent analyses. As previously described by Lacourpaille et al. (2017), the slope of the relationship between the change in µ and the knee joint angle of 90° and 120° at each time point (PRE, POST, 4, 24, 48, 72 h and 7 days) was calculated and interpreted as an index of increase in µ (expressed in %). This index allowed us to compare the increase in µ between VL and RF muscles regardless of their relative length (Lacourpaille et al., 2017). We chose to investigate VL and RF muscles due to the difference anatomical properties (e.g., mono-versus bi-articular muscles) (Jacobs and van Ingen Schenau, 1992) and due to their differences in susceptibility to EIMD (Lacourpaille et al., 2017; Heales et al., 2018; Maeo et al., 2018). Raw data are displayed in **Supplementary Material S1**.

Pennation Angle

Pennation angle (PA) of the RF and VL muscles were measured from three B-mode images obtained with the ultrasound device. B-mode images were exported to a workstation and analyzed off-line using the ImageJ software (version 1.42, National Institute of health, Bethesda, MA, United States). PA was calculated as the angle (in °) between the deep aponeurosis and the muscle fascicle orientation. Measurements of PA were performed to facilitate the interpretation of µ, which could be affected by muscle architecture (Gennisson et al., 2010; Lacourpaille et al., 2012; Eby et al., 2013; Ewertsen et al., 2016). Indeed, Eby et al. (2013) found that fascicle orientation of 45° relative to ultrasound beam affect substantially shear wave modulus.

Index of Protection

In order to assess the magnitude of the protective effect conferred by the first bout of DW, an index of protection (IP) was calculated for EIMD symptoms (e.g., NM parameters, muscle µ, CK activity,

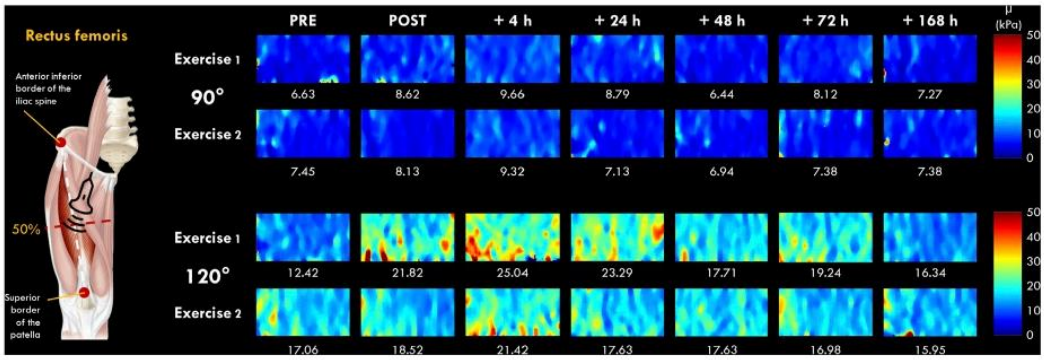


FIGURE 2 | Typical two-dimensional real-time muscle shear modulus color maps of the *rectus femoris* muscle obtained with a frame rate of 1–2 Hz and a spatial resolution of 1 × 1 mm for 90 and 120° of knee flexion (0° = full extension). Values under the color maps were the mean value of the region of interest placed in the middle of the B-mode image below the superficial aponeurosis within the RF muscle belly.

muscle soreness, PPT, thigh circumference) using an equation adapted from Chen et al. (2012): [relative changes from PRE after the exercise 2 — relative changes from PRE after the exercise 1] with PRE corresponding to 100%. For instance, when the RF μ represent 150% of the PRE value after the first exercise and only 120% after the second exercise, the calculation is: 120—150 = −30. −30% indicates that the increase in RF μ is attenuated by 30% after the second exercise compared to the first. The equation was adapted because the initial version from Chen et al. (2012) was applicable to mean values but not to individual values. Two calculations were performed for IP. The aim was i) to detect the greatest variation from PRE among the values recorded from POST to 7 days (IP for magnitude of changes); ii) to detect the rate of recovery using the final value at 7 days (IP for rate of recovery).

Statistical Analyses

The data were screened for normality of the distribution and homogeneity of variances using the Shapiro–Wilk normality and Levene tests, respectively. Then, differences in absolute or log-transformed values were analyzed using a one-way repeated measures ANOVA (effect: time) for all parameters. A two-way repeated measures ANOVA (effect: time × exercise) was performed on relative changes from PRE for all parameters, except imagery parameters (three-way: time × exercise × muscle). When no interactions (time × angle × muscle) were found for these parameters, two-way ANOVAs (effect: time × angle) with repeated measures were used to compare relative values from PRE for each muscle (i.e., RF and VL). When the ANOVA revealed significant effects or interactions between factors, Holm post-hoc tests were applied to test for differences between means. As it is not possible to compare PRE values between conditions using relative changes from PRE, we used a *t*-test to identify differences in absolute PRE values between conditions.

When the normality and homogeneity assumptions were violated despite the log transformation, a non-parametric Friedman analysis of variance was performed rather than one-way repeated measures ANOVA (VAL, muscle soreness, ROM and PPT). As two- or three-way repeated measures ANOVA are inappropriate when the assumptions are violated, we used a *t*-test to test the difference in relative changes from PRE between conditions (i.e., exercise and muscle). In this case, Holm corrections for multiple comparisons were used. Finally, Wilcoxon rank test was performed rather than *t*-test when the normality was violated.

Correlations were performed between relative changes (i.e., percentage of the initial value) in muscle μ measured 14 days after the first exercise (i.e., from PRE exercise 1 to PRE exercise 2) and both IP of EIMD symptoms (NM parameters and muscle μ, CK activity, soreness, swelling), to investigate whether long term (i.e., 14 days) changes in muscle μ are implicated in the RBE. Indeed, as the RBE is characterized by smaller and shorter alteration of EIMD symptoms after the second bout (Chen et al., 2012; Hyldahl et al., 2017), we chose to test correlations using IP of peak changes (i.e., magnitude of EIMD reduction) and IP of changes at 7 days (i.e., changes in rate of recovery of EIMD symptoms). The level of association was assessed using Pearson correlation coefficient (r) or using Spearman's rank correlation coefficient (ρ) when the normality and homogeneity assumptions were violated.

Results with a p-value < 0.05 were considered significant. Statistical procedures were performed using Jamovi (The jamovi project (2020). jamovi (Version 1.2) [Computer Software]. Retrieved from https://www.jamovi.org, Sydney, Australia). Missing data were imputed using the missMDA R package. The results presented are expressed as means ± SD. Additional information about statistical analyses were displayed in **Supplementary Material S2**.

RESULTS

PRE Exercise Measurements

The statistical analyses showed no significant differences between exercise 1 and exercise 2 for absolute PRE values of all parameters,

TABLE 1 | Absolute PRE values of Exercise 1 and Exercise 2 for all parameters. MVC: maximal voluntary torque; VAL: voluntary activation level; RTD: rate of torque development; Db10: doublet at 10 Hz; Db100: doublet at 100 Hz; RF: *rectus femoris*; VL: *vastus lateralis*; PPT: pain pressure threshold. Results with a *p*-value < 0.05 are considered significant and are displayed in bold characters.

Absolute PRE values	Exercise 1			Exercise 2			*p*
MVC force (N.m)	314.3	±	49.7	311.2	±	70.3	0.81
VAL (%)	96.6	±	2.4	96.4	±	2.2	0.79
RTD (N.m.s^{-1})	1,137	±	261	1,067	±	277	0.27
Twitch (N.m)	67.5	±	14.7	65.8	±	14.5	0.35
Db10 (N.m)	105.4	±	22.9	103,0	±	23.6	0.45
Db100 (N.m)	100.1	±	19.6	99.3	±	18.6	0.77
Db10-to-Db100 Hz ratio	1.05	±	0.13	1.06	±	0.14	0.95
Creatine kinase (U/L)	151	±	11	151	±	13	0.43
Muscle Soreness (cm)	0.2	±	0.6	0.0	±	0.9	0.69
RF PPT (kPa)	415	±	127	406	±	129	0.30
VL PPT (kPa)	451	±	88	433	±	91	0.07
Range of motion (°)	150.7	±	10.8	151.5	±	12.7	0.61
Thigh Circumference (cm)	57.5	±	3.7	57.3	±	3.3	0.42
RF muscle thickness (cm)	2.46	±	0.35	2.58	±	0.38	0.29
VL muscle thickness (cm)	2.34	±	0.41	2.43	±	0.42	0.09
RF pennation angle (°)	12.9	±	2.7	13.8	±	3.8	0.28
VL pennation angle (°)	9.7	±	2.7	12.2	±	4.1	**0.02**
RF shear modulus (slope)	0.44	±	0.26	0.57	±	0.27	**<0.001**
VL shear modulus (slope)	0.18	±	0.09	0.2	±	0.09	0.33

except for RF μ and VL PA, which were higher before exercise 2 (**Table 1**).

Traditional EIMD Symptoms

Neuromuscular Function Assessments

As expected, ANOVA revealed a time effect for absolute values of MVC torque, twitch, Db10, Db100, and Db10-to-Db100 Hz ratio after exercise 1 and exercise 2 ($p < 0.001$; **Figure 3**). Moreover, significant interactions (time × exercise) were found for MVC torque, Db10 and Db100. The Friedman test also revealed a time effect for absolute values of VAL after the exercise 1 ($p < 0.001$) but not after the exercise 2 ($p = 0.79$).

MVC torque was significantly decreased up to 72 h after the exercise 1 whereas it was decreased up to 4 h after the exercise 2 (**Figure 3A**). Moreover, post-hoc analysis revealed a smaller decrease in MVC torque after the exercise 2 compared to the exercise 1 at all measurement times (**Figure 3A**).

VAL was significantly decreased up to 72 h after the exercise 1 whereas no significant changes were found after the exercise 2. Moreover, greater changes of VAL were found after the exercise 1 compared to the exercise 2 at POST (−6.8 ± 4.8% vs −1.9 ± 3.7%; $p = 0.010$) and 48 h (−5.1 ± 4.1% vs. +0.2 ± 2.5%; $p < 0.001$) post-exercise, but not at 4 h (−4.3 ± 5.4% vs. −0.7 ± 3.5%; $p = 0.072$), 24 h (−4.5 ± 4.4% vs.−1.5 ± 2.5%; $p = 0.099$), 72 h (−1.3 ± 2.7% vs. +0.3 ± 2.2%; $p = 0.152$) and 7 days (+0.2 ± 2.5% vs. +0.3 ± 1.9%; $p = 0.913$).

RTD was significantly decreased up to 48 h after the exercise 1 whereas it was decreased up to 4 h after the exercise 2 (**Figure 3B**). Moreover, the average decrease of RTD during the days following exercise was smaller after the exercise 2 compared to the exercise 1 (**Figure 3B**).

Similarly, twitch amplitude was significantly decreased up to 48 h after the exercise 1 whereas it was decreased up to 4 h after the exercise 2 (**Figure 3C**). Moreover, the average decrease of twitch amplitude during the days following exercise was smaller after the exercise 2 compared to the exercise 1 (**Figure 3C**).

Db10 amplitude was significantly decreased up to 48 h after the exercise 1 whereas it was decreased up to 4 h after the exercise 2 (**Figure 3D**). Moreover, Db10 amplitude was significantly less decreased after the exercise 2 compared to the exercise 1 at POST to 72 h post-exercise (**Figure 3D**).

Db100 amplitude was significantly decreased up to 72 h after the exercise 1 whereas it was decreased up to 4 h after the exercise 2 (**Figure 3E**). Moreover, Db100 amplitude was significantly less decreased 24 h after the exercise 2 compared to the exercise 1 (**Figure 3E**).

Db10-to-Db100 Hz ratio was significantly decreased up to 48 h after the exercise 1 whereas it was decreased up to 4 h after the exercise 2 (**Figure 3F**). Moreover, the average decrease of the Db10-to-Db100 Hz ratio during the days following exercise was smaller after the exercise 2 compared to the exercise 1 (**Figure 3F**).

Creatine Kinase

ANOVA revealed a time effect for absolute values of CK activity after exercise 1 and exercise 2 ($p < 0.001$). CK activity was increased up to 7 days and up to 72 h after the exercise 1 and 2, respectively (**Figure 4A**). Moreover, a significant interaction effect (time × exercise) was found for this parameter ($p < 0.001$). Post-hoc analysis revealed a smaller increase in this parameter after the second exercise compared to the first exercise at 6–168 h (7 days) post-exercise (**Figure 4A**).

Muscle Soreness

The Friedman test showed a significant effect of time for muscle soreness after the exercise 1 and the exercise 2 ($p < 0.001$). Muscle soreness was increased up to 72 h after both exercise 1 and exercise 2 (**Figure 4B**). Moreover, a greater increase in muscle soreness was found after the exercise 1 compared to the exercise 2 at POST, 24, 48, and 72 h post-exercise (**Figure 4B**).

Range of Motion

The Friedman test showed a significant effect of time for ROM after the exercise 1 and the exercise 2 ($p < 0.001$). ROM was decreased between 24 and 72 h after the exercise 1 and between 24 and 48 h after the exercise 2 (**Figure 4C**). ROM was decreased by a smaller amplitude after the second exercise compared to the first exercise at 48 h post-exercise (**Figure 4C**).

Thigh Circumference

ANOVA showed no significant effect of time ($p = 0.10$); exercise ($p = 0.47$) or interaction (time × exercise; $p = 0.08$) for thigh circumference (**Figure 4D**).

Pain Pressure Threshold

The Friedman test showed a significant effect of time for both RF and VL PPT after the exercise 1 and the exercise 2 ($p < 0.001$). RF PPT was decreased at 24 and 48 h after the exercise 1 and between 4 and 48 h after the exercise 2 (**Figure 4E**). VL PPT was decreased at 24 and 48 h after the exercise 1 and only at 48 h after the

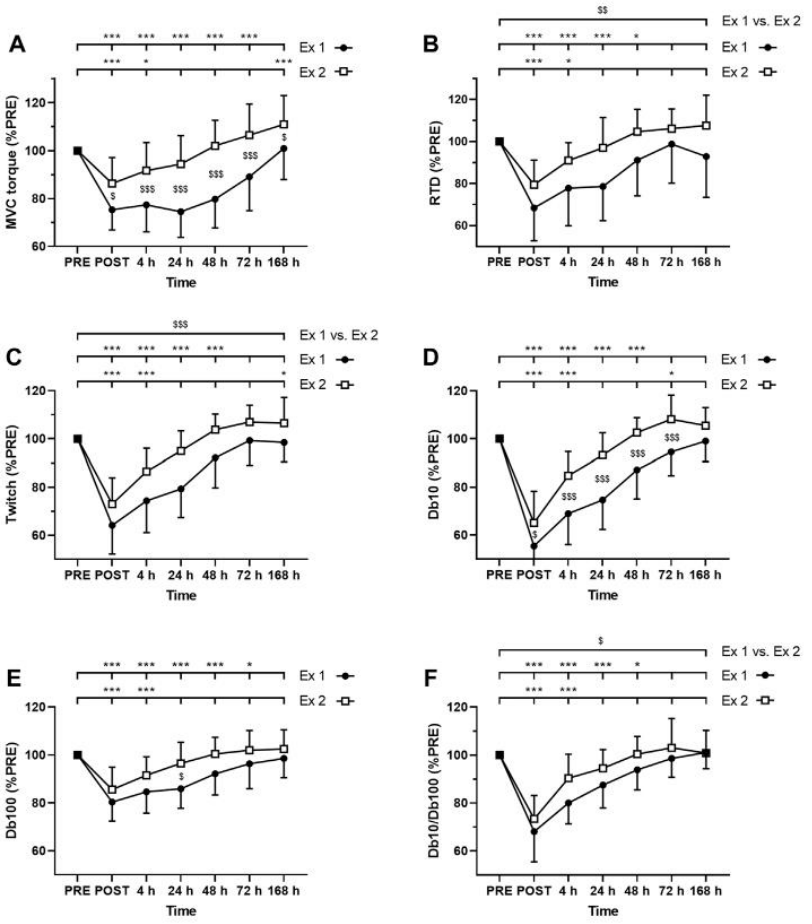


FIGURE 3 | Time course of **(A)** maximal voluntary contraction (MVC) torque **(B)** rate of torque development **(C)** twitch amplitude **(D)** amplitude of the doublet at 10 Hz (Db10) **(E)** amplitude of the doublet at 100 Hz (Db100) and **(F)** Db10 Hz-to-Db100 Hz ratio (Db10/Db100). *, ** and *** correspond to significant difference from PRE value at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. $, $$ and $$$ correspond to significant difference between exercise 1 and exercise 2 at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

exercise 2 (**Figure 4F**). Three-way ANOVA did not show any muscle effect ($p = 0.451$).

Muscle Thickness

ANOVA revealed a time effect for absolute RF MT after exercise 1 ($p < 0.001$) but not after exercise 2 ($p = 0.062$). Similarly, ANOVA revealed a time effect for absolute VL MT after exercise 1 ($p = 0.02$) but not after exercise 2 ($p = 0.431$). RF MT was increased up to 7 days after the exercise 1 (**Figure 5A**), whereas VL was increased at 24, 48 h and 7 days (**Figure 5B**). Moreover, the average increase of the MT during the days following exercise was smaller after the exercise 2 compared to the exercise 1 for VL ($p = 0.009$; **Figure 5B**) but not for RF (RF: $p = 0.094$; **Figure 5A**). The three-way ANOVA showed that RF MT was, on average, more increased than VL MT ($p < 0.001$).

Pennation Angle

ANOVA revealed a time effect for absolute RF PA after exercise 1 ($p = 0.006$) but not after exercise 2 ($p = 0.697$). Similarly, ANOVA revealed a time effect for absolute VL PA after exercise 1 ($p = 0.003$) but not after exercise 2 ($p = 0.758$). RF PA was increased at 4, 24, and 48 h after the exercise 1 (**Figure 5C**), whereas VL PA was increased at 4 and 24 h (**Figure 5D**). Three-way ANOVA did not show any muscle effect ($p = 0.491$).

Muscle Shear Modulus (μ)

ANOVA revealed a time effect for absolute RF μ after exercise 1 and exercise 2 ($p < 0.001$). Similarly, ANOVA revealed a time effect for absolute VL μ after exercise 1 ($p < 0.001$) and exercise 2 ($p = 0.01$). RF μ was increased up to 7 days after the exercise 1 (**Figure 6A**). VL μ was transiently

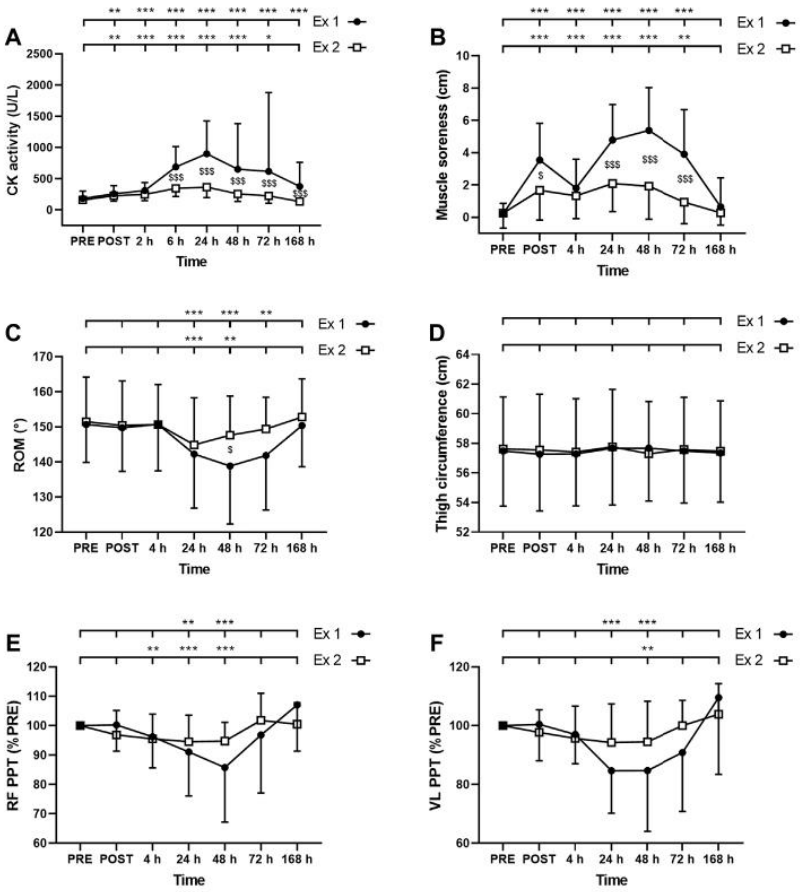


FIGURE 4 | Time course of **(A)** serum creatine kinase (CK) activity **(B)** muscle soreness **(C)** range of motion (ROM), thigh circumference **(D)**, and pain pressure threshold (PPT) for **(E)** *rectus femoris* (RF) and **(F)** *vastus lateralis* (VL) for exercise 1 and 2. *, ** and *** correspond to significant difference from PRE value at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. $, $$ and $$$ correspond to significant difference between exercise 1 and exercise 2 at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

increased up to 24 h after exercise 1 whereas no significant changes were found after the exercise 2 (**Figure 6B**). The average increase of relative changes in RF μ from PRE during the days following exercise was smaller after the exercise 2 compared to the exercise 1 (**Figure 6A**). However, relative changes in VL μ from PRE were not significantly different between the exercises (**Figure 6B**). No significant interactions (time × exercise) were found for RF and VL μ.

Absolute RF μ PRE value was significantly greater for the exercise 1 compared to exercise 2 (**Figure 6C**). Such a difference was not observed for absolute VL μ PRE values between exercise 1 and exercise 2 (**Figure 6C**). Absolute μ PRE values were significantly higher for RF compared to VL for exercises 1 and 2 (**Figure 6C**). Moreover, the average increase of relative changes in μ from PRE during the days following exercise was smaller for VL compared to RF after the exercise 1 ($p = 0.04$) but not after the exercise 2 ($p = 0.87$).

Correlation Between Resting μ at 14 days and Index of Protection

A correlation was found between relative changes in RF μ measured 14 days after the first exercise (i.e., from PRE exercise 1 to PRE exercise 2), and the IP for RF μ for peak changes and changes at 7 days post-exercise (**Figure 7A**). The greater the increase of RF μ 14 days after the first exercise, the smaller the increase of RF μ after the second exercise bout compared to the first bout (for both peak changes and changes at 7 days; **Figure 7A**). Similarly, a correlation was found between relative changes in VL μ measured 14 days

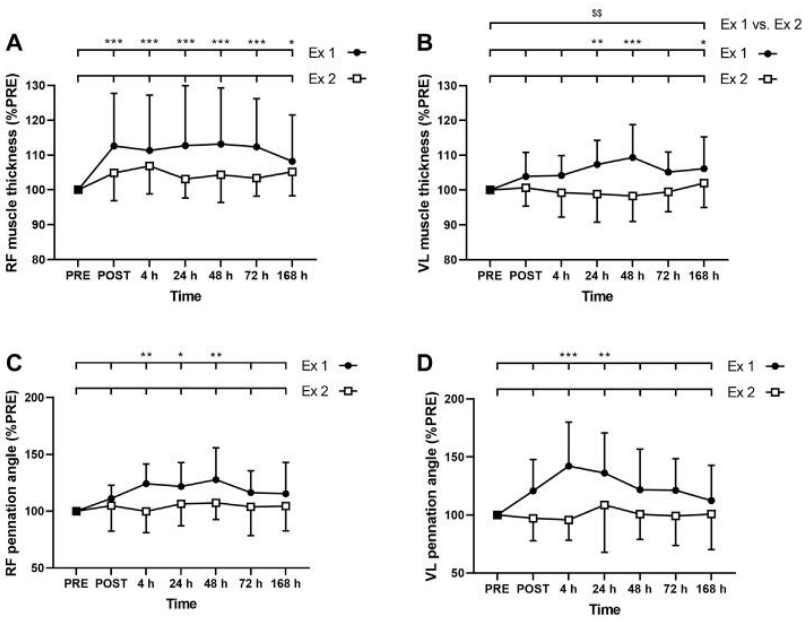


FIGURE 5 | Time course of **(A)** *rectus femoris* (RF) and **(B)** *vastus lateralis* (VL) muscle thickness, and **(C)** RF and **(D)** VL pennation angle for exercise 1 and exercise 2. *, ** and *** correspond to significant difference from PRE value at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. $$: significant difference between exercise 1 and exercise 2 at $p < 0.01$.

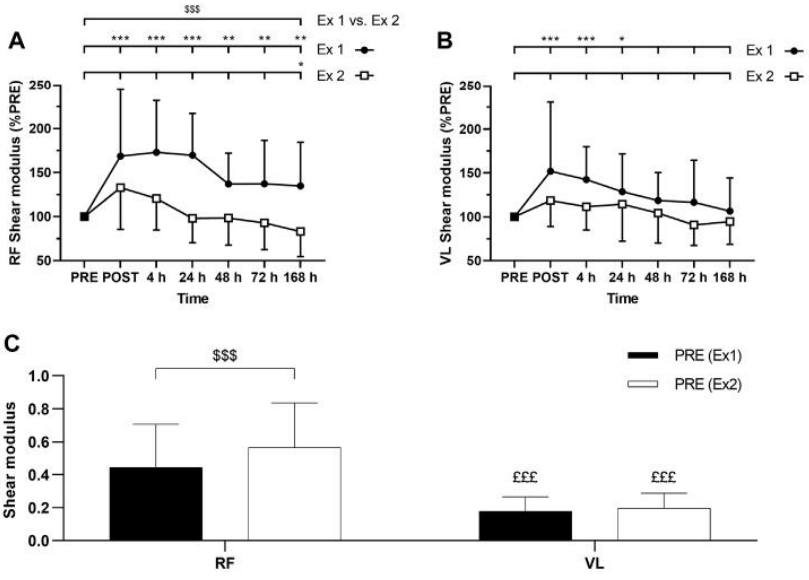


FIGURE 6 | Time course of **(A)** *rectus femoris* (RF) and **(B)** *vastus lateralis* (VL) shear modulus expressed in percentage of PRE value for exercise 1 and 2, and **(C)** absolute values of RF and VL shear modulus (slope) at PRE for exercise 1 and exercise 2. Ex: Exercise. *, ** and *** correspond to significant difference from PRE value at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. $$$: significant difference between exercise 1 and exercise 2 at $p < 0.001$, £££: significantly different from RF value at $p < 0.001$.

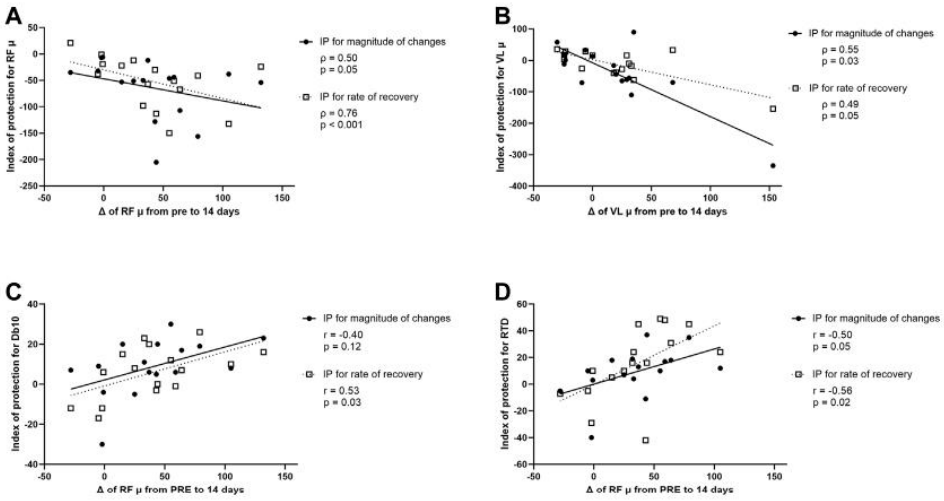


FIGURE 7 | (A) Correlation between modifications (Δ) of *rectus femoris* (RF) muscle shear elastic modulus (μ) from PRE to 14 days after the first exercise (i.e., from PRE exercise 1 to PRE exercise 2) and index of protection (IP) for magnitude of changes (filled circle) or rate of recovery (open square) for RF μ. **(B)** Correlation between Δ of *vastus lateralis* (VL) μ from PRE to 14 days after the first exercise and IP for magnitude of changes (filled circle) or rate of recovery (open square) for VL μ. **(C)** Correlation between Δ of RF μ from PRE to 14 days after the first exercise and IP for magnitude of changes (filled circle) or rate of recovery (open square) for the amplitude of the doublet at 10 Hz (Db10). **(D)** Correlation between Δ of RF μ from PRE to 14 days after the first exercise and IP for magnitude of changes (filled circle) and rate of recovery (open square) for the rate of torque development (RTD).

after the first exercise, and the IP for VL μ for peak changes and changes at 7 days post-exercise (**Figure 7B**). The greater the increase in VL μ 14 days after the first exercise, the smaller the increase of VL μ after the second exercise bout compared to the first bout (for both peak changes and changes at 7 days; **Figure 7B**).

A correlation was also found between relative changes in RF μ measured 14 days after the first exercise and the IP for Db10 for changes at 7 days post-exercise but not for peak changes (**Figure 7C**). The greater the increase of RF μ 14 days after the first exercise, the smaller the decrease of Db10 after the second exercise bout compared to the first bout (only for changes at 7 days; **Figure 7C**). Finally, a significant correlation was found between relative changes in RF μ measured 14 days after the first exercise and the IP for RTD and the IP for RF μ for peak changes and changes at 7 days post-exercise (**Figure 7D**). The greater the increase of RF μ 14 days after the first exercise, the smaller the decrease of RTD after the second exercise bout compared to the first bout (for both peak changes and changes at 7 days; **Figure 7D**).

No significant correlation was found between relative changes in RF and VL μ measured 14 days after the first exercise and both IP for other NM parameters and EIMD symptoms (CK activity, muscle soreness, PPT, thigh circumference).

DISCUSSION

This study was designed to determine whether the resting μ of the quadriceps muscle group (VL and RF muscles) is sensitive to the RBE. We observed that the resting μ increased to a smaller extent and for a shorter duration after a second bout of eccentric-biased exercise compared to the same bout performed 2 weeks earlier confirming therefore the hypothesis that the first bout of DW exercise confers an adaptation of the RF muscle stiffness. Indeed, RF μ remained elevated 2 weeks after the end of the first exercise (i.e., before the second bout), when EIMD symptoms disappeared. However, the adaptation was not observed for VL μ, confirming the hypothesis that the adaptive response differs between the RF and VL. Moreover, we found that the increase in RF muscle stiffness observed 14 days after the first exercise bout was correlated with the functional protection conferred by the RBE (i.e., attenuation of muscle μ, Db10, and RTD impairments after the second bout).

Magnitude and Time Course of Traditional EIMD Symptoms

As expected, the repetition of exercise bouts induced a RBE: symptoms of EIMD (CK, muscle soreness, MT, ROM) and NM alterations (MVC torque, VAL, RTD, twitch, Db10, Db100, Db10-to-Db100 Hz ratio) were less important, and recovered quicker after exercise 2. This is consistent with previous reports (Clarkson et al., 1992; Chen et al., 2012; Souron et al., 2018). The lesser decrease in VAL observed after the second exercise bout compared to the first bout suggests that the difference in MVC torque loss between the two exercises could be partly explained by neural factors, which is consistent

with the literature. Indeed, Goodall et al. (2017) showed that the RBE may be partly explained by modifications in motor corticospinal drive (i.e., smaller reduction in VAL measured using motor cortical stimulation after the second bout). Less muscle damage experienced the days after the second bout could be associated with reduced nociceptive III and IV afferents activity and then decreased alterations at spinal and/or supra-spinal levels that could impact the VAL (Behrens et al., 2012). In line with Souron et al. (2018), we also found that peripheral (i.e., muscular) factors were largely implicated in the reduced NM function loss observed after the second bout. Indeed, the amplitudes of the evoked mechanical responses (Twitch, Db10 and Db100), and the Db10-to-Db100 Hz ratio were less affected after the second exercise compared to the first one. These results may suggest a proportional adaptation of contractile properties and/or E-C coupling (Gandevia, 2001), and more specifically, less impairments in calcium homeostasis. We showed that E-C coupling function estimated by the Db10-to-Db100 Hz ratio was more affected and for a longer duration after the first compared to the second exercise (48 vs. 4 h). This is consistent with Janecki et al. (2016) who found that low frequency fatigue was more affected 24 and 48 h after a first bout compared to a second bout of ECC of the elbow flexors.

Magnitude and Time Course of Muscle μ

Consistent with the results reported in the literature (Lacourpaille et al., 2014), we found that resting VL and RF μ were significantly increased from POST to 24 h after the first exercise. One of the major hypothesis related to the increase in resting muscle μ after ECC is the perturbation of calcium homeostasis (i.e., increase in intramuscular calcium concentration) (Lacourpaille et al., 2014; Lacourpaille et al., 2017) induced by the disruption of structural muscle proteins (Paulsen et al., 2012). Indeed, the increase in intramuscular calcium concentration could trigger an augmentation of stable attached cross-bridges number (i.e., "contracture clots") increasing muscle stiffness (Whitehead et al., 2001; Lacourpaille et al., 2014; Lacourpaille et al., 2017). However, the raise of RF μ exceed 48 h after the first exercise, when E-C coupling (i.e., Db10-to-Db100 Hz ratio) had fully recovered. These results suggest that the perturbation of calcium regulation was not the sole mechanism implicated in the increase of muscle μ. It could be that this late increase was due to the presence of edema (Howell et al., 1993). Indeed, even if we did not find an increase in thigh circumference, we found an increase of MT (peak: ~+10%) up to 7 days for RF and at 24, 48 h and 7 days for VL, potentially reflecting muscle swelling (Clarkson et al., 1992). Based on these results, we cannot discard the effect of delayed fluid accumulation occurring after eccentric-biased exercise on muscle stiffness. It should be noted that ROM (i.e., the knee joint stiffness) was differently affected by the eccentric-biased exercise compared to resting μ (i.e., muscle stiffness) since ROM was only increased between 24 and 72 h. These discrepancies in terms of time-course could be explained by the fact that ROM represent a global joint stiffness whereas μ represent individual muscles.

Long Term Elevation of Muscle μ as "Protective" Adaptation

RF μ remained elevated up to 14 days after the first exercise. These results are consistent with Lacourpaille et al. (2014) who reported an elevated resting μ 21 days after an ECC of the elbow flexors. These authors (Lacourpaille et al., 2014) suggested that muscles became stiffer in response to a damaging exercise bout to protect muscles against a subsequent EIMD. However, they were unable to confirm this hypothesis due to a lack of recovery of muscle function 21 days after the ECC, suggesting that the resting μ could be also due to persistent damage. In the present study, as the EIMD symptoms had disappeared (e.g., MVC torque loss) 14 days after the first exercise, it seems reasonable to assume that the RF μ increase at this time point could reflect muscle and/or connective tissue adaptations.

Furthermore, we showed that the increases in RF and VL μ observed 14 days after the first exercise (+28% and +10%, respectively) were correlated with the IP for magnitude of changes and IP of rate of recovery, suggesting a reduced elevation and quicker recovery of RF and VL μ after the second bout compared to the first bout. These correlations confirm that the muscle could became stiffer to confer protection against a subsequent damaging exercise bout, as suggested by Hyldahl et al. (2017). These authors reported that skeletal muscle extracellular matrix remodeling could increase passive stiffness the weeks following a bout of ECC. We also showed that the increase in RF μ observed 14 days after the first exercise was correlated with the functional protection conferred by the RBE (i.e., attenuation of Db10 and RTD impairments after the second bout). The fact that the long term increase in muscle stiffness conferred by a bout of eccentric-biased exercise mainly affected submaximal force production is consistent with the fact that these responses are more sensitive to changes in mechanical properties (Maffiuletti et al., 2016). From a functional point of view, changes in muscle stiffness could impact functional submaximal tasks that involve stretch shortening cycle such as walking or running (Saunders et al., 2004), where muscle stiffness is a key determinant of performance.

Differences Between VL and RF Responses

We hypothesized that the magnitude of the alteration and the adaptive response would differ between the quadriceps muscles (i.e., RF vs VL) due to the fact that muscles are heterogeneously stretched during the exercise, owing to their differences in their anatomical (i.e., mono- and bi-articular muscles) properties (Green et al., 2012; Maeo et al., 2018). We showed that, despite RF and VL PPT being not differently affected after the exercises, RF MT was, on average, more increased than VL MT. Moreover, RF μ was more increased and for a longer duration compared to VL μ after the exercise 1 (up to 14 days and 24 h, respectively). These results are consistent with previous reports showing that RF is more affected than other muscle heads of the quadriceps after eccentric-biased exercise (Lacourpaille et al., 2017; Heales et al., 2018; Maeo et al., 2018; Xu et al., 2019; Ema et al., 2021).

RF μ increased 14 days after the first exercise (i.e., before the second exercise) whereas no increase in VL μ was observed at this time point. As RF μ was more affected than VL μ in terms of magnitude and time-course, it could be that the mechanical stress induced by the loaded DW was not sufficient to induce an important level of damage and a subsequent mechanical adaptation on the VL muscle. Indeed, Hyldahl et al. (2017) reported that the magnitude of the protective effect is related to the intensity of the initial bout. The present results are consistent with Ema et al. (2021) who found that the RBE was conferred on RF but not on VL after eccentric contractions of the knee extensors.

Limitations

Given that fascicle orientation relative to ultrasound beam affects shear wave velocity (Eby et al., 2013), a difference in PA variation over time could differently affect the measurement between muscles (Lacourpaille et al., 2012). The increase in RF and VL PA observed between 4 and 48 h after the first exercise could decrease shear wave velocity, which could contribute to underestimate RF and VL μ at these time points. After exercise 2, no change in PA was observed for both RF and VL muscles. Therefore, PA should not affect changes in μ after the second exercise. As μ could be underestimated after the exercise 1 but not after the exercise 2, the magnitude of the difference in μ between the two exercise bouts could be underestimated. If this effect is present, it is certainly weak. Indeed, it should be noted that changes in PA are relatively small (<5°) in the present study, which should have a very small effect on shear wave velocity.

CONCLUSION

The resting μ (i.e., muscle stiffness) increased to a smaller extent and for a shorter duration after a second bout of eccentric-biased exercise compared to the same bout performed 2 weeks earlier, representing the adaptations conferred by the RBE. The first damaging exercise induced a persistent (i.e., at least 2 weeks) elevation in muscle stiffness, potentially reflecting a mechanical adaptation involved in the RBE. Indeed, this persistent increase in muscle μ was associated with the functional protection conferred by the RBE. The mechanical adaptation is more evident on the muscle that has experienced the greatest changes in muscle stiffness after the first bout (i.e., RF). It could be that a certain level of mechanical stress is necessary to induce this persistent increase in muscle μ. More studies are needed to better understand the mechanisms involved in the modifications of muscle stiffness after eccentric-biased exercises. Muscle activation and muscle mechanical behaviors should be investigated during the exercise to better understand the differences in muscle μ changes between synergists muscles. Further studies should also investigate the mechanisms involved in the acute and long-term muscle mechanical properties modifications of muscle μ and their implication in the RBE.

Clinical Application

The results of the present study suggest that SWE may be considered a valuable measurement tool, complementary to traditional EIMD markers, to assess protection of individual muscles conferred by the RBE (reduced alteration of the whole muscle system function). Moreover, the results provide a better understanding of the mechanical adaptations conferred by the RBE which could explain why muscles are more resistant after a first bout of eccentric exercise. It may have important applications in clinical and sport context to better adapt the exercise load. It could be interesting to modify the articular joints angles in order to adapt the recruitment of each muscle to modulate their mechanical stress and the potential mechanical adaptations, as previously tested by Ema et al. (2021).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Materials**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Regional Ethics Committee (CPP Ile-de-France 8, France, registration number: 2019-A01210-57, SMILE). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EC, JS, VM, and SG-V designed the research and wrote the manuscript. EC, JS, and SG-V collected and analyzed the data. All authors contributed to the interpretation of the data and revising the manuscript, and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Benoît Lepetit, Stéphane Baugé, Phillippe Colin, Caroline Dussault, Stéphanie Bourdon, Alexandra Malgoyre, Pierre-Emmanuel Tardo-Dino, Walid Bouaziz, Olivier Nespoulous and the IRBA Biological Analyses Unit for their technical and medical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.877485/full#supplementary-material

REFERENCES

Bachasson, D., Dubois, G. J. R., Allenbach, Y., Benveniste, O., and Hogrel, J.-Y. (2018). Muscle Shear Wave Elastography in Inclusion Body Myositis: Feasibility, Reliability and Relationships with Muscle Impairments. *Ultrasound Med. Biol.* 44 (7), 1423–1432. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2018.03.026

Behrens, M., Mau-Moeller, A., and Bruhn, S. (2012). Effect of Exercise-Induced Muscle Damage on Neuromuscular Function of the Quadriceps Muscle. *Int. J. Sports Med.* 33 (8), 600–606. doi:10.1055/s-0032-1304642

Bercoff, J., Tanter, M., and Fink, M. (2004). Supersonic Shear Imaging: a New Technique for Soft Tissue Elasticity Mapping. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect., Freq. Contr.* 51 (4), 396–409. doi:10.1109/tuffc.2004.1295425

Chalchat, E., Gennisson, J.-L., Peñailillo, L., Oger, M., Malgoyre, A., Charlot, K., et al. (2020). Changes in the Viscoelastic Properties of the Vastus Lateralis Muscle with Fatigue. *Front. Physiol.* 11, 307. doi:10.3389/fphys.2020.00307

Chen, T. C.-C., Chen, H.-L., Pearce, A. J., and Nosaka, K. (2012). Attenuation of Eccentric Exercise-Induced Muscle Damage by Preconditioning Exercises. *Med. Sci. Sports Exerc.* 44 (11), 2090–2098. doi:10.1249/MSS.0b013e31825f69f3

Clarkson, P. M., Nosaka, K., and Braun, B. (1992). Muscle Function after Exercise-Induced Muscle Damage and Rapid Adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24 (5), 512–520. doi:10.1249/00005768-199205000-00004

Dartnall, T. J., Nordstrom, M. A., and Semmler, J. G. (2011). Adaptations in Biceps Brachii Motor Unit Activity after Repeated Bouts of Eccentric Exercise in Elbow Flexor Muscles. *J. Neurophysiol.* 105 (3), 1225–1235. doi:10.1152/jn.00854.2010

Duclay, J., Martin, A., Robbe, A., and Pousson, M. (2008). Spinal Reflex Plasticity during Maximal Dynamic Contractions after Eccentric Training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 40 (4), 722–734. doi:10.1249/MSS.0b013e3181684dc

Eby, S. F., Song, P., Chen, S., Chen, Q., Greenleaf, J. F., and An, K.-N. (2013). Validation of Shear Wave Elastography in Skeletal Muscle. *J. Biomech.* 46 (14), 2381–2387. doi:10.1016/j.jbiomech.2013.07.033

Ema, R., Nosaka, K., Kawashima, R., Kanda, A., Ikeda, K., and Akagi, R. (2021). Muscle Length Influence on Rectus Femoris Damage and Protective Effect in Knee Extensor Eccentric Exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 31 (3), 597–609. doi:10.1111/sms.13890

Ewertsen, C., Carlsen, J. F., Christiansen, I. R., Jensen, J. A., and Nielsen, M. B. (2016). Evaluation of Healthy Muscle Tissue by Strain and Shear Wave Elastography - Dependency on Depth and ROI Position in Relation to Underlying Bone. *Ultrasonics* 71, 127–133. doi:10.1016/j.ultras.2016.06.007

Fridén, J., Kjörell, U., and Thornell, L.-E. (1984). Delayed Muscle Soreness and Cytoskeletal Alterations: an Immunocytological Study in Man. *Int. J. Sports Med.* 05 (1), 15–18. doi:10.1055/s-2008-1025873

Gandevia, S. C. (2001). Spinal and Supraspinal Factors in Human Muscle Fatigue. *Physiol. Rev.* 81 (4), 1725–1789. doi:10.1152/physrev.2001.81.4.1725

Gennisson, J.-L., Deffieux, T., Macé, E., Montaldo, G., Fink, M., and Tanter, M. (2010). Viscoelastic and Anisotropic Mechanical Properties of *In Vivo* Muscle Tissue Assessed by Supersonic Shear Imaging. *Ultrasound Med. Biol.* 36 (5), 789–801. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.02.013

Goodall, S., Thomas, K., Barwood, M., Keane, K., Gonzalez, J. T., St Clair Gibson, A., et al. (2017). Neuromuscular Changes and the Rapid Adaptation Following a Bout of Damaging Eccentric Exercise. *Acta Physiol.* 220 (4), 486–500. doi:10.1111/apha.12844

Green, M. A., Sinkus, R., Gandevia, S. C., Herbert, R. D., and Bilston, L. E. (2012). Measuring Changes in Muscle Stiffness after Eccentric Exercise Using Elastography. *NMR Biomed.* 25 (6), 852–858. doi:10.1002/nbm.1801

Heales, L. J., Badya, R., Ziegenfuss, B., Hug, F., Coombes, J. S., van den Hoorn, W., et al. (2018). Shear-wave Velocity of the Patellar Tendon and Quadriceps Muscle Is Increased Immediately after Maximal Eccentric Exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 118 (8), 1715–1724. doi:10.1007/s00421-018-3903-2

Hoffman, B. W., Cresswell, A. G., Carroll, T. J., and Lichtwark, G. A. (2016). Protection from Muscle Damage in the Absence of Changes in Muscle Mechanical Behavior. *Med. Sci. Sports Exerc.* 48 (8), 1495–1505. doi:10.1249/MSS.0000000000000920

Howatson, G., Taylor, M. B., Rider, P., Motawar, B. R., McNally, M. P., Solnik, S., et al. (2011). Ipsilateral Motor Cortical Responses to TMS during Lengthening and Shortening of the Contralateral Wrist Flexors. *Eur. J. Neurosci.* 33 (5), 978–990. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07567.x

Howell, J. N., Chleboun, G., and Conatser, R. (1993). Muscle Stiffness, Strength Loss, Swelling and Soreness Following Exercise-Induced Injury in Humans. *J. Physiol.* 464, 183–196. doi:10.1113/jphysiol.1993.sp019629

Hyldahl, R. D., Chen, T. C., and Nosaka, K. (2017). Mechanisms and Mediators of the Skeletal Muscle Repeated Bout Effect. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 45 (1), 24–33. doi:10.1249/JES.0000000000000095

Jacobs, R., and van Ingen Schenau, G. J. (1992). Control of an External Force in Leg Extensions in Humans. *J. Physiol.* 457, 611–626. doi:10.1113/jphysiol.1992.sp019397

Janecki, D., Jaskólska, A., Marusiak, J., and Jaskólski, A. (2016). Low-Frequency Fatigue Assessed as Double to Single Twitch Ratio after Two Bouts of Eccentric Exercise of the Elbow Flexors. *J. Sports Sci. Med.* 15 (4), 697–703. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27928216/

Kawakami, Y., Abe, T., and Fukunaga, T. (1993). Muscle-fiber Pennation Angles Are Greater in Hypertrophied Than in normal Muscles. *J. Appl. Physiol.(1985)* 74 (6), 2740–2744. doi:10.1152/jappl.1993.74.6.2740

Lacourpaille, L., Hug, F., Bouillard, K., Hogrel, J.-Y., and Nordez, A. (2012). Supersonic Shear Imaging Provides a Reliable Measurement of Resting Muscle Shear Elastic Modulus. *Physiol. Meas.* 33 (3), N19–N28. doi:10.1088/0967-3334/33/3/N19

Lacourpaille, L., Nordez, A., Hug, F., Couturier, A., Dibie, C., and Guilhem, G. (2014). Time-course Effect of Exercise-Induced Muscle Damage on Localized Muscle Mechanical Properties Assessed Using Elastography. *Acta Physiol.* 211 (1), 135–146. doi:10.1111/apha.12272

Lacourpaille, L., Nordez, A., Hug, F., Doguet, V., Andrade, R., and Guilhem, G. (2017). Early Detection of Exercise-Induced Muscle Damage Using Elastography. *Eur. J. Appl. Physiol.* 117 (10), 2047–2056. doi:10.1007/s00421-017-3695-9

Lakie, M., and Campbell, K. S. (2019). Muscle Thixotropy-Where Are We Now?. *J. Appl. Physiol.(Bethesda, Md.:1985)* 126, 1790–1799. doi:10.1152/japplphysiol.00788.2018

Lau, W. Y., Blazevich, A. J., Newton, M. J., Wu, S. S. X., and Nosaka, K. (2015). Reduced Muscle Lengthening during Eccentric Contractions as a Mechanism Underpinning the Repeated-Bout Effect. *Am. J. Physiology-Regulatory, Integr. Comp. Physiol.* 308 (10), R879–R886. doi:10.1152/ajpregu.00338.2014

Maeo, S., Saito, A., Otsuka, S., Shan, X., Kanehisa, H., and Kawakami, Y. (2018). Localization of Muscle Damage within the Quadriceps Femoris Induced by Different Types of Eccentric Exercises. *Scand. Med Sci Sports* 28 (1), 95–106. doi:10.1111/sms.12880

Maffiuletti, N. A., Aagaard, P., Blazevich, A. J., Folland, J., Tillin, N., and Duchateau, J. (2016). Rate of Force Development: Physiological and Methodological Considerations. *Eur. J. Appl. Physiol.* 116 (6), 1091–1116. doi:10.1007/s00421-016-3346-6

Merton, P. A. (1954). Voluntary Strength and Fatigue. *J. Physiol.* 123 (3), 553–564. doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005070

Narici, M. (1999). Human Skeletal Muscle Architecture Studied *In Vivo* by Non-invasive Imaging Techniques: Functional Significance and Applications. *J. Electromyogr. Kinesiol.* 9 (2), 97–103. doi:10.1016/s1050-6411(98)00041-8

Paulsen, G., Mikkelsen, U. R., Raastad, T., and Peake, J. M. (2012). Leucocytes, Cytokines and Satellite Cells: what Role Do They Play in Muscle Damage and Regeneration Following Eccentric Exercise? *Exerc. Immunol. Rev.* 18, 42–97. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22876722/

Peñailillo, L., Blazevich, A. J., and Nosaka, K. (2015). Muscle Fascicle Behavior during Eccentric Cycling and its Relation to Muscle Soreness. *Med. Sci. Sports Exerc.* 47 (4), 708–717. doi:10.1249/MSS.0000000000000473

Proske, U., and Morgan, D. L. (2001). Muscle Damage from Eccentric Exercise: Mechanism, Mechanical Signs, Adaptation and Clinical Applications. *J. Physiol.* 537 (Pt 2), 333–345. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.00333.x

Saunders, P. U., Pyne, D. B., Telford, R. D., and Hawley, J. A. (2004). Factors Affecting Running Economy in Trained Distance Runners. *Sports Med.* 34 (7), 465–485. doi:10.2165/00007256-200434070-00005

Schuklenk, U. (2001). Helsinki Declaration Revisions. *Issues Med. Ethics* 9 (1), 29. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16334459/

Siracusa, J., Charlot, K., Malgoyre, A., Conort, S., Tardo-Dino, P.-E., Bourrilhon, C., et al. (2019). Resting Muscle Shear Modulus Measured with Ultrasound

Shear-Wave Elastography as an Alternative Tool to Assess Muscle Fatigue in Humans. *Front. Physiol.* 10, 626. doi:10.3389/fphys.2019.00626

Škarabot, J., Brownstein, C. G., Casolo, A., Del Vecchio, A., and Ansdell, P. (2021). The Knowns and Unknowns of Neural Adaptations to Resistance Training. *Eur. J. Appl. Physiol.* 121 (3), 675–685. doi:10.1007/s00421-020-04567-3

Souron, R., Nosaka, K., and Jubeau, M. (2018). Changes in central and Peripheral Neuromuscular Fatigue Indices after Concentric versus Eccentric Contractions of the Knee Extensors. *Eur. J. Appl. Physiol.* 118 (4), 805–816. doi:10.1007/s00421-018-3816-0

Verges, S., Maffiuletti, N. A., Kerherve, H., Decorte, N., Wuyam, B., and Millet, G. Y. (2009). Comparison of Electrical and Magnetic Stimulations to Assess Quadriceps Muscle Function. *J. Appl. Physiol. (1985)* 106 (2), 701–710. doi:10.1152/japplphysiol.01051.2007

Warren, G. L., Lowe, D. A., and Armstrong, R. B. (1999). Measurement Tools Used in the Study of Eccentric Contraction???Induced Injury. *Sports Med.* 27 (1), 43–59. doi:10.2165/00007256-199927010-00004

Whitehead, N. P., Weerakkody, N. S., Gregory, J. E., Morgan, D. L., and Proske, U. (2001). Changes in Passive Tension of Muscle in Humans and Animals after Eccentric Exercise. *J. Physiol.* 533 (Pt 2), 593–604. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0593a.x

Xu, J., Fu, S. N., Zhou, D., Huang, C., and Hug, F. (2019). Relationship between Pre-exercise Muscle Stiffness and Muscle Damage Induced by Eccentric Exercise. *Eur. J. Sport Sci.* 19 (4), 508–516. doi:10.1080/17461391.2018.1535625

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Chalchat, Siracusa, Bourrilhon, Charlot, Martin and Garcia-Vicencio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

E. Annexe 7 : Étude 3c

Contractile properties are less affected at long than short muscle length after eccentric exercise. **Chalchat E,** Siracusa J, Bourrilhon C, Charlot K, Gennisson J-L, Garcia-Vicencio S, Martin V. Soumis dans l'*European Journal of Applied Physiology* le 21/03/2022.

Contractile properties are less affected at long than short muscle length after eccentric exercise

Emeric Chalchat[1,2], Julien Siracusa[1,3], Cyprien Bourrilhon[1,3], Keyne Charlot[1,3], Jean-Luc Gennisson[4], Sebastian Garcia-Vicencio[1,3,5*], and Vincent Martin[2,6*].

[1] Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Unité de Physiologie des Exercices et Activités en Conditions Extrêmes, Département Environnements Opérationnels, 91223 Bretigny-Sur-Orge, France

[2] AME2P, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

[3] LBEPS, Univ Evry, IRBA, Université Paris Saclay, 91025 Evry, France

[4] BIOMAPS, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale Multimodale, Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm, Orsay, France

[5] Human Motion Analysis, Humanfab, Aix-en-Provence, France

[6] Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

[*]These authors have contributed equally to this work and share last authorship.

Corresponding author:

Emeric Chalchat

emchalchat@gmail.com

Running title: Contractile properties alterations are muscle length-dependent after EIMD.

Abstract

Purpose: The aim of the present study was to investigate whether the electrically-evoked muscle responses are differently affected over time by the knee joint angle after an exercise-induced muscle damage (EIMD). We hypothesized that low-frequency evoked responses would be less affected at long than short muscle length, and that mechanisms located within the muscle and tendinous tissues would be involved.

Methods: Fifteen males performed 45-min loaded downhill walking (DW) exercise. Maximal voluntary contraction torque (MVC), optimal angle for torque production, voluntary activation level (VAL), twitch, doublet at 10 and 100 Hz (Db10 and Db100, respectively), rate of torque development (RTD), post-activation potentiation (PAP), muscle shear elastic modulus (μ) and aponeurosis stiffness were assessed before, after, and 4, 24, 48, 72 and 168h after the exercise at a knee angle of 40°, 90° and 120° (0°: full extension).

Results: MVC, VAL and Db100 were similarly decreased across joint angles after the DW and optimal angle was not affected. Twitch, Db10, Db10/Db100, PAP and RTD were less affected and muscle μ more increased at long than short muscle lengths ($p < 0.05$), especially during the first 24 h after the DW exercise.

Conclusion: Low-frequency evoked responses were more preserved at long than short muscle length the first 24 h after the DW exercise, suggesting that joint angle should be taken into account to assess muscular alterations after EIMD. This length dependence seems to be associated to the higher sensitivity to Ca^{2+} and the higher increase in muscle stiffness at long than short muscle length.

Keywords: exercise-induced muscle damage, muscle-tendon stiffness, shear-wave elastography, ultrafast ultrasound imaging, low-frequency fatigue, downhill walking

Abbreviations

Calcium: Ca^{2+}

Db10: doublet at 10 Hz

Db100: doublet at 100 Hz

Db10/db100: low frequency fatigue

DW: downhill walking

E-C coupling: excitation-contraction coupling

EIMD: exercise-induced muscle damage

KE: knee extensors

MVC: maximal voluntary contraction

NM: neuromuscular

PAP: post-activation potentiation

RF: *rectus femoris*

ROI: region of interest

RTD: rate of torque development

TTL: transistor-transistor logic

Twitch: mechanical response to a single stimulation

Tw: non-potentiated twitch

Tw_p: potentiated twitch

μ: shear elastic modulus

VAL: voluntary activation level

VL: *vastus lateralis*

Introduction

Performing unaccustomed, prolonged and/or very vigorous exercise may result in muscle damage, usually called exercise-induced muscle damage (EIMD). This results in a disruption of structural proteins in muscle fibers and/or connective tissues, that is characterized by a long-lasting deficit (>24 h) of force-generating capacity (*i.e.*, maximal voluntary contraction torque) (Paulsen et al. 2012; Warren et al. 1999). This exercise-induced alteration in the neuromuscular (NM) system function results from (1) central factors involving the central nervous system and neural pathways and/or (2) peripheral factors occurring within the muscle, beyond the NM junction (Enoka and Stuart 1992). The NM changes are mainly evaluated by artificial stimulation of the motor nerve trunk (Millet et al. 2011). Changes in central drive are generally assessed by the interpolated twitch technique (Merton 1954) whereas peripheral changes are generally measured by the mechanical responses to single or multiple stimulations evoked on the resting muscle (Millet et al. 2011). The mechanical response to a single stimulation (*i.e.*, twitch) is commonly interpreted as reflecting the muscle contractile properties whereas the ratio between double stimulation responses at 10 and 100 Hz (Db10/Db100) is usually considered a valid measure of the excitation-contraction (E-C) coupling (Verges et al. 2009). The rate of torque development (RTD) may also be measured during evoked contractions to evaluate the ability of the NM system to rapidly produce torque. These parameters are usually measured at a specific muscle length (Warren et al. 1999), because they are modified by muscle length/joint angle (Rassier et al. 1999). This length-dependency of evoked responses is accounted for by the number of cross-bridges formed between actin and myosin (myofilament overlap), the calcium (Ca^{2+}) sensitivity of myofilaments due to changes in intermyofilament spacing, the muscle lever arm and the passive torque of the muscle-tendon unit due to muscle and tendinous-tissue passive stiffness (Rassier et al. 1999; MacIntosh 2017).

Skeletal muscle has also several properties that change as result of prior activation (*i.e.*, history-dependent properties) such as fatigue, potentiation or prior stretching or lengthening. Indeed, after EIMD, this length-dependency may be modified. First, it has been demonstrated that the optimal angle for torque production is shifted towards longer length because of a change in myofilament overlap consecutive to EIMD (Brockett et al. 2001; Morgan and Allen 1999). This rightward shift of the force-length relationship results in a larger decrease in maximal voluntary contraction (MVC) torque at short compared to long muscle length (Philippou et al. 2003; Child et al. 1998; Saxton and Donnelly 1996). The prevalence of central (*i.e.*, neural) alterations (Byrne et al. 2001; Prasartwuth et al. 2006; Skurvydas et al. 2010) at short compared to long muscle length may be a contributing factor. Peripheral factors may also modify this length-dependency. Indeed,

Prasartwuth et al. (2006) observed that the twitch torque-angle curve tended to plateau at long muscle lengths the hours and days after an eccentric exercise of the elbow flexors, but did not identify the underlying mechanisms.

Two factors may account for this phenomenon: (i) Ca^{2+} homeostasis and (ii) the mechanical properties of the muscle-tendon unit. Calcium release is reduced after EIMD (Balnave and Allen 1996), but this detrimental effect may be compensated by the increased Ca^{2+} sensitivity at long muscle length (Balnave and Allen 1996) and the increased resting intracellular [Ca^{2+}]. As low-frequency responses (twitch, low-frequency doublet) are known to be more sensitive to (i) Ca^{2+} release and sensitivity changes (Edwards et al. 1977) and (ii) the length-dependence of Ca^{2+} sensitivity (Roszek et al. 1994) than high-frequency responses (high-frequency doublet), they may be more preserved at long muscle length. This may also result in a reduced amount of low-frequency fatigue at long muscle length (Skurvydas et al. 2010). In addition, this could affect the amount of post-activation potentiation (PAP) across muscle lengths. Yet, direct evidence is currently lacking to support these hypotheses.

The mechanical properties of the muscle-tendon unit could be modified after EIMD since it has been demonstrated that muscle-tendon stiffness increased the days after eccentric contractions (Howell et al. 1993). Within the first hours after exercise, this seems accounted for by Ca^{2+} homeostasis disturbance due to sarcolemma disruption (Proske and Morgan 2001), leading to increased resting intracellular [Ca^{2+}] and contracture clots (Whitehead et al. 2001). In the days following EIMD, the development of edema could also increase intra-muscular pressure, modify muscle architecture (*e.g.*, pennation angle, muscle thickness) (Yu et al. 2015) and disturb muscle contractile mechanics (*e.g.*, musculo-tendinous shortening) (Ishikawa et al. 2006). This would result in increased muscle stiffness, both in the passive and active state. Edema can also exert strain on the perimysium and epimysium connective tissues, thereby leading to increased tendinous-tissue stiffness (Whitehead et al. 2001; Proske and Morgan 2001). The relative contribution of the muscle and tendinous tissues to the increased passive torque may vary over time and as a function of muscle length after EIMD. However, our knowledge on these aspects is currently limited. At the muscle level, Lacourpaille et al. (2014) reported a transient increase of muscle shear elastic modulus (*i.e.*, an index of muscle stiffness) at short muscle length 1 h after EIMD, but no difference from baseline at 2 and 21 days. At long muscle length, they reported a greater and longer (up to 21 days) increase of muscle shear elastic modulus. To what extent the tendinous tissue mechanical properties (*e.g.*, stiffness) vary over time and as a function of muscle length is currently unknown. In terms of active torque production, the changes occurring at the muscle and tendinous tissue level could affect

contractile properties. As low-frequency evoked responses (twitch, low-frequency doublet) are more sensitive to changes in musculo-tendinous mechanical properties than high frequency responses (high-frequency doublet), they may be "artificially" more preserved at long muscle length after EIMD (Maffiuletti et al. 2016). Therefore, the assessment of NM alterations after EIMD could be influenced by the joint angle (*i.e.*, muscle-tendon unit length), especially for low-frequency responses.

The aim of the present study was to (1) investigate whether the electrically-evoked muscle responses (*i.e.*, Db10, Db100, Db10/Db100, RTD) are differently affected over time by the knee joint angle after an EIMD, and (2) identify the associated underlying factors within the muscle-tendon unit. We hypothesized (i) that low-frequency evoked responses would be less affected at long than short muscle length after EIMD, and (ii) that mechanisms located within the muscle and tendinous tissues would be involved, their relative contributions varying over time. To verify this hypothesis, voluntary and evoked contractile properties of the knee extensors (KE) were measured at different knee angles (short, neutral and long muscle length) before, after and the hours/days following an exercise inducing EIMD. Shear-wave elastography and ultrafast ultrasound imaging were used to measure muscle and aponeurosis mechanical properties.

Materials and methods

Participants

Fifteen young males (age: 32.2 ± 5.8 years, body mass: 78.7 ± 11.5 kg, height: 1.80 ± 0.06 m, body mass index: 24.3 ± 2.4 $kg.m^{-2}$, and fat mass: 15.6 ± 5.6 %) were fully informed of the experimental procedures, gave their written informed consent and agreed to participate in this study. Participants performed regular activity (between 3 and 8 $h.week^{-1}$), had no recent history of muscular, joint, or bone disorders and did not take any medication that could affect NM responses. None of them experienced strenuous mountain trekking and/or downhill walking (DW) and none had been involved in a resistance-training program in the past 6 months. Participants were instructed not to perform unaccustomed activities and any interventions that may interfere with recovery such as massage, icing, nutritional supplementation and nonsteroidal anti-inflammatory drugs during the experimental period. Each participant realized an inclusion session, consisting of a complete medical examination, including the collection of anthropometric data and complete familiarization with the experimental NM and ultrafast ultrasound imaging procedures. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (Schuklenk 2001) and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Ile-de-France 8, France, registration number: 2019-A01210-57, SMILE).

Protocol

Participants performed 45-min of DW on a treadmill (pulsar 3p 4.0, HP cosmos, Warwickshire, UK) while carrying a load equivalent to 30 % of the body mass (carrying: a weighted vest: 10 % of the body mass; a backpack: 20 % of the body mass) (Figure 1). The treadmill gradient was set to -25 %, velocity to 4.5 km.h^{-1} and the participants were instructed to walk at their own preferred stride length and frequency. Five participants were not able to finish the walking bout and performed the exercise to exhaustion (30.2 ± 8.6 min). NM function (voluntary and evoked torque), muscle soreness, and muscle-tendon mechanical properties (muscle and aponeurosis stiffness) were assessed on the right limb before (PRE), within 1 h (POST), and the hours/days (4 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 168 h) after the DW.

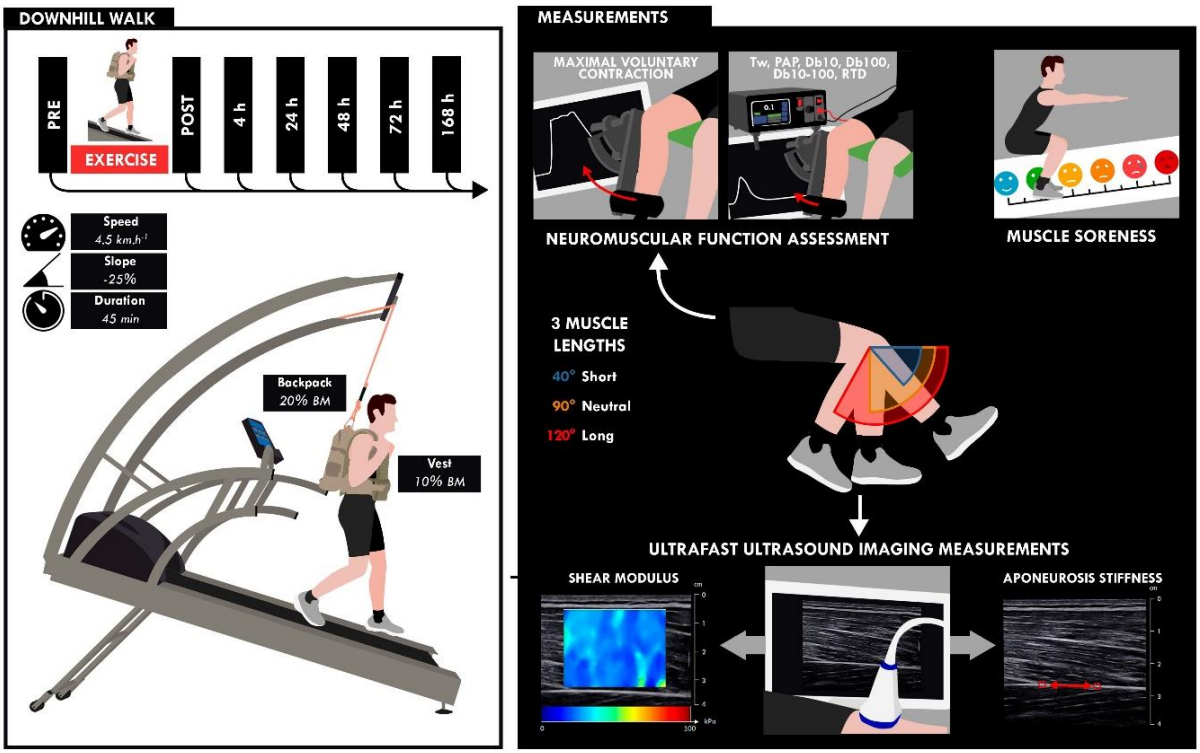


Figure 1. Design of the study. Participants performed a downhill walking on a treadmill for 45 min while carrying a load equivalent to 30 % of the body mass (treadmill gradient: -25 %; speed: 4.5 km.h^{-1}) (bottom left). Neuromuscular function assessments and muscle soreness (right) were evaluated at different time points as shown on the timeline (top left). Neuromuscular function assessments were performed at 40° (SHORT), 90° (NEUTRAL), and 120° (LONG) of knee angle (0° = knee fully extended). Tw: twitch, PAP: Post-activation potentiation, Db10: doublet at 10 Hz, Db100: Doublet at 100 Hz, Db10/Db100: Db10-to-Db100 ratio, RTD: rate of torque development.

Measurements

Muscle soreness

The magnitude of muscle soreness of the quadriceps was assessed as an indicator of muscle damage. Briefly, participants performed a squat over a 90° knee range of motion and quoted their sensation of pain using a visual analog scale, consisting of a 100-mm line representing "no pain" at one end (0 mm), and "very, very painful" at the other (100 mm).

Torque assessment

Voluntary and evoked torques were measured using an isokinetic dynamometer (Cybex Norm, Lumex, Ronkonkoma, NY, United States). Participants were comfortably positioned on an adjustable chair with hip joint flexed at 70° (0° = neutral supine position). The axis of rotation of the dynamometer was aligned with the femoral condyles of the femur and the lever arm was attached 1-2 cm above the malleolus with a Velcro strap. Torque data were corrected for gravity, digitized and exported at a rate of 2 kHz to an external analog-to-digital converter (Powerlab 16/35; ADInstruments, New South Wales, Australia) driven by the Labchart pro 8.1 software (ADInstruments, New South Wales, Australia).

Maximal voluntary contraction torque

All measurements were taken from the participant's right leg which was fixed at 40° (SHORT), 90° (NEUTRAL) or 120° (LONG) (0° = knee fully extended) in a randomized order between participants. During each MVC, the participants were instructed to grip the lateral handles of the seat in order to stabilize the pelvis and were strongly encouraged by the investigator to push as fast and hard as possible. Two MVC were performed at each angle with a rest of 2 min between each contraction. MVC torque was determined as the peak torque reached during the maximal effort and the higher value was used for further analyses.

Optimal angle for torque production

Optimal knee angle for maximal torque production, usually named "optimal angle", was determined during three consecutive concentric MVCs performed at $120°.s^{-1}$ from 20 to 120°. The knee angle for which the average torque of the three contractions reached its peak was considered as the optimal angle, as previous described by Brockett et al. (2001).

Electrically evoked torque

Single and double electrical stimulations were delivered at 10 and 100 Hz (Db10 and Db100, respectively) at rest before MVC (non-potentiated) and 3 s after the MVC (potentiated). Square-

wave pulses with a width of 1 ms at a maximal voltage of 400 V were delivered percutaneously to the femoral nerve using an electrical stimulator (Digitimer DS8R, Welwyn Garden City, United Kingdom) connected to a cathode (5 × 5 cm; Axelgaard manufacturing, Fallbrook, USA) placed over the femoral nerve in the femoral triangle and an anode (5 × 9 cm; Axelgaard manufacturing, Fallbrook, USA) placed on the gluteal fold. Intensity of stimulation ranged from 65 to 260 mA and corresponded to 130 % of the optimal intensity (*i.e.*, the intensity at which maximal non-potentiated single twitches started to plateau). Intensities were determined from single pulses delivered from 40 to 200 mA in 5-mA increments.

Contractile properties

Contractile properties of the KE muscles were assessed by determining the amplitude of the evoked responses (*i.e.*, peak torque) to single electrical stimulations delivered both in a non-potentiated (Tw) and potentiated (Tw_p) state to determine the amount of PAP (Tw_p /Tw). RTD was obtained from the Tw_p response as the slope of the torque-time curve between the onset of torque development (5 % of the peak Tw_p) and the peak torque.

Low frequency fatigue

Double electrical stimulations were also delivered at 10 and 100 Hz. The amplitudes of the evoked responses (Db10 and Db100) were measured to compute the Db10-to-Db100 ratio (Db10/Db100). This variable was used to assess changes in E-C coupling.

Voluntary activation level

The interpolated-twitch method (Merton 1954) was used to estimate the maximal KE voluntary activation level (VAL). Briefly, superimposed and potentiated Db100 were delivered during MVC after the torque had reached a plateau and 3 s after cessation of the contraction, respectively. The ratio of the amplitude of the superimposed torque over that of the potentiated Db100 evoked on the relaxed muscle (control doublet) was then calculated to obtain the VAL, as follows:

$$VAL = \left(\frac{1 - superimposed\ Db100}{potentiated\ Db100}\right) \times 100$$

Ultrafast ultrasound imaging measurements

An ultrafast ultrasound scanner (Aixplorer version 12.2; Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) driving a linear transducer array (SuperLinear 15-4; Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) and programmed with a research pack software was used (musculoskeletal

preset, penetration, no persistence) as previously proposed by Bercoff et al. (2004) (Figure 1). The B-mode ultrasound was first set to determine the optimal transducer location and maximize the alignment between the transducer and the direction of the vastus lateralis (VL) and rectus femoris (RF) muscle fascicles. Transducer alignment was considered correct when muscle fascicles and aponeurosis could be delineated across the image without interruption. The transducer was then fixed at 50 % of the total muscle length respectively using a dynamic probe fixation device (with 360° adjustments, USONO, Eindhoven, The Netherlands) placed over the skin, which was coated with a water-soluble transmission gel (Aquasonic, Parker laboratory, Fairfield, NJ, USA) to ensure acoustic coupling. This fixation allows to avoid any movement which could affect the position and the orientation of the probe, and avoid excessive pressure applied to the muscle. The position of the probe was marked on the skin using a permanent marker to ensure the same positioning along the experiment. We chose to investigate VL and RF muscles due to the difference anatomical properties (*e.g.*, mono- versus bi-articular muscles) (Jacobs and van Ingen Schenau 1992) and due to their differences in susceptibility to EIMD (Lacourpaille et al. 2017; Heales et al. 2018; Maeo et al. 2018).

Shear-wave elastography

A fixed-size rectangular region of interest (ROI), *i.e.*, the region in which shear-wave propagation was analyzed within the muscle, was placed in the middle of the B-mode image below the superficial aponeurosis within the VL and RF muscle belly. The position of the ROI was carefully located on the B-mode image during the familiarization session to be sure to keep the same ROI along the experiment. Five-second SWE sequences (frame rate: 1 to 2 Hz) were performed at rest for VL and RF muscles with the knee joint positioned at 40°, 90° and 120° (0° = knee fully extended). A two-dimensional real-time shear wave velocity (in m.s-1) color map with a spatial resolution of 1×1 mm was obtained, as previously described (Siracusa et al. 2019; Chalchat et al. 2020) (Figure 1). The shear wave velocity raw data was then transferred to a workstation, converted to shear elastic modulus (μ) and analyzed using a MATLAB script (MathWorks, Natick, MA, United States) developed in our laboratory. The μ was obtained as follows:

$$\mu = \rho . Vs^2$$

where ρ is the muscle density (1000 kg.m^{-3}) and Vs is the shear-wave velocity (in m.s^{-1}).

The μ values were averaged over the ROI (a ~36 x 114 matrix) without the empty (0 m.s^{-1}) and saturated (16.32 m.s^{-1}) values, and the average of 5-8 consecutive images reconstructed from

raw data (available for Aixplorer version 12.2 with research pack) was used for subsequent analyses.

Ultrafast imaging of intrinsic waves: Longitudinal aponeurosis displacement

Before each ultrafast acquisition, the ultrasound device sent a transistor-transistor logic (TTL) pulse to the electrical stimulator that generated another TTL signal when the electrical single stimulus was delivered at rest. The delay between these signals (~200 ms) was recorded and used to synchronize torque and ultrasound images data. From the radio-frequency signals recorded during the evoked contraction, 1,000 B-mode images were reconstructed during a 1-s period. All ultrafast ultrasound imaging measurements were transferred to a workstation and analyzed using a MATLAB script developed in our laboratory and by the manufacturer. The high frame rate (1,000 frame.s^{-1}) allowed us to track (a fixed proximal point) the deep aponeurosis displacement of RF and VL muscles along the longitudinal axis (*i.e*., longitudinal displacement) during the entire electrically-stimulated evoked contraction (Figure 1). Aponeurosis stiffness was quantified as the slope of the relationship between the evoked torque and aponeurosis displacement, obtain by linear regression (*i.e*. between 5 % of the peak Tw and the peak Tw).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed to assess the changes from PRE values and to compare the variations from PRE at each time point (POST, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 168 h) between joint angles. The data were screened for the normality of distribution and homogeneity of variances using the Shapiro–Wilk normality and Levene tests, respectively. One-way ANOVA was used to compare absolute PRE values between knee angles (40°, 90°, 120°). One-way ANOVA with repeated measures was used to assess the changes in optimal angle from PRE. When the normality and homogeneity assumptions were violated, a non-parametric Friedman analysis of variance was performed. Two-way repeated measures ANOVA (effect: time × angle) with repeated measures was performed on absolute values to assess the changes from PRE values for each time point. A two-way repeated measures ANOVA (effect: time × angle) with repeated measures was also performed on relative changes from PRE (*i.e*., PRE = 100 %) for all parameters to compare variations at each time point between joint angles.

Results with a p-value < 0.05 were considered significant. Statistical procedures were performed using GraphPad Prism (Version 8.4.3, GraphPad Software, CA, USA). The results presented are expressed as means ± SD.

Results

Muscle soreness

Muscle soreness was significantly increased from PRE (2 ± 7 mm) to POST (33 ± 22 mm; p = 0.002), 24 h (46 ± 22 mm; p < 0.001), 48 h (52 ± 29 mm; p < 0.001), and 72 h (36 ± 29 mm; p = 0.001). No significant difference was found between PRE and 4 h (18 ± 19 mm; p = 0.38) or 168 h (7 ± 19 mm; p = 0.99)

Neuromuscular properties

Absolute PRE values at 40°, 90° and 120° are displayed on Table 1. An angle effect was found for all parameters, except for VAL (Table 1).

Absolute PRE values	40° (SHORT)	90° (NEUTRAL)	120° (LONG)
MVC torque (Nm)	191.7 ± 49.9	311.9 ± 52.9***	220.2 ± 35.0$^{\$\$\$}$
Voluntary activation level (%)	96.0 ± 4.3	96.2 ± 3.7	96.8 ± 2.1
Tw_p (Nm)	42.3 ± 11.9	67.4 ± 15.1***	65.1 ± 12.8***
Db10 (Nm)	65.6 ± 17.7	107.0 ± 22.6***	103.9 ± 19.4***
Db100 (Nm)	69.6 ± 17.7	102.2 ± 19.2***	97.2 ± 16.5***
Db10/Db100	0.94 ± 0.13	1.05 ± 0.13*	1.07 ± 0.07**
Post-activation potentiation	1.69 ± 0.34	1.61 ± 0.16**	1.31 ± 0.09$^{\$\$\$}$
Rate of torque development ($Nm.s^{-1}$)	620 ± 215	1122 ± 277***	840 ± 164**$^{,\$\$\$}$
RF shear modulus (kPa)	4.6 ± 0.7	9.2 ± 2.6***	21.2 ± 7.3***$^{,\$\$\$}$
VL shear modulus (kPa)	4.5 ± 0.8	8.5 ± 2.3***	13.4 ± 4.0***$^{,\$\$\$}$
RF aponeurosis stiffness ($Nm.mm^{-1}$)	5.0 ± 1.7	14.1 ± 5.8***	15.3 ± 6.9***
VL aponeurosis stiffness ($Nm.mm^{-1}$)	7.3 ± 3.8	16.1 ± 6.3***	13.1 ± 3.9**

Table 1. Absolute PRE values of neuromuscular properties for 40° (SHORT), 90° (NEUTRAL), and 120° (LONG) of knee flexion (0° = knee fully extended). MVC: maximal voluntary contraction, Tw_p: Potentiated twitch Db10: doublet at 10 Hz, Db100: Doublet at 100 Hz, Db10/Db100: Db10-to-Db100 ratio, RF: rectus femoris, VL: vastus lateralis. Post-activation potentiation corresponds to the ratio between Tw_p and unpotentiated twitch (Tw_p /Tw). *, **, *** correspond to significant difference from 40°. $, $$, $$$ correspond to significant difference from 90°.

Maximal voluntary contraction torque

Significant interaction (time × angle) was found for absolute MVC torque (p = 0.004). MVC torque was significantly decreased up to 72 h after the DW exercise regardless of the joint angle (Figure 2). However, no significant joint angle (p = 0.554) or interaction (time × angle; p = 0.054) effects were found for the relative values.

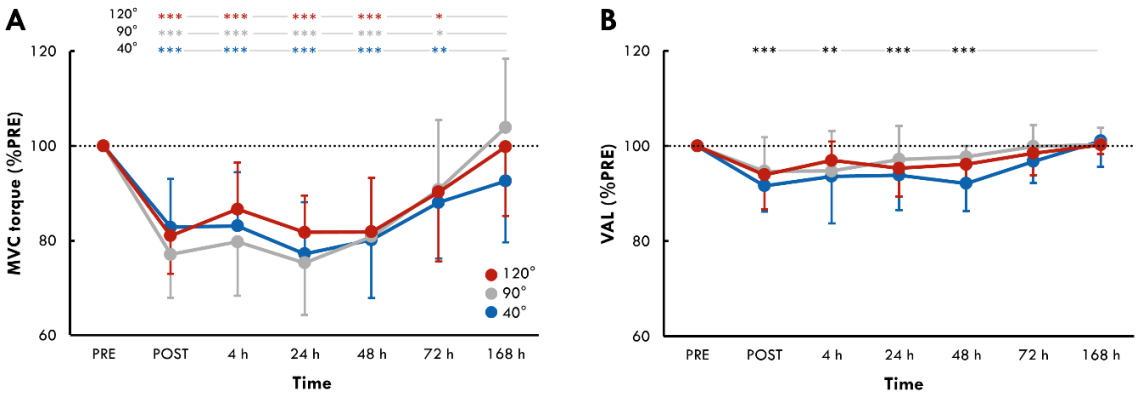


Figure 2. Time course of (A) maximal voluntary contraction (MVC) torque, and (B) voluntary activation level (VAL) before (PRE), immediately after (POST) and 4 h, 24 h, 48 h, 72 h and 168 h after the exercise for 40° (SHORT), 90° (NEUTRAL), and 120° (LONG) of knee flexion (0° = knee fully extended). *, ** and *** correspond to significant difference from PRE value at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Optimal angle

No significant effect of time ($p = 0.328$) was found for the optimal angle (Figure 3).

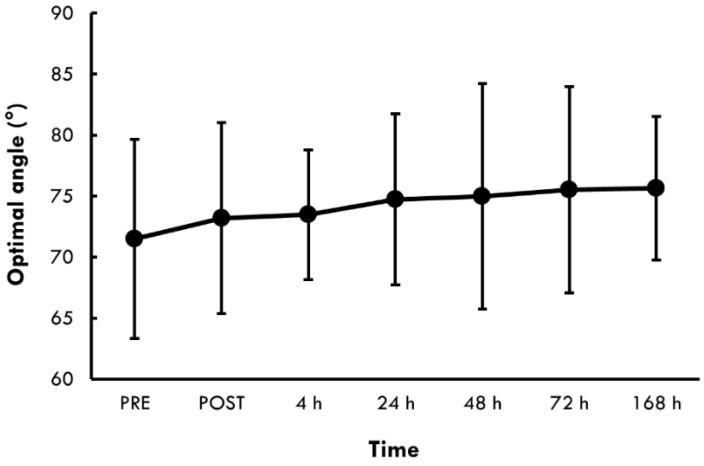


Figure 3. Time course of optimal angle before (PRE), immediately after (POST) and 4 h, 24 h, 48 h, 72 h and 168 h after the exercise (0° = knee fully extended).

Voluntary activation level

VAL was, on average, significantly decreased up to 48 h after the exercise (Figure 2). However, no significant effects of joint angle or interaction (time × angle) were found for absolute (angle: $p = 0.124$; interaction: $p = 0.515$) or relative (angle: $p = 0.217$; interaction: $p = 0.560$) values.

Twitch

No significant interaction (time × angle) was found for absolute ($p = 0.081$) or relative ($p = 0.621$) Tw_p values. However, an effect of time ($p < 0.001$) was observed on relative values: Tw_p

was, on average, significantly decreased up to 48 h after the exercise (Figure 4A). A significant angle effect ($p < 0.001$) was also found for relative values. Tw_p was, on average, less decreased at 120° than 90° and 40°, and less decreased at 90° than 40° (Figure 4A).

Post-activation potentiation (Tw_p/Tw)

Significant interactions (time × angle) were found for absolute ($p = 0.004$) and relative ($p = 0.006$) PAP values. The results showed that PAP was depressed up to 4 h at 40°, up to 72 h at 90° (except at 24 h), and up to 24 h at 120° (Figure 4B). Moreover, PAP was less depressed at 120° than 40° at POST and 4 h (Figure 4B). PAP was also less depressed at 90° than 40° at POST (Figure 4B).

Db10

Significant interactions (time × angle) were found for absolute ($p = 0.003$) and relative ($p = 0.003$) Db10 values. The results showed that Db10 was decreased up to 168 h at 40°, up to 48 h at 90°, and up to 24 h at 120° (Figure 4C). Db10 was less depressed at 120° than 90° from POST to 24 h. Similarly, Db10 was less depressed at 120° than 40° and at 90° than 40° at POST (Figure 4C).

Db100

No significant interaction (time × angle; $p = 0.192$) but a time effect ($p < 0.001$) was found for absolute Db100 values. Db100 was, on average, significantly decreased from POST to 48 h after the exercise (Figure 4D). For relative Db100, no significant effect of joint angle ($p = 0.075$) or interaction (time × angle; $p = 0.74$) was found.

Low frequency fatigue (Db10/Db100)

Significant interactions (time × angle) were found for absolute ($p = 0.012$) and relative ($p = 0.003$) Db10/Db100 values. The results showed that Db10/Db100 was decreased up to 168 h at 40° (except at 48 h), up to 48 h at 90°, and up to 24 h at 120° (Figure 4E). Moreover, Db10/Db100 was less decreased at 120° than 40° at POST, and less decreased at 120° than 90° at POST, 4 h and 48 h (Figure 4E).

Rate of torque development

Significant interactions (time × angle) were found for absolute ($p = 0.011$) and relative ($p = 0.006$) RTD values. The results showed that RTD was decreased up to 168 h at 40° (except at 72 h), up to 24 h at 90°, and no significant changes were found at 120° (Figure 4F). Moreover, RTD was less affected at 120° than 40° and 90° from POST to 24 h. Similarly, RTD was less depressed at 90° than 40° from POST to 4 h (Figure 4F).

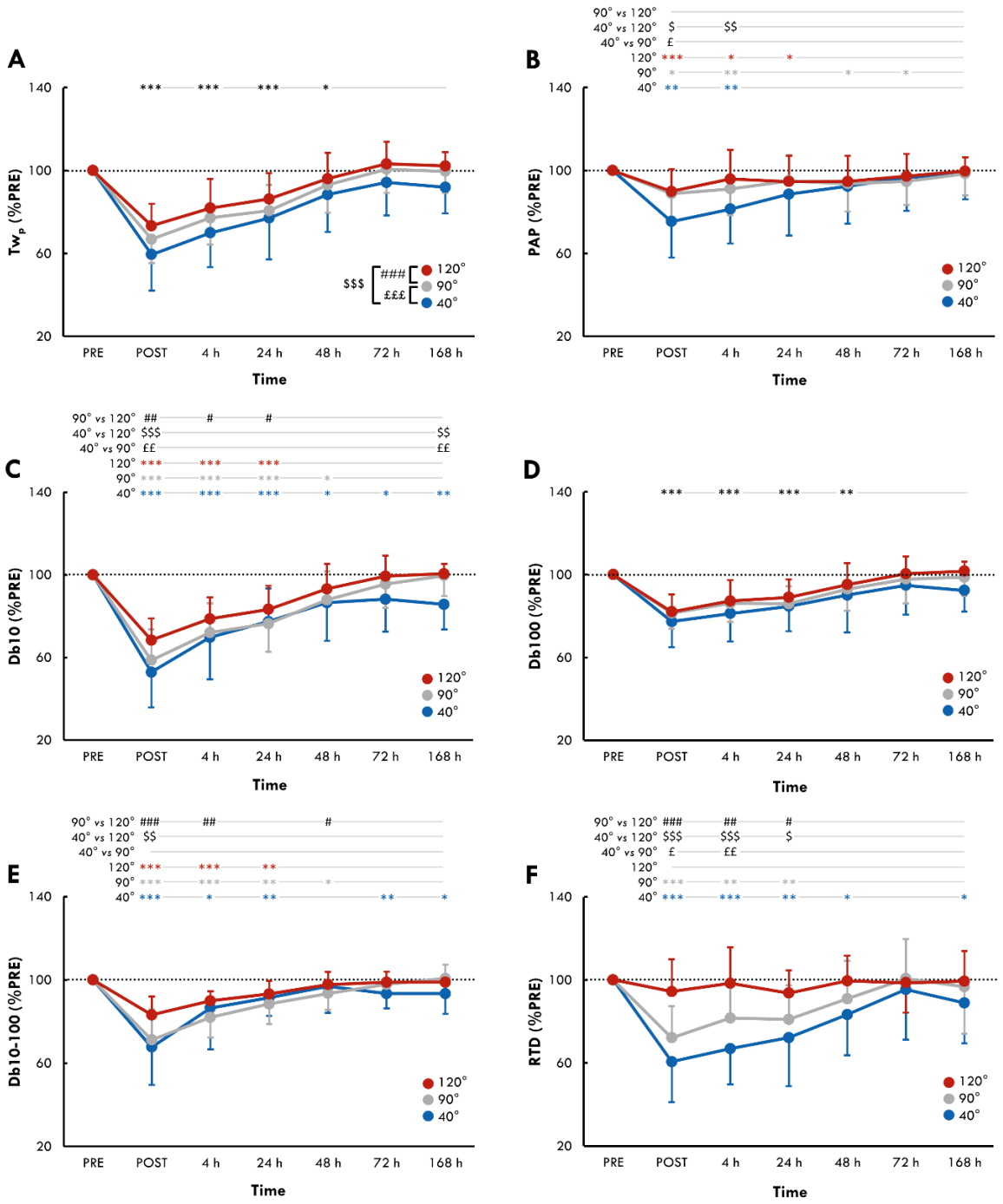


Figure 4. Time course of (A) potentiated twitch (Tw_p), (B), post-activation potentiation (PAP), (C) doublet at 10 Hz (Db10), (D) doublet at 100 Hz (Db100), (E) Db10Hz-to-Db100Hz ratio (Db10/Db100), and (F) rate of torque development (RTD) before (PRE), immediately after (POST) and 4 h, 24 h, 48 h, 72 h and 168 h after the exercise for 40° (SHORT), 90° (NEUTRAL), and 120° (LONG) of knee flexion (0° = knee fully extended). PAP correspond to the ratio between Tw_p and unpotentiated twitch (Tw_p /Tw). *, ** and *** correspond to significant difference from PRE value at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. £, ££ and £££ correspond to significant difference between 40° and 90° at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. $, $$ and $$$ correspond to significant difference between 40° and 120° at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. #, ##, and ### correspond to significant difference between 90° and 120° at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Muscle Shear elastic modulus

The two-way ANOVA for absolute RF μ values revealed an interaction (time × angle; $p < 0.001$). The results showed that RF μ was increased up to 168 h at 120°, up to 72 h for 90° (except at 48 h), only at 4 h for 40° (Figure 5A). RF μ was, on average, more increased at 120° than 40 and at 90° than 40° (Figure 5A). For VL μ, the two-way ANOVA revealed no significant interaction (time × angle) for absolute ($p = 0.353$) and relative ($p = 0.430$) values. However, a time effect ($p = 0.045$) was observed: VL μ was, on average, significantly increased up to 48 h after the exercise (Figure 5B). A significant angle effect ($p = 0.004$) was also found for relative values: VL μ was, on average, more increased at 120° than 90 and 40° (Figure 5B).

Aponeurosis stiffness

The two-way ANOVA for absolute RF aponeurosis stiffness revealed an interaction (time × angle; $p = 0.039$). The results showed that RF aponeurosis stiffness was decreased up to 4 h at 90° and 120°, but only at POST for 40° (Figure 5C). No significant joint angle ($p = 0.342$) or interaction (time × angle; $p = 0.200$) effects were found for the relative values. For VL aponeurosis stiffness, the two-way ANOVA revealed no significant interaction (time × angle) for absolute ($p = 0.188$) and relative ($p = 0.225$) values. However, time ($p < 0.001$) and angle effects ($p < 0.001$) were observed. VL aponeurosis stiffness was, on average, significantly decreased at POST, 4 h and 168 h after the exercise (Figure 5D). VL aponeurosis stiffness was, on average, lower at 40° than 90° and 120°, and lower at 90° than 120° (Figure 5D).

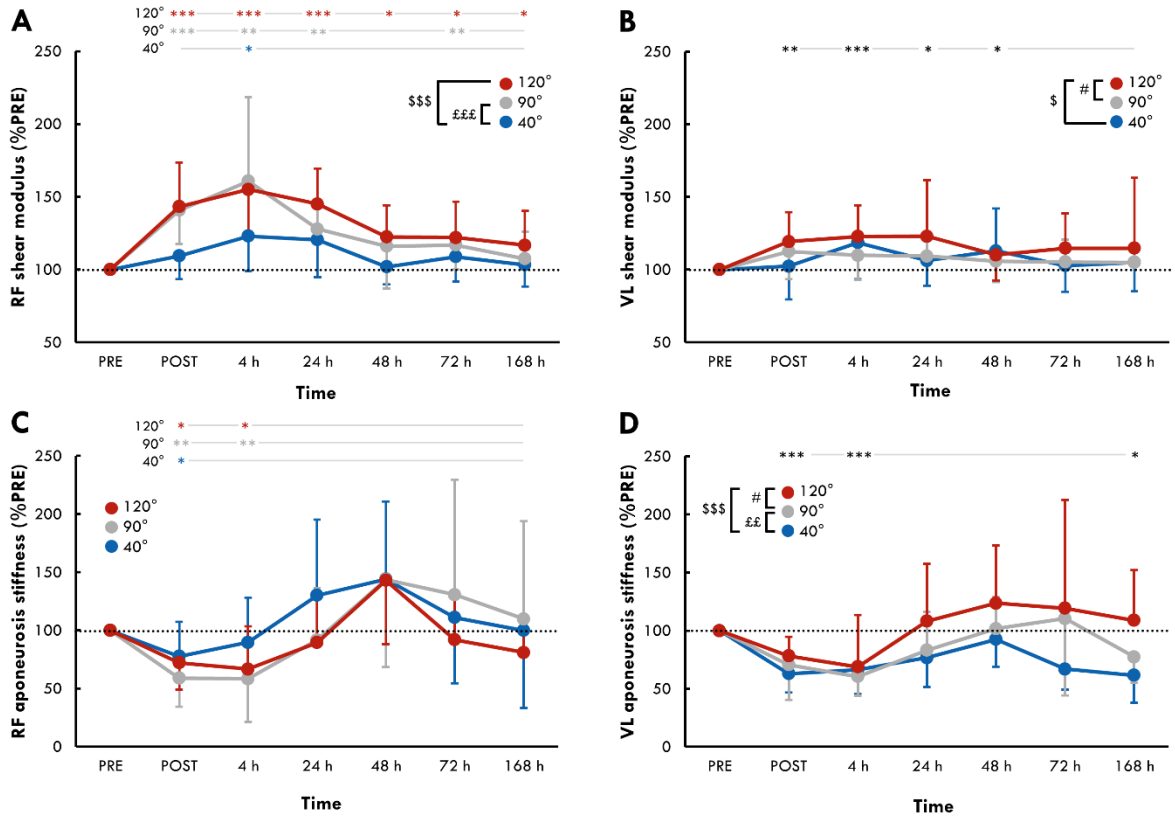


Figure 5. Time course of (A) rectus femoris (RF) and (B) vastus lateralis (VL) shear modulus, and (C) RF and (D) VL aponeurosis stiffness before (PRE), immediately after (POST) and 4 h, 24 h, 48 h, 72 h and 168 h after the exercise for 40° (SHORT), 90° (NEUTRAL), and 120° (LONG) of knee flexion (0° = knee fully extended). *, ** and *** correspond to significant difference from PRE value at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. £, ££ and £££ correspond to significant difference between 40° and 90° at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. $, $$ and $$$ correspond to significant difference between 40° and 120° at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. #, ##, and ### correspond to significant difference between 90° and 120° at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Discussion

This study was designed to investigate whether the electrically-evoked muscle responses were differently affected over time by the joint angle after an EIMD, and to identify the underlying factors within the muscle-tendon unit. Consistent with our hypothesis, we observed that low-frequency evoked responses (*i.e.*, twitch, Db10) were more preserved at long than short muscle length within the first 24 h after the DW exercise. Conversely, high-frequency evoked response (*i.e.*, Db100), MVC torque and VAL were not differently affected by the joint angle after the DW exercise. The angle-dependence of low-frequency evoked responses was not accounted for by the rightward shift of the force-length relationship since no significant optimal angle shift was found in

the present study. However, RTD and PAP were better preserved, and muscle stiffness more increased at long than short muscle length, suggesting that mechanisms related to force transmission and Ca^{2+} sensitivity, located within the muscle-tendon unit, could account for this length-dependency.

Length dependence of MVC torque and high-frequency evoked responses

In the present study, MVC torque was not differently affected by the joint angle after the DW exercise. This result is not consistent with previous studies (Philippou et al. 2003; Saxton and Donnelly 1996; Byrne et al. 2001) which showed a greater decrement of MVC torque at short compared to long muscle length immediately after and the days after EIMD. This force-length dependence has been attributed to a shift of the optimal angle to longer length after the EIMD (Proske and Morgan 2001). This shift has been ascribed to the presence of overstretched sarcomeres immediately after the exercise, and to the increase of the number of sarcomeres in series the days following the EIMD event (Proske and Morgan 2001). Contrary to the above-mentioned studies (Byrne et al. 2001; Philippou et al. 2003; Saxton and Donnelly 1996) which used mono-articular muscle actions, we did not found a shift of the optimal angle, explaining the lack of difference in force decrement between joint angles in the present study. The absence of shift in the optimal angle is consistent with other studies (Pincheira et al. 2018; Hoffman et al. 2016) in which the participants performed backward DW exercise. We suggest that this kind of exercise does not induce a large variation of muscle length, thereby limiting muscle strain and associated EIMD. This could account for the lack of optimal angle shift. Consistent with the lack of effect of joint angle on MVC, VAL was not differently affected by the joint angle in the present study. Finally, the fact that Db100 was not affected by joint angle confirms that the length-dependency only affected low-frequency evoked responses, which are particularly affected by Ca^{2+} sensitivity and the mechanical properties of the muscle-tendon unit. These two mechanisms may account for the relative preservation of low-frequency evoked responses at long muscle length after EIMD.

Length dependence of low-frequency evoked responses

Effect of Ca^{2+} sensitivity

When a muscle is stretched, actin and myosin filaments get closer and this proximity increases Ca^{2+} sensitivity (MacIntosh 2010). Therefore, any increase in muscle length could compensate for the decreased Ca^{2+} sensitivity induced by eccentric exercise (Allen et al. 2008). In the present study, we found that low-frequency evoked responses (*i.e.*, twitch and Db10) were more preserved at long compared to short muscle lengths after the DW exercise. This length-dependence

was not observed for the high-frequency response. As a consequence, the Db10/Db100 ratio was more preserved at long than short muscle length. These results are consistent with Skurvydas et al. (2010) who found that, after an eccentric exercise of the KE, the 20/100 Hz ratio decreased to a lower extent at long than short muscle length. As low-frequency responses are known to be more sensitive to changes in Ca^{2+} release and sensitivity (Edwards et al. 1977) and to the increased Ca^{2+} sensitivity at long muscle length (Roszek et al. 1994) than high-frequency responses, it could explain why low frequency fatigue was less pronounced at long muscle length. The evolution of RTD, known to be influenced by Ca^{2+} sensitivity (Maffiuletti et al. 2016), is also consistent with this hypothesis: the lower decrease in Ca^{2+} sensitivity at long than short muscle could partly explain why RTD was more preserved at long than short muscle length in the present study. Finally, PAP was also less affected after the DW exercise at long than short muscle lengths, confirming that the increase in muscle length could limit the alterations of Ca^{2+} sensitivity occurring after EIMD.

Effect of the mechanical properties of the muscle-tendon unit

We found that the resting muscle shear modulus (*i.e*., muscle stiffness) was more increased at long than short muscle length for both RF and VL muscles after the DW exercise. These differences could be related to (i) the increased resting intracellular [Ca^{2+}] that could lead to an increase of muscle stiffness by increasing the number of stable attached cross-bridges (Proske and Morgan 2001), and (ii) the higher Ca^{2+} sensitivity of myofilaments at long compared to short muscle length (Roszek et al. 1994). Moreover, the present results are in accordance with those of Lacourpaille et al. (2014; 2017) which showed a greater and longer increase of muscle shear modulus at long than short muscle length. This increased muscle stiffness may improve force transmission, and account for the relatively preserved RTD at long muscle length (Maffiuletti et al. 2016). The results of the present study also show that the length-dependence of muscle shear modulus was particularly obvious within the first 24 hours after the DW exercise, together with the length-dependent alteration of low-frequency responses. As edema is known to appear later than 24 h (*i.e*. 48-72 h) after the damaging exercise (Clarkson and Hubal 2002), we suggest that the observed length-dependence is due to mechanisms related to Ca^{2+} rather than to the strain exerted on the perimysium and epimysium connective tissues induced by edema (Whitehead et al. 2001; Proske and Morgan 2001).

The use of ultrafast ultrasound imaging allowed to characterize the properties of the aponeurosis during an evoked contraction (single twitch). This original approach revealed that aponeurosis stiffness was significantly decreased in both RF and VL muscles after the exercise in the first hours after the DW exercise, while no significant increase was observed from 24 to 168 h

post-exercise. The lack of significant increase of aponeurosis stiffness in the days following exercise rules out the hypothesis that tendinous-tissue stiffness increases with the strain induced by the edema on the perimysium and epimysium connective tissues (Whitehead et al. 2001; Proske and Morgan 2001). Moreover, aponeurosis stiffness seems merely influenced by the joint angle, particularly during the first 24 h following the DW exercise. As the length-dependence of low-frequency responses was obvious within the 24 h following the DW exercise, it seems unlikely that aponeurosis stiffness contributed to this difference between long and short muscle lengths. Moreover, as suggested by Maffiuletti et al. (2016), given the significant mass of muscle compared to conjunctive tissues in humans, we might speculate that the effect of muscle stiffness on RTD would be more significant than that of tendinous tissues. Therefore, it could explain why aponeurosis stiffness does not seem to affect RTD beyond 24 h after the DW exercise.

Methodological implications

The fact that the length-dependence of contractile properties alterations in response to DW exercise was particularly obvious for low-frequency (Twitch, Db10, Db10/Db100, RTD) but not high-frequency responses (*i.e.*, MVC and Db100), has important implications from a methodological point of view. Assessing NM changes after EIMD using mechanical responses evoked on the resting muscle could lead to different results, depending on the articular joint angle (*i.e.*, muscle length) evaluated.

Conclusion

Low-frequency evoked responses (*i.e.*, twitch, Db10, Db10/Db100, RTD) were more preserved at long than short muscle length after the DW exercise within the first 24 h after exercise. Conversely, MVC torque, VAL and high-frequency evoked response (*i.e.*, Db100) were not differently affected by the joint angle after the DW exercise, in accordance with the lack of optimal angle shift. As aponeurosis stiffness was similarly affected by EIMD during the first 24 h, the length dependence of low-frequency evoked responses seems to be associated to the higher sensitivity to Ca^{2+} and to the higher increase in muscle stiffness at long than short muscle length after the EIMD.

Acknowledgements

We would like to thank Benoît Lepetit, Stéphane Baugé, Phillippe Colin, Caroline Dussault, Stéphanie Bourdon, Marvin Subryan, Roxane Dubois, Alexandra Malgoyre, Pierre-Emmanuel Tardo-Dino, Walid Bouaziz, Olivier Nespoulous and the IRBA Biological Analyses Unit for their technical and medical support.

Author contribution

EC, JS, SGV and VM designed the study and drafted the manuscript. EC, JS, KC and SGV collected the data. EC, SGV, J-LG and VM participated to the data analysis. KC designed the figures. All the authors contributed to the interpretation of the data and the edition of the manuscript.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest. This work is known and agreed by the co-authors identified on the manuscript's title page.

REFERENCES

Allen DG, Lamb GD, Westerblad H (2008) Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. Physiological reviews 88 (1):287-332. doi:10.1152/physrev.00015.2007

Balnave CD, Allen DG (1996) The effect of muscle length on intracellular calcium and force in single fibres from mouse skeletal muscle. The Journal of physiology 492 (Pt 3) (Pt 3):705-713. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021339

Bercoff J, Tanter M, Fink M (2004) Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping. IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control 51 (4):396-409. doi:10.1109/tuffc.2004.1295425

Brockett CL, Morgan DL, Proske U (2001) Human hamstring muscles adapt to eccentric exercise by changing optimum length. Medicine and science in sports and exercise 33 (5):783-790

Byrne C, Eston RG, Edwards RH (2001) Characteristics of isometric and dynamic strength loss following eccentric exercise-induced muscle damage. Scandinavian journal of medicine & science in sports 11 (3):134-140

Chalchat E, Gennisson JL, Peñailillo L, Oger M, Malgoyre A, Charlot K, Bourrilhon C, Siracusa J, Garcia-Vicencio S (2020) Changes in the Viscoelastic Properties of the Vastus Lateralis Muscle With Fatigue. Frontiers in physiology 11:307. doi:10.3389/fphys.2020.00307

Child RB, Saxton JM, Donnelly AE (1998) Comparison of eccentric knee extensor muscle actions at two muscle lengths on indices of damage and angle-specific force production in humans. Journal of sports sciences 16 (4):301-308. doi:10.1080/02640419808559358

Clarkson PM, Hubal MJ (2002) Exercise-induced muscle damage in humans. American journal of physical medicine & rehabilitation 81 (11 Suppl):S52-69. doi:10.1097/01.PHM.0000029772.45258.43

Edwards RH, Hill DK, Jones DA, Merton PA (1977) Fatigue of long duration in human skeletal muscle after exercise. The Journal of physiology 272 (3):769-778. doi:10.1113/jphysiol.1977.sp012072

Enoka, Stuart DG (1992) Neurobiology of muscle fatigue. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985) 72 (5):1631-1648. doi:10.1152/jappl.1992.72.5.1631

Heales LJ, Badya R, Ziegenfuss B, Hug F, Coombes JS, van den Hoorn W, Tucker K, Coombes BK (2018) Shear-wave velocity of the patellar tendon and quadriceps muscle is increased immediately after maximal eccentric exercise. European journal of applied physiology 118 (8):1715-1724. doi:10.1007/s00421-018-3903-2

Hoffman BW, Cresswell AG, Carroll TJ, Lichtwark GA (2016) Protection from Muscle Damage in the Absence of Changes in Muscle Mechanical Behavior. Medicine and science in sports and exercise 48 (8):1495-1505. doi:10.1249/MSS.0000000000000920

Howell JN, Chleboun G, Conatser R (1993) Muscle stiffness, strength loss, swelling and soreness following exercise-induced injury in humans. The Journal of physiology 464:183-196. doi:10.1113/jphysiol.1993.sp019629

Ishikawa M, Dousset E, Avela J, Kyrolainen H, Kallio J, Linnamo V, Kuitunen S, Nicol C, Komi PV (2006) Changes in the soleus muscle architecture after exhausting stretch-shortening cycle exercise in humans. European journal of applied physiology 97 (3):298-306. doi:10.1007/s00421-006-0180-2

Jacobs R, van Ingen Schenau GJ (1992) Control of an external force in leg extensions in humans. The Journal of physiology 457:611-626. doi:10.1113/jphysiol.1992.sp019397

Lacourpaille L, Nordez A, Hug F, Couturier A, Dibie C, Guilhem G (2014) Time-course effect of exercise-induced muscle damage on localized muscle mechanical properties assessed using elastography. Acta physiologica 211 (1):135-146. doi:10.1111/apha.12272

Lacourpaille L, Nordez A, Hug F, Doguet V, Andrade R, Guilhem G (2017) Early detection of exercise-induced muscle damage using elastography. European journal of applied physiology 117 (10):2047-2056. doi:10.1007/s00421-017-3695-9

MacIntosh BR (2010) Cellular and whole muscle studies of activity dependent potentiation. Adv Exp Med Biol 682:315-342. doi:10.1007/978-1-4419-6366-6_18

MacIntosh BR (2017) Recent developments in understanding the length dependence of contractile response of skeletal muscle. European journal of applied physiology 117 (6):1059-1071. doi:10.1007/s00421-017-3591-3

Maeo S, Saito A, Otsuka S, Shan X, Kanehisa H, Kawakami Y (2018) Localization of muscle damage within the quadriceps femoris induced by different types of eccentric exercises. Scandinavian journal of medicine & science in sports 28 (1):95-106. doi:10.1111/sms.12880

Maffiuletti NA, Aagaard P, Blazevich AJ, Folland J, Tillin N, Duchateau J (2016) Rate of force development: physiological and methodological considerations. European journal of applied physiology 116 (6):1091-1116. doi:10.1007/s00421-016-3346-6

Merton PA (1954) Voluntary strength and fatigue. The Journal of physiology 123 (3):553-564. doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005070

Millet GY, Martin V, Martin A, Vergès S (2011) Electrical stimulation for testing neuromuscular function: from sport to pathology. European journal of applied physiology 111 (10):2489-2500. doi:10.1007/s00421-011-1996-y

Morgan DL, Allen DG (1999) Early events in stretch-induced muscle damage. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985) 87 (6):2007-2015. doi:10.1152/jappl.1999.87.6.2007

Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM (2012) Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? Exercise immunology review 18:42-97

Philippou A, Maridaki M, Bogdanis GC (2003) Angle-specific impairment of elbow flexors strength after isometric exercise at long muscle length. Journal of sports sciences 21 (10):859-865. doi:10.1080/0264041031000140356

Pincheira PA, Hoffman BW, Cresswell AG, Carroll TJ, Brown NAT, Lichtwark GA (2018) The repeated bout effect can occur without mechanical and neuromuscular changes after a bout of eccentric exercise. Scandinavian journal of medicine & science in sports 28 (10):2123-2134. doi:10.1111/sms.13222

Prasartwuth O, Allen TJ, Butler JE, Gandevia SC, Taylor JL (2006) Length-dependent changes in voluntary activation, maximum voluntary torque and twitch responses after eccentric damage in humans. The Journal of physiology 571 (Pt 1):243-252. doi:10.1113/jphysiol.2005.101600

Proske U, Morgan DL (2001) Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. The Journal of physiology 537 (Pt 2):333-345. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.00333.x

Rassier DE, MacIntosh BR, Herzog W (1999) Length dependence of active force production in skeletal muscle. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985) 86 (5):1445-1457. doi:10.1152/jappl.1999.86.5.1445

Roszek B, Baan GC, Huijing PA (1994) Decreasing stimulation frequency-dependent length-force characteristics of rat muscle. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985) 77 (5):2115-2124. doi:10.1152/jappl.1994.77.5.2115

Saxton JM, Donnelly AE (1996) Length-specific impairment of skeletal muscle contractile function after eccentric muscle actions in man. Clin Sci (Lond) 90 (2):119-125. doi:10.1042/cs0900119

Schuklenk U (2001) Helsinki Declaration revisions. Issues Med Ethics 9 (1):29

Siracusa J, Charlot K, Malgoyre A, Conort S, Tardo-Dino PE, Bourrilhon C, Garcia-Vicencio S (2019) Resting Muscle Shear Modulus Measured With Ultrasound Shear-Wave Elastography as an Alternative Tool to Assess Muscle Fatigue in Humans. Frontiers in physiology 10:626. doi:10.3389/fphys.2019.00626

Skurvydas A, Brazaitis M, Kamandulis S, Sipaviciene S (2010) Peripheral and central fatigue after muscle-damaging exercise is muscle length dependent and inversely related. Journal of electromyography and kinesiology : official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology 20 (4):655-660. doi:10.1016/j.jelekin.2010.02.009

Verges S, Maffiuletti NA, Kerherve H, Decorte N, Wuyam B, Millet GY (2009) Comparison of electrical and magnetic stimulations to assess quadriceps muscle function. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985) 106 (2):701-710. doi:10.1152/japplphysiol.01051.2007

Warren GL, Lowe DA, Armstrong RB (1999) Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. Sports medicine 27 (1):43-59. doi:10.2165/00007256-199927010-00004

Whitehead NP, Weerakkody NS, Gregory JE, Morgan DL, Proske U (2001) Changes in passive tension of muscle in humans and animals after eccentric exercise. The Journal of physiology 533 (Pt 2):593-604. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0593a.x

Yu JY, Jeong JG, Lee BH (2015) Evaluation of muscle damage using ultrasound imaging. J Phys Ther Sci 27 (2):531-534. doi:10.1589/jpts.27.531

MARQUEURS DE DOMMAGES MUSCULAIRES ET ADAPTATIONS A L'EXERCICE EXCENTRIQUE :
microARNs circulants et raideur musculaire mesurée par élastographie

Résumé : L'objectif principal de ce travail de thèse était d'évaluer l'intérêt de « nouveaux » marqueurs de dommages musculaires, à savoir les microARNs circulants et la raideur musculaire mesurée par élastographie. Avant d'évaluer l'intérêt de ces « nouveaux » marqueurs, ce travail de thèse s'est attelé à caractériser de manière quantitative la réponse des marqueurs de dommages musculaires les plus couramment utilisés par une revue systématique avec méta-analyses portant sur une quantité importante de données issues de la littérature. L'intérêt des « nouveaux » marqueurs a été évalué en réponse à deux modèles d'exercices : un modèle d'ultra-endurance (24 h de course à pied ; pour les microARNs circulants) et un modèle de marche en descente avec port de charge. L'exercice de marche en descente a été réalisé deux fois à deux semaines d'intervalle afin d'évaluer les réponses adaptatives conférées par le « repeated bout effect ». Si aucun des marqueurs couramment utilisés ne semble être en mesure de prédire parfaitement la réduction prolongée de la fonction neuromusculaire, certaines recommandations peuvent être données sur le(s) marqueur(s) à privilégier en fonction du moment où le diagnostic est effectué. De plus, les résultats de ce travail de thèse montrent que les miARNs circulants et la raideur musculaire mesurée par élastographie peuvent avoir un intérêt dans le diagnostic des dommages musculaires, d'autant plus lorsqu'ils sont combinés avec les marqueurs classiques. Par ailleurs, l'évaluation de la raideur musculaire mesurée par élastographie a permis de mettre en évidence des adaptations mécaniques qui semblent survenir en réponse à un exercice excentrique : les muscles deviendraient plus raides afin de se protéger contre des dommages musculaires ultérieurs. Ces travaux de thèse ont donc permis de mettre en évidence (1) l'intérêt de « nouveaux » marqueurs de dommages musculaires et (2) que l'augmentation de la raideur musculaire est impliquée dans les adaptations à l'exercice excentrique.
Mots-clés : marche en descente, myomiRs, fonction neuromusculaire, effet protecteur, échographie, créatine kinase, myoglobine, courbatures.

MARKERS OF MUSCLE DAMAGE AND ADAPTATIONS TO ECCENTRIC EXERCISE:
circulating microRNAs and muscle stiffness assessed by elastography

Abstract: The main aim of this thesis work was to evaluate the interest of "new" markers of muscle damage, *i.e.* circulating microRNAs and muscle stiffness measured by elastography. We also quantitatively characterized the response of the most commonly used markers of muscle damage by performing a systematic review with meta-analyses using a large data set from the literature. The interest of the "new" markers was evaluated in response to two exercise models: an ultra-endurance model (24-h run; circulating microRNAs) and a downhill walking exercise model. The downhill walking exercise was performed twice, two weeks apart, to assess the adaptive responses conferred by the repeated bout effect. If none of the commonly used markers seem to be able to perfectly predict prolonged reduction in neuromuscular function, some recommendations could be provided on what is (are) the best marker(s) of muscle damage as a function of the measurement timing. In addition, the results of this thesis work show that circulating miRNAs and muscle stiffness measured by elastography can be appropriate for the diagnosis of muscle damage, especially when combined with conventional markers. In addition, the evaluation of muscle stiffness measured by elastography showed that mechanical adaptations may occur in response to eccentric exercise: the muscles would become stiffer in order to protect themselves against subsequent muscle damage. This thesis work shows (1) the interest of "new" markers of muscle damage and (2) that increased muscle stiffness is involved in adaptations to eccentric exercise.
Keywords: downhill walking, myomiRs, neuromuscular function, repeated bout effect, ultrasound, creatine kinase, myoglobin, delayed-onset muscle soreness.