Testostérone plasmatique et risque cardiovasculaire chez les hommes après 65 ans

Véronique Soisson

▶ **To cite this version:**

Véronique Soisson. Testostérone plasmatique et risque cardiovasculaire chez les hommes après 65 ans. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T053 . tel-00974695

HAL Id: tel-00974695

https://theses.hal.science/tel-00974695

Submitted on 7 Apr 2014

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.

École doctorale 420 – Santé Publique
Université Paris-Sud 11

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque :
|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

Spécialité : épidémiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Véronique Soisson

Le 30 septembre 2013

TESTOSTÉRONE PLASMATIQUE ET RISQUE CARDIOVASCULAIRE CHEZ LES HOMMES APRÈS 65 ANS

Thèse dirigée par Pierre-Yves Scarabin

Membres du Jury :

Monsieur Jean Bouyer, Président

Monsieur Pierre-Yves Scarabin, Directeur de thèse

Madame Claire Bonithon, Rapporteur

Madame Catherine Deneux-Tharaux, Rapporteur

EQUIPE D'ACCUEIL

La thèse a été réalisée au sein de l'équipe Inserm « Hormones et Maladies Cardiovasculaires » du Centre de recherche en Épidémiologie et Santé des Populations (CESP), située l'Hôpital Paul Brousse (Villejuif) et dirigée par Pierre-Yves Scarabin.

Adresse :

Inserm UMR-S 1018 CESP équipe 08

16 avenue Paul Vaillant Couturier

94 807 Villejuif Cedex

FINANCEMENT

La thèse a été financée dans le cadre d'un contrat doctoral de l'Université Paris-Sud XI, attribué par la Présidence de l'Université.

SOMMAIRE

Équipe d'accueil 2
Financement 2
Sommaire 3
Résumé 6
Abstract 7
Production scientifique 8
Remerciements 9
Liste des tables 12
Liste des figures 14
Abréviations 15
I. Introduction **17**
I. 1. Etiopathogénie des maladies artérielles ischémiques 19
I. 2. Epidémiologie des maladies artérielles ischémiques 23
I. 2.1. Prévalence et incidence 23
I. 2.2. Facteurs de risque cardiovasculaire 24
I. 3. Androgènes et risque cardiovasculaire chez les hommes après 65 ans 26
I. 3.1. Physiologie des androgènes chez les hommes 26
I. 3.2. Physiopathologie du déficit androgénique lié à l'âge 29
I. 3.3. Testostérone et maladies cardiovasculaires 31
II. Objectifs **33**
III. Population et méthodes **35**
III. 1. Etude des Trois Cités 36
III. 1.1. Protocole de l'étude 36
III. 1.2. Recueil des données de base 37
III. 1.3. Mesures de l'athérome carotidien 38
III. 1.4. Définition et validation des évènements incidents 39
III. 1.4.a. Evènements coronaires 39
III. 1.4.b. Accidents vasculaires cérébraux 40
III. 1.5. Prise en compte des principaux facteurs de risque cardiovasculaire 40
III. 2. Etude cas-cohorte dans 3C 42
Sous-cohorte 43
Echantillonnage pour l'étude des maladies artérielles ischémiques 44
III. 3. Dosages des paramètres biologiques 46
III. 3.1. Hormones sexuelles endogènes 46
III. 3.1.a. Dosage de la testostérone 46

Principales méthodes utilisées : avantages et inconvénients 46
Validation du dosage de la testostérone 49
Testostérone biodisponible 50
Testostérone libre 51
III. 3.1.b. Dosages des autres hormones sexuelles 51
SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) 51
Albumine 52
Estradiol 52
III. 3.2. Paramètres biologiques conventionnels 52
III. 3.2.a. Lipides plasmatiques et glycémie 52
III. 3.2.b. Protéine C-réactive ultra-sensible (CRP) 53
III. 4. Analyse statistique des données 53
III. 4.1. Analyse descriptive 53
III. 4.2. Déterminants des hormones sexuelles 54
III. 4.3. Testostérone et athérome carotidien 55
III. 4.3.a. Epaisseur intima-média (EIM) 55
III. 4.3.b. Plaques d'athérome 55
III. 4.4. Testostérone et évènements cliniques 56
III. 4.4.a. Analyse de survie adaptée au schéma d'étude cas-cohorte 56
III. 4.4.b. Estimation des risques 59

IV. Résultats 61
IV. 1. Caractéristiques de la sous-cohorte 62
IV. 2. Déterminants des hormones sexuelles 67
IV. 2.1. Déterminants de la testostérone 68
IV. 2.2. Déterminants de la SHBG et de l'estradiol 72
IV. 3. Testostérone et athérome carotidien 76
IV. 3.1. Caractéristiques générales 76
IV. 3.2. Hormones sexuelles et marqueurs d'athérome carotidien 80
IV. 4. Testostérone et évènements artériels ischémiques 84
IV. 4.1. Evènements artériels ischémiques 84
IV. 4.2. Évènements coronaires 90
IV. 4.3. AVC ischémiques 92

V. Discussion 95
V. 1. Synthèse des principaux résultats 96
V. 2. Testostérone endogène et maladies cardiovasculaires : études antérieures . 97
V. 3. Interprétation des résultats 99
V. 3.1. Testostérone et athérosclérose 99
V. 3.2. Testostérone et facteurs de risque cardiovasculaire 101
V. 3.3. Testostérone et vieillissement 104
V. 4. Forces et limites 107
V. 4.1. Forces 107
V. 4.2. Limites 108

VI. Conclusion 111

Annexe 114

Articles 117

Références 131

Résumé 139

RESUME

Le déclin des hormones sexuelles avec l'âge a été mis en cause dans le développement de nombreuses maladies. Chez les hommes, la baisse de la testostérone circulante est un prédicteur de la mortalité toutes causes mais son impact sur le risque cardiovasculaire est incertain. A partir de l'étude de cohorte des Trois Cités (3C), réalisée en France dans la population générale, j'ai étudié le rôle de la testostérone plasmatique dans la survenue des évènements artériels ischémiques chez les hommes de plus de 65 ans.

J'ai montré, dans une première partie, que des taux diminués de testostérone étaient associés à des facteurs de risque cardiovasculaire. J'ai notamment confirmé le rôle central de la masse grasse et du diabète comme déterminants des androgènes. De plus, j'ai mis en évidence une association inverse entre la testostérone et l'épaisseur intima-media (EIM) des artères carotidiennes. J'ai montré que cette relation dépendait du statut inflammatoire systémique avec des variations significatives de l'EIM observées uniquement chez les hommes ayant des niveaux élevés de protéine C-réactive. En revanche, aucune association significative n'a pu être détectée entre les androgènes et la présence de plaques d'athérome.

Dans une seconde partie, j'ai mis en évidence une relation originale en forme de J entre la testostérone et le risque de maladies artérielles ischémiques. Les hommes ayant des taux élevés ou diminués de testostérone présentaient un risque accru d'évènements artériels et cette relation ne dépendait pas des principaux facteurs de risque cardiovasculaire. Des résultats similaires étaient observés pour les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux ischémiques.

Ces résultats suggèrent que des taux moyens de testostérone totale circulante (4-5 ng/mL) protègent des maladies artérielles ischémiques. Ce rôle modulateur des androgènes pourrait être lié à un processus de vieillissement précoce non spécifique.

Mots-clés : testostérone, athérosclérose, maladie cardiovasculaire, vieillissement, homme âgé, protéine C-réactive.

ABSTRACT

Plasma testosterone and cardiovascular risk in elderly men

The age-related decline in sex hormones has been involved in the development of many diseases. In men, low endogenous testosterone levels predict mortality due to all causes. However, the role of testosterone in the development of cardiovascular disease remains uncertain. In the french Three-City population-based cohort study, I assessed the association of plasma sex hormones with the incidence of ischemic arterial disease in men aged over 65 years.

First, I showed that low testosterone levels were associated with cardiovascular risk factors. I confirmed a leading role of obesity and diabetes as determinants of androgens. I also found an inverse association between testosterone and carotid intima-media thickness (IMT). I highlighted that, this relationship was mediated through systemic inflammation as significant changes in IMT were observed only in men with high C-reactive protein levels. However, no significant association was detected between androgens and the presence of carotid plaques.

Second, I found an original J-shaped association between testosterone and risk of ischemic arterial disease. Men with elevated or decreased testosterone levels had higher risk of arterial events and this association was independent of major cardiovascular risk factors. Similar results were observed for ischemic heart disease and ischemic stroke.

Overall, these results suggest that intermediate testosterone levels (4-5 ng/mL) could protect against cardiovascular events. Androgens could also be involved in general ageing process.

Keywords: Testosterone, atherosclerosis, C-reactive protein, elderly men.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Article 1

☒ Publié ou accepté définitivement ☐ en révision ☐ soumis ☐ en préparation

Low plasma testosterone and elevated carotid intima-media thickness: importance of low-grade inflammation in elderly men.

Auteurs: Soisson V, Brailly-Tabard S, Empana JP, Féart C, Ryan J, Bertrand M, Guiochon-Mantel A, Scarabin PY.

Revue: Atherosclerosis. 2012 Jul; 223(1):244-9

Article 2

☒ Publié ou accepté définitivement ☐ en révision ☐ soumis ☐ en préparation

A J-shaped association between plasma testosterone and risk of ischemic arterial event in elderly men: The French 3C cohort study.

Auteurs: Soisson V, Brailly-Tabard S, Helmer C, Rouaud O, Ancelin ML, Zerhouni C, Guiochon-Mantel A, Scarabin PY.

Revue: Maturitas. 2013 Jul;75(3):282-8

Article 3

☐ Publié ou accepté définitivement ☐ en révision ☐ soumis ☒ en préparation

Testosterone and mortality from all-causes and cardiovascular disease in elderly men.

Auteurs:

Revue:

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier par ces quelques lignes :

Pierres-Yves Scarabin, mon directeur de thèse. Aller jusqu'au bout du cursus universitaire était important, je vous remercie de m'en avoir offert l'opportunité. Je ne pouvais pas ne pas le citer : Molière a dit « le chemin est long du projet à la chose ». Grâce à votre engouement pour la recherche et votre enseignement de l'épidémiologie, ce chemin a été des plus enrichissant. Votre encadrement tout au long de ma thèse, votre patience et votre investissement ont été des plus efficaces pour la mener à bien. Je vous remercie chaleureusement de votre compréhension et de votre gentillesse aux moments les plus délicats. Finalement, tout ce parcours est précieux et je ne l'oublierai pas.

Jean Bouyer qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie sincèrement de votre confiance, de votre gentillesse et de votre bienveillance tout au long de ces trois années. Ma place de chargée des TD de biostatistiques va réellement me manquer.

Claire Bonithon-Kopp et Catherine Deneux-Tharaux, mes deux rapporteurs. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à mon travail, ainsi que de votre investissement.

Toute l'équipe 8. Travailler avec vous toutes a été très enrichissant autant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Merci pour tout ce partage épidémiologique, statistique et logistique. Au-delà des rires et des larmes, je vous remercie aussi pour votre écoute, pour les parties de tennis (mais certainement pas pour la course à pied !! Ah mais j'en oubliais presque nos heures de natation !), les moments « thé », le chargement de la drop (indispensable !!) et tous ces moments philosophiques dont vous seules avaient le secret. Tous ces moments m'ont permis de relativiser, de grandir je l'espère, de tenir le cap et surtout de rire. Françoise, Geneviève, Laure, Marianne, Valérie O, et Valérie Sc, je n'oublierai pas votre présence et votre soutien à un moment difficile… et vous en remercie sincèrement et chaleureusement.

Tous les doctorants, stagiaires, assistantes (un grand merci à Audrey Bourgeois pour son aide et sa disponibilité) et enseignants-chercheurs/ingénieurs que j'ai côtoyés. En particulier, Faroudy Boufassa. Partager les TDs avec toi a été très agréable. Je te remercie pour ton écoute, ta bonne humeur et ton soutien. J'aurai plaisir à retravailler avec toi … . Josiane Warszawski, je vous remercie pour votre confiance et votre écoute. Kévin, bon courage pour la fin… et surtout la suite. J'ai été contente de travailler avec toi et te remercie pour ton soutien. J'en oublie certainement, merci également à Laura S, Guillemette, Aisha, Bénédicte, Laura et Claire pour ces tous petits et trop rares moments partagés.

Enfin,

Ma famille et mes amis. Merci de m'avoir montré l'exemple, de m'avoir aidé, accompagné et supporté (dans tous les sens du terme) pendant ce marathon. Merci infiniment à mes petits lutins pour leur aide artistique et logistique. Je vous remercie du fond du cœur de faire partie de ma vie et de l'enrichir chaque jour: que vous soyez prêts (parisiens, versaillais (Chesnaysienne plutôt !), première couronne et proche banlieue) ou loin (oui mes chers azuréens! lyonnais, toulousains, auvergnats (c'était vraiment pour le caser…), grenoblois (plus vraiment d'actualité), et nancéens). Je vais avoir plus de temps maintenant pour venir vous rendre visite. À très vite, donc, pour de nouvelles aventures….

Ma famille. A vrai dire, aucun mot de mon vocabulaire ne suffirait, Merci d'être là... « *L'amour, on ne le discute pas, il est* » Antoine de Saint-Exupéry.

« Quand il n'y a plus rien à dire, peut-être est-ce l'heure de sourire » Patrick Ségal.

A ma mère,

A mon père,

LISTE DES TABLES

Tableau 1: Avantages et inconvénients des méthodes de dosage de la testostérone totale. 48

Tableau 2 : Poids appliqués pour l'estimation des risques à partir d'un modèle de Cox adapté au schéma d'étude cas-cohorte selon la méthode de Barlow. 59

Tableau 3: Caractéristiques générales des hommes de la cohorte 3C et des hommes inclus dans la sous-cohorte 63

Tableau 4: Moyennes[1] des hormones sexuelles selon le centre de recrutement 65

Tableau 5: Corrélation de Pearson entre les hormones sexuelles endogènes ajustée sur l'âge et le centre 66

Tableau 6: Moyennes des hormones sexuelles endogènes par type de maladies prévalentes dans la sous-cohorte 3C des hommes (n=472) 67

Tableau 7: Associations brutes entre les différentes formes de la testostérone et les caractéristiques générales des hommes de la sous-cohorte 3C (n=472). 69

Tableau 8: Associations brutes entre les différentes formes de la testostérone et les paramètres biologiques dans la sous-cohorte 3C (n=472 hommes). 70

Tableau 9: Analyses multivariées des déterminants des différentes fractions de testostérone 71

Tableau 10: Associations brutes entre la SHBG, l'estradiol et les caractéristiques générales des hommes de la sous-cohorte 3C (n=472). 73

Tableau 11: Associations brutes entre la SHBG, l'estradiol et les paramètres biologiques chez les hommes de la sous-cohorte 3C (n=472). 74

Tableau 12: Analyse multivariée des déterminants de la SHBG 75

Tableau 13: Analyse multivariée des déterminants de l'estradiol 76
Tableau 14: Caractéristiques des hommes de la sous-cohorte 3C avec des données carotidiennes selon la présence de plaques d'athérome. 78
Tableau 15: Coefficients de corrélation ajustés sur l'âge et le centre entre l'épaisseur intima-média, la CRP et d'autres paramètres 80
Tableau 16: Relation entre les hormones sexuelles et la présence de plaques d'athérome carotidien 81
Tableau 17 : Coefficient de régression linéaire de l'épaisseur intima-média en fonction des hormones sexuelles endogènes 82
Tableau 18: Caractéristiques initiales des hommes de la cohorte 3C ayant eu ou non un premier évènement artériel ischémique au cours des 4 ans de suivi. 85
Tableau 19: Caractéristiques principales des hommes de la cohorte 3C dans l'échantillon total (n=491) et par quintiles de testostérone. 86
Tableau 20: Risques relatifs de maladies artérielles ischémiques associés à chacune des formes de la testostérone 88
Tableau 21: Risques relatifs de maladies artérielles ischémiques associés à la SHBG et à l'estradiol 89
Tableau 22: Risques relatifs de maladies coronaires associés à chacune des formes de la testostérone. 91
Tableau 23: Risques relatifs de maladies coronaires associés à la SHBG et à l'estradiol. 92
Tableau 24: Risques relatifs d'AVC associés à chacune des formes de la testostérone 93
Tableau 25: Risques relatifs d'AVC associés à la SHBG et à l'estradiol 94
Tableau 26: Risques relatifs de mortalité toutes causes après 10 ans de suivi associés aux formes de testostérone circulante dans la sous-cohorte 3C des hommes 116

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Coupe transversale d'une artère[1] 19

Figure 2: Athérogénèse et maladies artérielles ischémiques[1] 22

Figure 3: Fractions de la testostérone plasmatique 28

Figure 4: Évolution de la testostérone sérique avec l'âge chez les hommes 30

Figure 5: Schémas d'étude à partir d'une cohorte 43

Figure 6 : Echantillonnage pour l'étude des maladies artérielles ischémiques 45

Figure 7: Graphique de Bland et Altman: concordance des méthodes RIA et GC-SM pour la mesure de testostérone 50

Figure 8: Distribution des hormones sexuelles endogènes 64

Figure 9: Distribution de l'épaisseur intima-média (N=354 hommes) 79

Figure 10: Moyennes géométriques et intervalle de confiance à 95% de l'épaisseur intima-média selon les niveaux de testostérone et de CRP, ajustées sur les facteurs de risque cardiovasculaire. 83

Figure 11: Schéma illustratif de l'hypothèse hypogonado-adipocytaire 103

[1] Dessin réalisé par Edwige Bourgaut

ABREVIATIONS

APO:	Apolipoprotéines
ATC :	Classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique
AVC:	Accident Vasculaire Cérébral
CBG :	Corticosteroid-Binding Globulin
CIM-10 :	Classification Internationale des Maladies (10ème édition)
CépiDC :	Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès
CRP :	Protéine C-réactive ultra-sensible
DALA :	Déficit androgénique lié à l'âge
DHEA :	Déhydroépiandrostérone
DHT :	Dihydrotestostérone
ECG :	ÉlectroCardioGramme
EIM:	Épaisseur Intima-Média
ET :	Écart-Type
Étude 3C :	Étude des Trois Cités
FSH :	Follicule-Stimulating Hormone
GC-MS:	Gas Chromatography-Mass Spectrometry, chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
GnRH :	Gonadotropin releasing hormone
HTA :	Hypertension artérielle
IC (95%) :	Intervalle de Confiance à 95%

IDM :	Infarctus Du Myocarde
IL6 :	Interleukine 6
IMC:	Indice de Masse Corporelle
IMT :	Intima-Media Thickness
InVS :	Institut de Veille Sanitaire
LC-MS :	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse
LDL-cholestérol:	Low Density Lipoprotein-cholesterol
LH:	Luteinizing Hormone
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
Q1-Q3 :	Intervalle interquartile
RIA :	Radio-ImmunoAssay, dosage radio-immunologique
SHBG :	Sex Hormone-Binding Globulin
StAR:	Steroidogenic Acute Regulatory protein
TNFα :	Tumor Necrosis Factor α, facteur de nécrose tumorale
TOAST:	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
WHR:	Waist/Hip Ratio

I. INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires représentent l'une des toutes premières causes de mortalité dans les pays industrialisés. Leur incidence est fortement liée à l'âge et le nombre d'évènements augmente considérablement après 65 ans. Chez les personnes âgées, l'expression clinique des maladies cardiovasculaires est très polymorphe et résulte d'un double processus dégénératif: 1- l'athérosclérose et ses complications artérielles ischémiques 2- le vieillissement général du cœur et des vaisseaux conduisant notamment à l'insuffisance cardiaque et aux troubles du rythme.

Les mécanismes du vieillissement cardiovasculaire (apoptose, diminution des capacités réplicatives, fibrose, …) restent mal connus et ont pour conséquences un remodelage de la paroi vasculaire avec diminution de l'élasticité artérielle ainsi qu'une hypertrophie ventriculaire gauche. L'athérosclérose, quant à elle, évolue également avec l'âge et peut accélérer le vieillissement artériel normal. Ses déterminants sont mieux connus et permettent aujourd'hui d'agir sur certains facteurs de risque cardiovasculaire et de prévenir efficacement les manifestations cliniques de l'athérothrombose. Cependant, d'autres biomarqueurs ont été associés au risque cardiovasculaire et pourraient être impliqués dans la survenue d'évènement en agissant directement ou indirectement sur les facteurs de risque connus.

Chez les hommes, le déclin avec l'âge des hormones sexuelles, en particulier de la testostérone, et leur lien établi avec certaines composantes du risque vasculaire suggèrent un rôle clé des hormones stéroïdiennes dans le développement de l'athérothrombose. La prise en compte de ce déclin hormonal pourrait améliorer la détection et la prise en charge du risque artériel au cours du vieillissement.

Dans ce chapitre introductif, nous décrirons la genèse de l'athérothrombose, puis les caractéristiques épidémiologiques des maladies artérielles ischémiques et leurs principaux facteurs de risque, notamment au cours du vieillissement. Puis, nous nous intéresserons à la physiologie de la testostérone et de sa relation avec les maladies cardiovasculaires.

I. 1. ETIOPATHOGENIE DES MALADIES ARTERIELLES ISCHEMIQUES

L'artère, assurant la circulation sanguine du cœur vers les tissus organiques, se compose de plusieurs tuniques concentriques : l'intima (en contact direct du sang et constitué d'un endothélium et d'une couche sous-endothéliale de tissu conjonctif), la média (constituée de fibres musculaires lisses entourées d'une matrice extracellulaire composée de collagène et d'élastine) et l'adventice (constituée d'un tissu conjonctif riche en fibres de collagènes et d'élastine). Les couches limitantes élastiques interne et externe séparent respectivement l'intima de la média et la média de l'adventice (Figure 1).

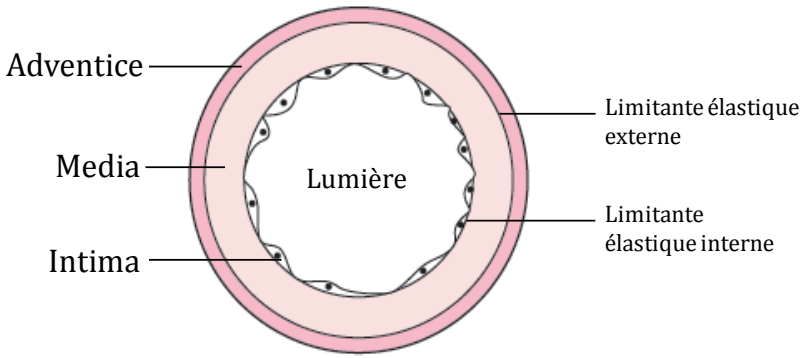


Figure 1: Coupe transversale d'une artère

Au cours du vieillissement, la structure artérielle se modifie : les artères s'agrandissent, s'épaississent et deviennent plus rigides. Différentes maladies peuvent également modifier cette structure, en particulier l'athérosclérose. La définition de l'athérosclérose selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est la suivante : « association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media » (1).

L'athérogénèse débute dès l'enfance et évolue progressivement en plusieurs phases comprenant la strie lipidique, la lésion fibro-lipidique (ou plaque athéromateuse simple) et la plaque compliquée (ou instable) (2).

Les lipides, dont le cholestérol, sont transportés dans le sang sous forme de macromolécules : les lipoprotéines. Elles sont formées d'un corps lipidique hydrophobe contenant principalement des triglycérides et des esters de cholestérol, enrobé d'une monocouche constituée de phospholipides et de cholestérol libre. A la surface des lipoprotéines, on trouve les apolipoprotéines (APO) qui assurent la stabilité de la macromolécule et son devenir métabolique. L'infiltration des lipoprotéines, en particulier de basse densité (Low Density Lipoprotein, LDL-cholestérol) dans l'intima entraîne un épaississement fibromusculaire se traduisant par des surélévations linéaires et parallèles réduisant légèrement la lumière artérielle. Lorsque les LDL stagnent, différents mécanismes enzymatiques et non enzymatiques peuvent entraîner leur oxydation. Les LDL oxydées entraînent une dysfonction de l'endothélium favorisant l'adhésion des monocytes qui pénètrent l'espace sous endothélial pour se transformer en macrophages. La réaction inflammatoire provoquée par l'infiltration des macrophages et la production de cytokines pro-inflammatoires dans la paroi artérielle contribuent à la croissance de la plaque d'athérome et à sa fragilisation (3). Lorsque les macrophages capturent excessivement les LDL oxydées, ils forment des cellules spumeuses. L'accumulation de ces cellules et de cellules musculaires lisses constitue les stries lipidiques. La strie lipidique est un processus précoce et réversible mais peut également évoluer vers la formation de la plaque d'athérome (4).

Le regroupement des lipides intra et extra-cellulaires libérés essentiellement lors de la dégénérescence des cellules spumeuses constitue un amas appelé centre athéromateux. Une chape fibromusculaire, composée de cellules musculaires lisses de la média et de protéines extracellulaires (collagène et élastine), se forme ensuite autour du centre lipidique. La chape fibreuse isole celui-ci de la lumière artérielle et stabilise l'ensemble ainsi créé : la plaque d'athérosclérose (simple) (5).

La formation de la plaque peut se poursuivre longitudinalement, puis sur toute la circonférence du vaisseau. L'augmentation de son volume vers la sténose se fait par la progression parallèle du centre athéromateux et de la chape fibreuse. Cette évolution se

fait lentement sur plusieurs années et reste longtemps asymptomatique grâce au remodelage vasculaire initial. La gravité de la maladie est souvent due aux plaques d'athérome responsables d'une sténose réduisant significativement la lumière artérielle. La combinaison des changements du volume de la plaque, du noyau lipidique et de phénomènes inflammatoires locaux peuvent dégrader la chape fibreuse transformant la plaque simple en plaque compliquée. La plaque instable peut alors être à l'origine d'évènements cliniques aigus, par l'intermédiaire d'un état inflammatoire propice à la fissure et aux thromboses (6).

La principale cause de thrombose artérielle aigüe est la rupture ou l'érosion de la plaque d'athérome pouvant perturber significativement ou non la lumière vasculaire. La rupture de l'endothélium au niveau de la chape fibreuse met les éléments thrombogènes du cœur lipidique en contact direct avec le sang circulant. Un thrombus se forme. On parle alors d'athérothrombose. Elle peut aboutir à une embolie avec oblitération des territoires d'aval, ou à une occlusion artérielle par un thrombus de volume important. Une autre conséquence est l'incorporation du thrombus à la plaque provoquant une augmentation du volume de la plaque et une aggravation de la sténose artérielle locale. La plaque peut se fragiliser et se fissurer à nouveau (7).

L'impact du processus thrombotique dépend de la composition initiale de la plaque d'athérome. Les plaques stables sont généralement composées d'une chape fibreuse épaisse. Un centre athéromateux important diminue en revanche la résistance physique de la plaque. L'obstruction de l'artère par le thrombus ou l'embolie participe aux premières manifestations cliniques graves (8).

Une réduction significative du débit sanguin au niveau des artères coronaires est responsable des angines de poitrine et lorsque l'occlusion artérielle par un caillot sanguin est totale et prolongée, un infarctus du myocarde peut survenir. L'obstruction d'une artère à visée encéphalique par un thrombus ou une embolie provoque un accident vasculaire cérébral ischémique. L'athérosclérose située au niveau des artères des membres inférieurs peut provoquer une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (5). Cette thèse se limite aux deux principales complications cliniques de l'athérosclérose : les accidents vasculaires cérébraux ischémiques (AVC) et les cardiopathies ischémiques.

La Figure 2 résume les différents stades de la formation de la plaque d'athérome, puis le processus d'athérothrombose jusqu'aux évènements artériels ischémiques (5) (2).

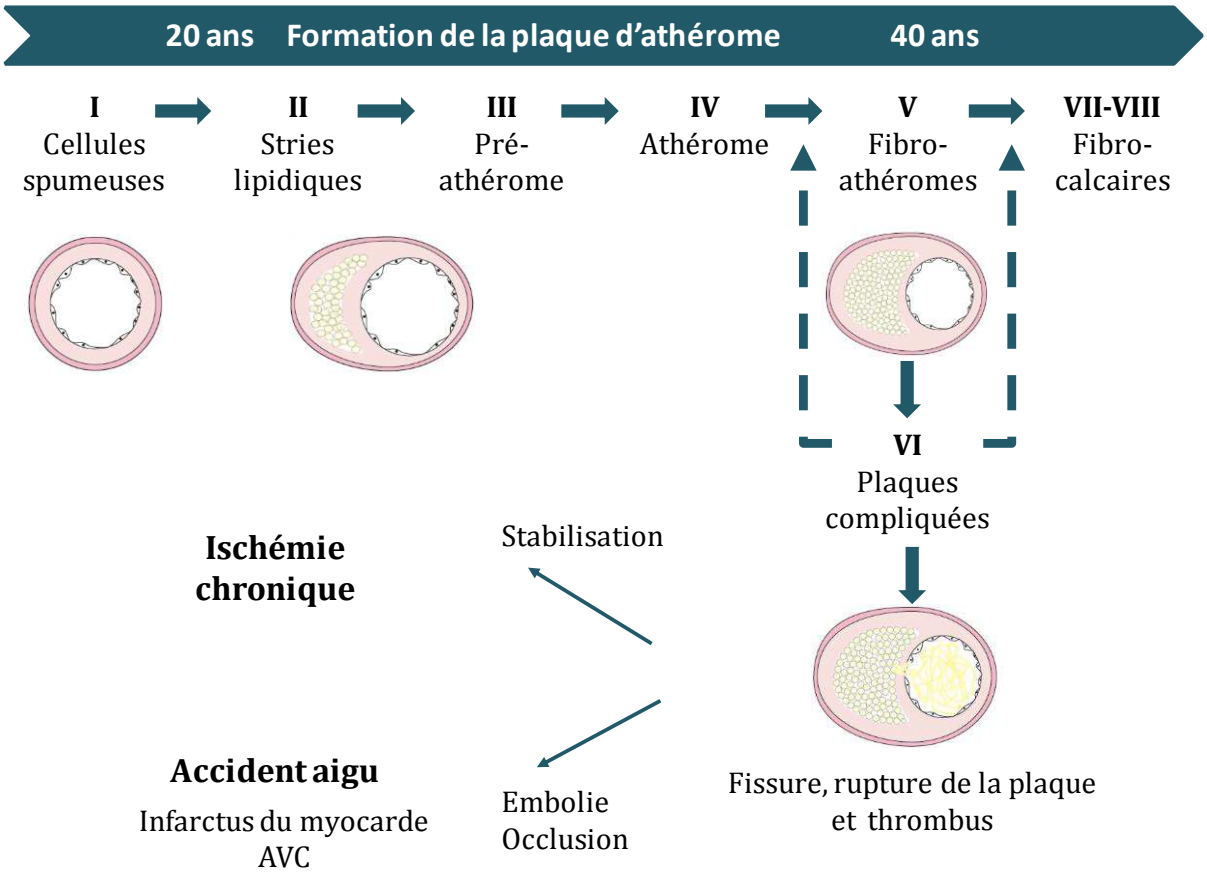


Figure 2: Athérogénèse et maladies artérielles ischémiques

I. 2. EPIDEMIOLOGIE DES MALADIES ARTERIELLES ISCHEMIQUES

I. 2.1. Prévalence et incidence

Première cause de mortalité dans le monde, selon l'OMS, les maladies cardiovasculaires représentent 30% de la mortalité totale soit 17.3 millions de décès par an. Les principales causes de décès d'origine cardiovasculaire sont les cardiopathies ischémiques (7.3 millions) et les accidents vasculaires cérébraux (6.2 millions) (données 2008 de l'OMS). Ces maladies sont plus fréquentes dans certains pays, notamment le Nord de l'Europe et les pays anglo-saxons, et font une apparition remarquée dans les pays en voie de développement. Leur incidence augmente fortement avec l'âge. Aux États-Unis, le National Heart, Lung and Blood Institute indique que les taux moyens annuels d'un 1er évènement cardiovasculaire chez les hommes sont de 3 pour 1000 dans la tranche des 35 à 44 ans et de 74 pour 1000 chez les hommes âgés de 85 à 94 ans (9).

En France, les maladies cardiovasculaires se situent au 2ème rang des causes de mortalité, dépassées par les cancers chez les hommes. Le centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (Inserm-CépiDC) a recensé en 2008 environ 275 000 décès masculins (10). Parmi ces décès masculins, environ 69 000 sont d'origine cardiovasculaire dont 21 800 décès sont dues aux cardiopathies ischémiques et 13 900 décès font suite à un AVC. La majorité des évènements cardiovasculaires survient au cours du vieillissement avec environ 80% des décès de cette origine parmi les hommes de plus de 65 ans.

La mortalité cardiovasculaire a diminué de moitié en l'espace de 20 ans, dans le monde, grâce à une meilleure prévention et prise en charge de la maladie. Les registres de l'étude Monica en France mettent en évidence une diminution de l'incidence des évènements coronaires entre les périodes 2000-2003 et 2004-2007, malgré d'importantes disparités géographiques. Pour les hommes de 35 à 74 ans, la baisse de

l'incidence de ces évènements est estimée globalement à -16%. Chaque année en France, on dénombre 100 000 nouveaux cas de cardiopathies ischémiques et 130 000 nouveaux cas d'AVC (rapport 2009 ministère de la santé (11)).

Après 65 ans, l'incidence des maladies cardiovasculaires augmente considérablement, avec toujours une prédominance chez les hommes des cardiopathies ischémiques. Chaque décennie, le risque de mortalité cardiovasculaire est multiplié par 2 ou 3. Plus de 15% des décès des plus de 65 ans dans le monde sont dus aux maladies cardiovasculaires (12). Dans la Framingham Heart Study, l'incidence des cardiopathies ischémiques chez les hommes passe de 24‰ dans la tranche d'âge 65-74 ans à 35‰ pour la tranche 85-94 ans (13). Les morts subites représentent 11% des évènements cardiovasculaires chez les hommes de 65 à 74 ans et 17% chez les hommes de plus de 75 ans.

La prévention des maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose joue un rôle important pour prolonger la qualité de vie et la santé des personnes âgées. Celle-ci est essentiellement ciblée sur les principaux facteurs de risque cardiovasculaire connus (traitements antihypertenseurs, activité physique…).

I. 2.2. Facteurs de risque cardiovasculaire

Un grand nombre de travaux incluant des études de cohorte ont été consacrés à l'étiologie des maladies cardiovasculaires et ont permis d'identifier de nombreux facteurs de risque. Bien qu'il existe des différences entre les hommes et les femmes, les plus importants facteurs sont l'âge avancé, les antécédents familiaux de maladie cardiovasculaire, l'hypertension artérielle, l'obésité, le diabète, l'hypercholestérolémie et la consommation de tabac.

La consommation de tabac a un effet toxique direct sur l'endothélium artériel. Elle multiplie le risque de maladie coronaire par 3, et par 2 à 7 le risque d'artériopathie des membres inférieurs. Alors que des niveaux élevés de LDL-cholestérol et de cholestérol total multiplient par 2 le risque cardiovasculaire, une augmentation du HDL-cholestérol de 1mg/L entraîne une diminution de 2% du risque coronarien. Le diabète est observé

dans 30% des angines de poitrine et multiplie le risque coronaire par 3. Les études épidémiologiques montrent également que l'hypertension artérielle est associée plus fortement à la survenue d'un accident vasculaire cérébral que d'un accident coronaire.

Les facteurs de risque cardiovasculaire reconnus chez les hommes au cours du vieillissement sont similaires à ceux observés avant 65 ans. Cependant, leur impact diminue avec l'âge (14) (15) et ils sont plus difficiles à identifier au cours du vieillissement (16). L'hypertension artérielle a une prévalence particulièrement élevée et concerne 3 personnes sur 4 de plus de 65 ans. Avec le vieillissement, les artères subissent diverses altérations structurelles et fonctionnelles se traduisant par une altération de la réactivité vasculaire. L'hypertension artérielle systolique isolée est la plus fréquente et s'accompagne souvent d'une diminution de la pression artérielle diastolique avec élévation de la pression pulsée.

Les principaux facteurs de risque cardiovasculaire ont été intégrés dans des équations permettant d'établir des scores individuels de probabilité absolue de développer une maladie cardiovasculaire. Le score de Framingham est le plus utilisé (17) et il est calculé avec un poids spécifique attribué à chacun des facteurs de risque. Cependant, ces équations de risque ont une validité limitée chez les sujets de plus de 65 ans (18). Cette difficulté à prédire les évènements cardiovasculaires au cours du vieillissement est due notamment à une sélection des individus « résistants » à certains facteurs de risque mais aussi à l'augmentation considérable des comorbidités observées chez les personnes âgées. De nouveaux biomarqueurs ont été identifiés dans des domaines clés du risque vasculaire tels que l'inflammation et l'hémostase. Cependant, l'addition de ces variables dans les modèles améliorent peu la qualité de prédiction des évènements cliniques (18). De nouvelles études permettant d'explorer d'autres pistes étiologiques sont donc essentielles pour améliorer la stratification du risque cardiovasculaire notamment chez les hommes après 65 ans.

I. 3. ANDROGENES ET RISQUE CARDIOVASCULAIRE CHEZ LES HOMMES APRES 65 ANS

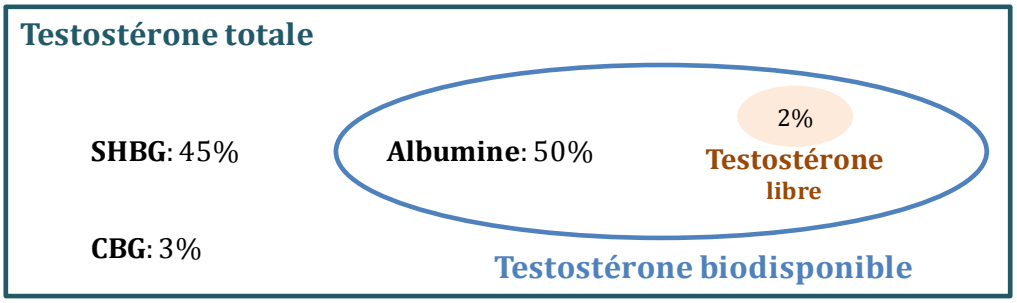
I. 3.1. Physiologie des androgènes chez les hommes

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes permettant la différentiation et la maturation des gonades. Ils stimulent les caractères sexuels secondaires pour aboutir à un phénotype masculin normal. La testostérone est la principale hormone androgénique chez les hommes. Elle joue un rôle essentiel dans la spermatogenèse directement ou par le biais de ses métabolites actifs (19).

Synthétisée à partir du cholestérol, la testostérone est produite et sécrétée en grande partie (environ 95%) au niveau des cellules interstitielles de Leydig du testicule (20). Un autre contingent très minoritaire provient des surrénales. Les cellules de Leydig se situent dans le tissu conjonctif occupant l'espace entre les tubes séminifères, sièges de la spermatogénèse, et elles contiennent de grandes quantités de gouttelettes lipidiques, de réticulum endoplasmique lisse et de mitochondries. Elles délivrent également d'autres stéroïdes : des précurseurs hormonaux (déhydroépiandrostérone (DHEA), Δ4-androstènedione, androstènediol) et des métabolites biologiquement actifs tels que la 5α-dihydrotestosterone (DHT) (21). La synthèse de la testostérone, à partir du cholestérol, est réalisée au niveau des mitochondries et nécessite l'intervention d'une protéine de transfert : StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein). Cette protéine régulatrice de la stéroïdogenèse transporte le cholestérol à travers la membrane mitochondriale externe et contribue à la production de la prégnénolone. Plusieurs enzymes, issues de la famille du cytochrome P450 oxydase, interviennent alors dans la synthèse des stéroïdes en transformant notamment la prégnénolone en DHEA puis en testostérone au niveau du réticulum endoplasmique lisse. Ces mécanismes complexes sont régulés par une hormone de l'hypophyse antérieure : la luteinizing hormorne (LH). La prolactine pourrait également intervenir secondairement en induisant l'expression du récepteur de la LH, mais son rôle reste débattu.

C'est donc l'axe hypothalamo-hypophysaire qui régule la sécrétion testiculaire de testostérone par l'action de la LH sur les cellules de Leydig. L'hypothalamus est une zone à la base de l'encéphale contenant plusieurs sous-structures de neurones, sécréteurs d'hormones dont la GnRH (Gonadotropin releasing hormone) et est rattaché à l'hypophyse par l'intermédiaire de la tige hypophysaire. La GnRH, sécrétée de manière pulsatile par décharges intermittentes, agit sur l'hypophyse et régule la sécrétion de la gonadotrophine hypophysaire LH et de FSH (follicule-stimulating hormone). La LH agit ensuite sur les cellules de Leydig et permet la production de testostérone. La FSH, quant à elle, agit sur les cellules testiculaires de Sertoli. Elle rend les cellules réceptives aux effets stimulateurs de la testostérone et permet ainsi la spermatogénèse. Lorsque la concentration circulante de testostérone augmente de manière importante, la testostérone exerce à son tour une rétroaction négative sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. L'activité de l'hypothalamus est alors réduite et permet une diminution de la testostérone suite à la baisse des gonadostimulines.

La testostérone circule en grande majorité dans le sang via des liaisons à des protéines de transport. Une partie de la testostérone, environ 2%, circule librement: la testostérone libre. Une autre partie (environ 50%) est faiblement liée à l'albumine, ainsi qu'à la Corticosteroid-Binding Globulin (CBG) (environ 3%). L'ensemble formé par la forme libre et la forme liée à l'albumine constitue la testostérone biodisponible. C'est la partie qui est biologiquement active sur les tissus. Une dernière partie (environ 45%) de la testostérone totale est liée fortement à la Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG), considérée comme la protéine de transport principale (Figure 3).



SHBG: Sex Hormone-Binding Globulin
CBG: Corticosteroid-Binding Globulin

Figure 3: Fractions de la testostérone plasmatique

La SHBG est fabriquée principalement par les cellules du foie. Elle permet de réguler les niveaux de testostérone en assurant sa disponibilité tissulaire. De plus, la liaison de la testostérone à la SHBG permet de contrôler sa clairance métabolique en évitant sa destruction par le foie. Le taux de testostérone biodisponible dépend donc des fluctuations de la concentration des protéines porteuses, en particulier de la SHBG.

Environ la moitié de la testostérone est métabolisée par le foie, l'autre moitié par les organes cibles. La voie principale fait appel à la 5α-réductase qui convertit la testostérone en DHT. La DHT est un puissant androgène qui se lie dès son entrée dans la cellule-cible à son récepteur cytoplasmique spécifique qui va permettre d'assurer l'essentiel de l'action androgénique. Par ailleurs, une faible quantité de testostérone est convertie par l'aromatase en 17β-estradiol. L'aromatisation a lieu principalement dans le tissu adipeux et elle est responsable, chez les hommes, de la production de 75 à 90% des estrogènes circulants, le reste provenant d'une production testiculaire par les cellules de Sertoli.

I. 3.2. Physiopathologie du déficit androgénique lié à l'âge

La sécrétion masculine de testostérone commence dès le développement du fœtus, puis s'interrompt presque entièrement après la naissance. A la puberté, la sécrétion de testostérone augmente fortement jusqu'à l'âge adulte pour permettre le développement des organes génitaux et la spermatogenèse. La sénescence s'accompagne de changements progressifs dans l'activité gonadotrope et/ou leydigienne. Une pathologie ou une prise médicamenteuse peut de la même manière modifier l'équilibre androgénique. Dès la trentaine, une baisse progressive de la testostérone, environ 1.5% par an (22), est observée. La Figure 4 présente l'évolution des concentrations sériques de la testostérone chez les hommes selon les différents stades du développement (23). Le terme « andropause » est fréquemment utilisé pour définir la diminution progressive de la testostérone avec l'âge, par analogie avec la ménopause de la femme. Cette terminologie peut-être inappropriée dans la mesure où l'andropause n'implique pas la fin de la vie reproductive chez les hommes contrairement à la ménopause chez les femmes. Le déficit androgénique lié à l'âge (DALA) qui associe un déficit en testostérone et un syndrome clinique d'hypoandrogénie lui est donc souvent préféré.

De nombreuses études transversales (24), puis des études longitudinales (25) (26) (22) , ont mis en évidence ce déclin progressif de la testostérone malgré une grande variabilité interindividuelle. Par ailleurs, le taux plasmatique de SHBG augmente chez l'homme âgé, induisant une diminution plus marquée des formes libre et biodisponible de la testostérone. Les taux d'estradiol semblent rester stables, ce qui peut être rapproché de l'augmentation de la masse grasse et de l'aromatisation adipocytaire de la testostérone au cours du vieillissement.

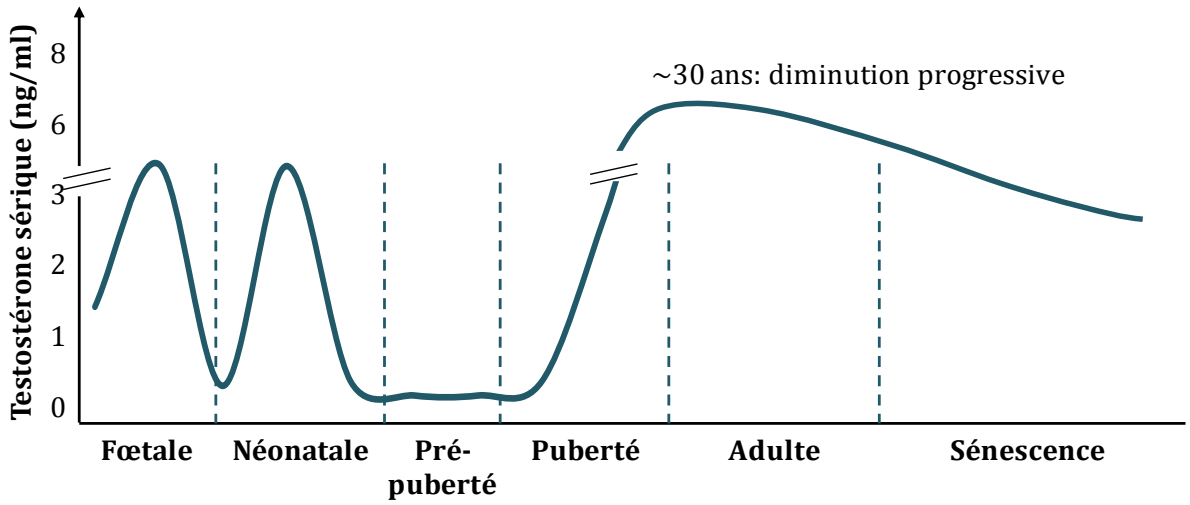


Figure 4: Évolution de la testostérone sérique avec l'âge chez les hommes

La chute de la testostérone circulante observée au cours du vieillissement est liée au déclin simultané de la fonction testiculaire et de la régulation hypothalamique par la GnRH. Les mécanismes à l'origine des changements observés chez l'homme au niveau hormonal ne sont pas encore totalement connus. Cependant, le vieillissement normal s'accompagne d'une réduction du nombre de cellules de Leydig avec diminution de la production de base en testostérone. Cette diminution des réserves cellulaires est associée à une altération des rythmes sécrétoires de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. L'avancée en âge entraîne une insuffisance de la fonction gonadotrope avec une sécrétion pulsatile de LH irrégulière, des signaux plus fréquents mais d'amplitude plus faibles. Enfin, l'augmentation de la SHBG avec l'âge accroît la liaison de la testostérone avec sa protéine de transport d'où le déclin plus marqué de la testostérone libre.

I. 3.3. Testostérone et maladies cardiovasculaires

L'incidence des maladies cardiovasculaires chez les hommes augmente fortement avec l'âge et ce phénomène coïncide étroitement avec la diminution progressive des androgènes. De plus, une diminution des taux circulants de testostérone est associée à une profil de risque cardiovasculaire défavorable, incluant notamment l'obésité et le diabète (27) (28). L'effet potentiellement protecteur de la testostérone vis à vis du risque artériel ischémique a récemment connu un regain d'attention avec la détection d'évènements cardiovasculaires adverses liés à la prise d'un traitement antiandrogénique chez les hommes atteints d'un cancer de la prostate (29). Bien que de nature observationnelle, ces données ont conduit à des alertes sur le rôle délétère possible d'une diminution de la testostérone.

La recherche d'un lien direct entre la baisse des androgènes et l'augmentation du risque cardiovasculaire a conduit initialement à des résultats négatifs (30) (31) (32) (33). L'introduction de biomarqueurs hormonaux dans les études de cohorte a permis néanmoins d'établir une association négative entre les taux plasmatiques de testostérone et la mortalité toutes causes (34). Ce résultat a été beaucoup discuté sans pouvoir séparer clairement l'accélération d'un processus de vieillissement général et le rôle étiologique spécifique de la baisse de la testostérone notamment dans le développement des maladies cardiovasculaires. Ce débat s'est prolongé dans des études montrant une relation négative entre la testostérone et l'athérome carotidien. En effet, ces données ne permettent pas toujours de distinguer les anomalies relevant d'un vieillissement vasculaire "normal" et le développement de plaques d'athérome authentiques.

Plus récemment, une étude de cohorte utilisant une méthode performante de mesure des stéroïdes sexuels a montré pour la première fois qu'une diminution de la testostérone circulante était un prédicteur indépendant de cardiopathie ischémique chez des hommes de plus de 65 ans (35). Une autre étude de cohorte a également montré des résultats similaires avec les accidents vasculaires cérébraux ischémiques (36).

L'incertitude actuelle concernant le rôle étiologique des androgènes dans l'athérothrombose est entretenue par les premiers résultats d'essais randomisés chez des hommes recevant une supplémentation en testostérone. Globalement, ces données ne montrent aucun bénéfice clair des androgènes dans la survenue des maladies cardiovasculaires (37).

II. OBJECTIFS

L'objectif principal de ma thèse est d'évaluer l'impact de la testostérone endogène dans le développement de maladies artérielles ischémiques chez les hommes au cours du vieillissement.

Pour répondre à cette problématique, deux axes sont développés à partir de la cohorte française des Trois Cités incluant 10 000 personnes âgées de plus de 65 ans :

- Étudier le lien entre les niveaux de testostérone plasmatique et les facteurs de risque cardiovasculaire chez des hommes « sains » âgés de plus de 65 ans.

Dans une première étape, nous avons étudié les associations des différentes formes de la testostérone, ainsi que de la SHBG et de l'estradiol avec les facteurs de risque cardiovasculaire connus. Ensuite, au vu de l'importance de l'athérosclérose dans l'étiologie des maladies artérielles ischémiques, nous nous sommes intéressés aux mesures non-invasives de l'athérosclérose carotidienne. Nous avons analysé la relation entre ces marqueurs carotidiens et les hormones sexuelles endogènes.

- Étudier la relation entre la testostérone et l'incidence des maladies cardiovasculaires chez les hommes après 65 ans.

Nous nous sommes intéressés, ici, à l'association entre les niveaux des hormones sexuelles endogènes et la survenue à 4 ans de cardiopathie ischémique et d'accident vasculaire cérébral ischémique.

III. POPULATION ET METHODES

Ce travail est basé sur les données de l'étude des Trois Cités. Il s'agit d'une étude de cohorte multicentrique française, axée sur le vieillissement cérébral. Son objectif principal concerne l'évaluation de la composante vasculaire des démences. D'autres axes de recherche sont développés en parallèle autour de ce thème, en particulier l'étude des facteurs favorisant la survenue de pathologies cardiovasculaires.

III. 1. ETUDE DES TROIS CITES

III. 1.1. Protocole de l'étude

L'étude des Trois Cités (3C) est une étude de cohorte prospective conduite dans trois villes françaises : Bordeaux, Dijon et Montpellier. Son principal objectif est d'évaluer le risque de démence et de déclin cognitif attribuable aux facteurs de risque vasculaire chez les personnes âgées de plus de 65 ans (38). Le nombre de participants par ville a été choisi selon la taille de la population de chacune d'elles. Les personnes de plus de 65 ans, non institutionnalisées, et habitant l'un des 3 centres ou sa banlieue étaient éligibles et ont été tirées au sort à partir des listes électorales. Un premier courrier contenant la présentation de l'étude et une invitation à participer avec leur conjoint leur ont été adressés. En cas de non réponse, les enquêteurs recontactaient les sujets par téléphone.

Entre mars 1999 et mars 2001, 3650 hommes et 5644 femmes, soit 9294 volontaires âgés de 65 ans ou plus, ont été inclus après participation au questionnaire de l'étude et aux premiers examens. Les examens initiaux portaient essentiellement sur: des tests neuropsychologiques, le recueil des antécédents médicaux, une évaluation de la symptomatologie dépressive, des mesures anthropométriques, des mesures de la pression artérielle, un prélèvement sanguin, un électrocardiogramme, une IRM cérébrale et une évaluation de la vitesse de marche.

La durée de suivi de la cohorte était initialement fixée à 4 ans, mais des investigations supplémentaires ont été réalisées par la suite. Les visites de suivi ont eu lieu tous les deux ans : la première entre 2001 et 2002 ; la deuxième entre 2003 et 2004. Elles consistaient en l'administration d'un nouveau questionnaire (allégé par rapport au questionnaire initial) et d'une ré-examination du participant.

Le comité d'éthique du centre hospitalo-universitaire du Kremlin-Bicêtre a approuvé le protocole de cette étude. Les examens médicaux n'étaient pas obligatoires, mais un formulaire de consentement libre était rempli par chaque participant.

III. 1.2. Recueil des données de base

L'organisation pratique des examens dépendait de chacun des centres. A Montpellier, une demi-journée d'examens des participants en clinique de recherche dans un hôpital régional de neurologie était prévue. A Bordeaux et Dijon, les examens et les tests cognitifs des sujets ont été réalisés à domicile. Les autres parties du protocole ont été complétées avec les participants au centre d'examen correspondant. Les hommes et les femmes refusant ou ne pouvant se rendre au centre d'examen étaient examinés à domicile.

Les données initiales ont été recueillies à l'aide d'un questionnaire standardisé pour les trois centres. Ce questionnaire était rempli au cours d'un entretien en face à face avec des infirmières ou des psychologues spécialisés. Les renseignements collectés à l'inclusion concernaient les variables sociodémographiques, le niveau d'étude, la profession et les habitudes de vie comme les consommations d'alcool et de tabac. Les informations sur les antécédents personnels familiaux de maladies cardiovasculaires et de démences ont également été complétées. Un auto-questionnaire sur le style de vie, les activités quotidiennes et le sommeil a ensuite été rempli par chaque participant.

La liste précise des médicaments du mois précédent l'examen a été rapportée à l'aide des ordonnances. Le nom de chaque médicament a été codé selon la classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique (ATC) (39).

Lors de l'examen clinique, les caractéristiques physiques des sujets, comme la taille, le poids, et d'autres paramètres anthropométriques ont été reportés dans le questionnaire. Le rythme cardiaque a également été mesuré. Les examinateurs effectuaient deux mesures (avant et après le questionnaire) des pressions artérielles diastoliques et systoliques avec un tensiomètre électronique (OMRON M4). Les moyennes des deux mesures systoliques ou diastoliques ont été considérées.

Les échelles de Katz (activités de la vie quotidienne) (40), Lawton (activités instrumentales de la vie quotidienne) (41) et Rosow et Breslau ont été utilisées pour évaluer la vue, l'ouïe et les déplacements des participants (42).

Lors de l'entretien en face à face, les antécédents de maladies coronaires et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) ont été recherchés, puis indiqués selon la déclaration de chaque participant. Ces informations ont ensuite été transmises à deux panels d'expert indépendants (l'un pour les maladies coronaires, l'autre pour les AVC) pour établir les diagnostics sur la base de critères standardisés. Elles ont été complétées si nécessaire auprès du médecin traitant ou des comptes-rendus d'hospitalisation.

III. 1.3. Mesures de l'athérome carotidien

Une échographie carotidienne et un électrocardiogramme étaient proposés aux sujets de moins de 85 ans. Un échotomographe haute résolution (Ultramark 9 HDI- High Definition Imaging) avec une sonde de 5 à 10 MHz a été utilisé dans chaque centre selon une procédure spécifique (43, 44). Les sites examinés sur les axes carotidiens droits et gauches étaient la carotide primitive, la bifurcation et l'origine de la carotide interne. Dix enregistrements en image fixe ou en séquences animées ont été réalisés pour chaque patient. L'examen comprenait également la recherche de plaques athéromateuses. Au total, 72% des sujets (n=6676) ont accepté d'effectuer cet examen. Les enregistrements des examens échographiques ont ensuite été transférés au centre de médecine préventive cardiovasculaire de l'hôpital Broussais à Paris (Pr. A. Simon, Dr J. Gariépy). Les mesures des paramètres carotidiens y étaient effectuées (45). La mesure de l'épaisseur de l'intima-média carotidienne (EIM) a été réalisée sur un segment libre de plaque d'athérome au niveau de la carotide commune deux à trois centimètres en dessous de la bifurcation carotidienne. Elle correspond à la distance entre l'interface lumière-intima et l'interface média-adventice (Figure 1, p19). La moyenne entre les mesures de l'EIM à gauche et à droite de la carotide a été calculée. L'existence des plaques athéromateuses côté droit et gauche des sites examinés et leur nombre ont été répertoriés.

Parmi les 6676 participants ayant eu une échographie, il y avait 19 sujets de plus de 85 ans. Ils ont été exclus, ainsi que les sujets pour lesquels les données sur l'existence de plaques étaient manquantes. Les variables précédentes ont donc été générées sur un nombre total de 6635 sujets dont 2632 hommes et 4003 femmes.

III. 1.4. Définition et validation des évènements incidents

La validation des évènements incidents est toujours en cours dans la cohorte 3. Elle est réalisée par un panel d'experts extérieur à l'étude. Chaque type d'évènement (démence, évènement coronaire ou accident vasculaire cérébral) a son propre comité d'experts associé. Les participants sont suivis tous les deux ans chez eux ou au centre d'étude pour la détection des évènements incidents.

III. 1.4.a. Evènements coronaires

Un évènement coronaire était défini comme un infarctus du myocarde (IDM), une angine de poitrine, une revascularisation ou un décès pour une cause coronaire.

Un IDM était défini par l'un des critères suivants :

1. Un nouveau diagnostic d'onde Q ou tout autre signe de nécrose récente à l'électrocardiogramme
2. Une douleur thoracique typique ou atypique accompagnée d'une nouvelle ischémie ou d'une aggravation d'une ischémie connue et d'un niveau d'enzymes cardiaques supérieur à deux fois la limite supérieure
3. La preuve post-mortem d'un IDM ou d'une thrombose récente

L'angine de poitrine était définie par la présence d'une douleur thoracique typique ou par l'un des critères suivants :

1. Une sténose coronarienne de plus de 50% à l'angiographie
2. Une scintigraphie positive
3. Une épreuve d'effort positive

4. Des modifications du signal électrique à l'électrocardiogramme (ECG) sans preuve d'IDM ni connaissance d'une autre pathologie induisant ce changement à l'ECG.

Les évènements coronaires incidents ont été identifiés et validés à partir des comptes-rendus d'hospitalisation et des dossiers médicaux. Les décès coronaires ont été recueillis et examinés par le centre de coordination de l'étude 3C à partir des informations données par les hôpitaux, les centres de coordination d'urgence et les médecins de famille (46). Les décès ont été codés selon la 10ème édition de la classification internationale des maladies (CIM-10) (47). Les codes I210-I219/I251-259/I461/R960 ont été inclus.

III. 1.4.b. Accidents vasculaires cérébraux

Un accident vasculaire cérébral a été défini comme la survenue brutale d'un déficit neurologique d'une durée minimale de 24h, confirmé par une lésion visible à l'imagerie. Les accidents ischémiques transitoires (AIT) n'ont pas fait l'objet d'une documentation spécifique. Les AVC ischémiques et hémorragiques étaient distingués par l'imagerie et définis à partir de la classification TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) (48). Les AVC fatals et non fatals ont été inclus dans les analyses. Nous avons exclus les AVC hémorragiques des analyses pour l'étude des maladies artérielles ischémiques.

III. 1.5. Prise en compte des principaux facteurs de risque cardiovasculaire

Les principaux facteurs de risque cardiovasculaire ont été pris en compte dans nos analyses. L'âge, le diabète, l'hypertension artérielle (HTA), l'hypercholestérolémie, l'indice de masse corporelle (IMC) et le tabac étaient les variables d'ajustement les plus utilisées dans nos modèles statistiques.

L'IMC a été calculé en divisant le poids par la taille au carré. L'IMC a également été étudié en classe à partir des seuils recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : faible si l'IMC est inférieur à 18.5 kg/m^2, normal s'il est compris entre 18.5 et 25 kg/m^2, surpoids si l'IMC est compris entre 25 et 30 kg /m^2 et obésité s'il est supérieur ou égal à 30 kg/m^2 (49). Selon les analyses et les effectifs, les classes ont pu être regroupées en 2 pour créer une variable binaire obésité (oui/non) ou en 3 classes (IMC normal, surpoids et obésité).

Le rapport tour de taille sur tour de hanches (WHR, Waist/Hip ratio) a été calculé et utilisé pour des analyses complémentaires.

La consommation de tabac a également été prise en compte. Les participants ont été classés selon les catégories suivantes : non fumeur, ancien fumeur (arrêt du tabac depuis au moins 6 mois) et fumeur actuel (fume régulièrement ou a arrêté de fumer depuis moins de 6 mois). Pour une meilleure prise en compte de cette variable, la consommation de tabac a également été évaluée à l'aide du nombre de paquets-années. Ce nombre est calculé en multipliant le nombre de paquets consommés par jour par le nombre d'années pendant lequel la personne estime avoir fumé cette quantité. La consommation d'un paquet de 20 cigarettes (paquet américain) par jour pendant un an correspond ainsi à un paquet-année.

Deux définitions ont été utilisées pour classer les sujets comme étant hypertendus. La première classait un sujet comme étant hypertendu si sa pression artérielle systolique était supérieure ou égale à 140 mm Hg ou si sa pression artérielle diastolique était supérieure ou égale à 90 mm Hg et/ou s'il prenait un traitement antihypertenseur. La seconde classait un sujet comme hypertendu si sa pression artérielle systolique était supérieure ou égale à 160 mm Hg ou si sa pression artérielle diastolique était supérieure ou égale à 95 mm Hg s'il prenait un traitement antihypertenseur. La première définition est la variable d'ajustement utilisée (sauf indications contraires).

Un sujet ayant un taux de cholestérol total supérieur ou égal à 7,25 mmol/L (2,80g) ou utilisant un traitement hypolipidémiant était considéré comme hypercholestérolémique.

Un sujet a été considéré comme diabétique selon sa déclaration préalable et si sa glycémie à jeun était supérieure ou égale à 6.1 mmol/L ou s'il prenait un traitement antidiabétique.

III. 2. ETUDE CAS-COHORTE DANS 3C

Pour réduire le nombre de dosages dans l'évaluation des biomarqueurs au sein d'une cohorte, deux schémas d'études sont fréquemment utilisés: le schéma cas-témoin emboîté et le schéma cas-cohorte (Figure 5). Ils combinent tous deux les avantages d'une étude de cohorte prospective et l'efficacité d'une étude cas-témoins (50). L'avantage majeur est l'économie de moyens car le recueil de l'information d'intérêt peut être réduit à un sous-échantillon. Les mesures biologiques peuvent alors être réalisées seulement sur une partie de la cohorte. Ceci est d'autant plus intéressant dans le cadre de l'étude 3C où des mesures biologiques non conventionnelles ont été effectuées. Ce type d'études est donc plus économique qu'une étude de cohorte classique mais sans perte majeure de puissance statistique.

Un schéma d'étude cas-cohorte a été mis en place dans l'étude 3C à la fin des 4 premières années de suivi. Ce schéma a été introduit par Prentice en 1986 (51). Il consiste tout d'abord en la sélection aléatoire d'un sous-échantillon représentatif de la cohorte initiale (appelé sous-cohorte). Ensuite, tous les cas incidents de la maladie étudiée n'appartenant pas à la sous-cohorte sont ajoutés pour former le schéma cas-cohorte.

Un avantage clé du schéma cas-cohorte est la possibilité d'utiliser la même sous-cohorte pour étudier le risque de survenue de différentes maladies. En effet, la sous-cohorte est créée indépendamment de l'évènement étudié, contrairement au schéma cas-témoin niché dans une cohorte où les témoins sont sélectionnés par appariement aux cas. De plus l'étude cas-cohorte peut évoluer dans le temps (non possible dans une étude cas-témoins) en incluant les nouveaux évènements détectés au cours du suivi, la sous-cohorte restant identique.

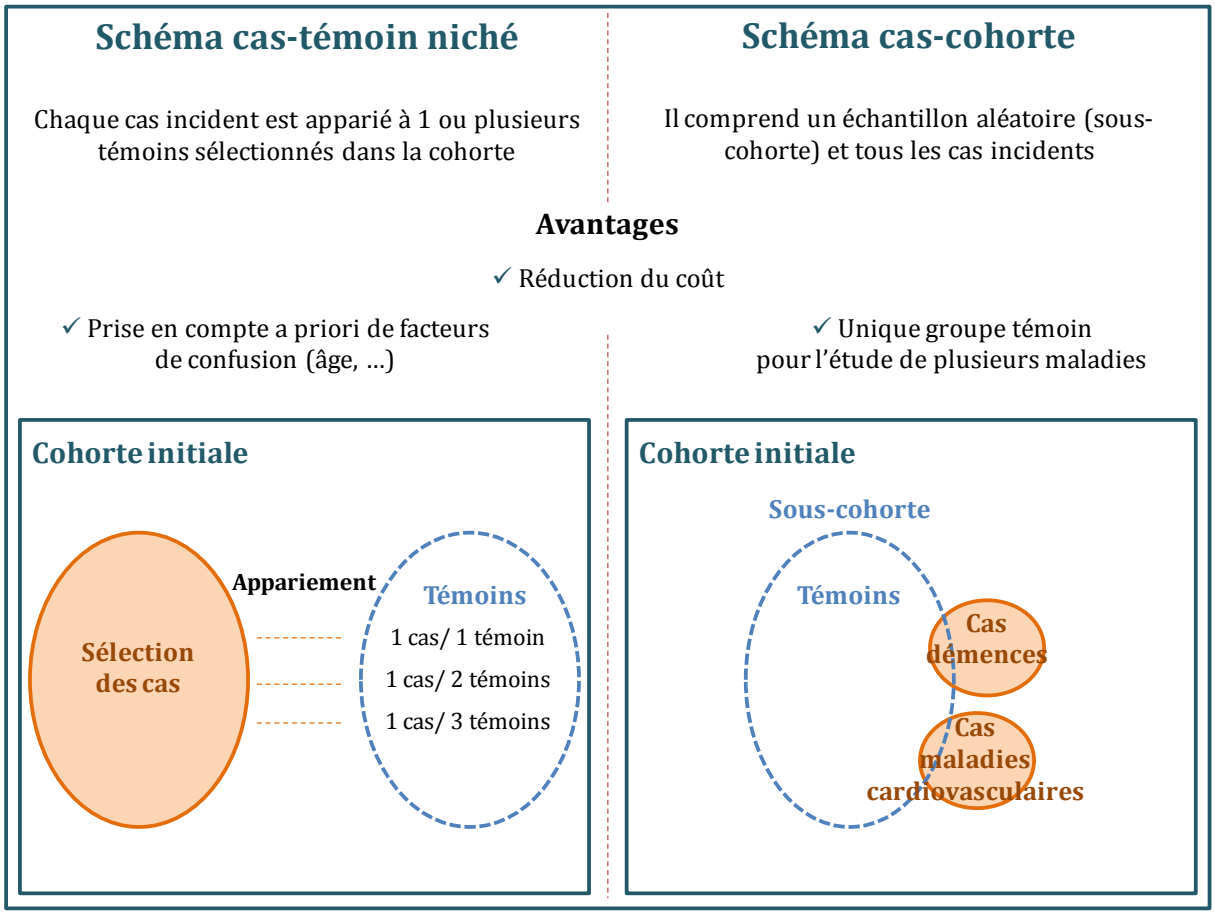


Figure 5: Schémas d'étude à partir d'une cohorte

Sous-cohorte

Parmi les 9 294 participants de la cohorte initiale, 880 ont été exclus du tirage au sort pour l'une des raisons suivantes : l'absence de prélèvement sanguin, ou l'absence de données relatives à l'incidence d'au moins un des trois évènements étudiés (évènement coronaire, AVC et démence).

Le sous-échantillon aléatoire a été tiré selon une fraction de 15% des sujets de la cohorte restante (n=8 414) et en stratifiant sur l'âge (par tranches de 5 ans), le centre de recrutement et le sexe. La sous-cohorte contenait 1254 participants dont 495 hommes (Figure 6).

Echantillonnage pour l'étude des maladies artérielles ischémiques

Parmi les hommes appartenant à la sous-cohorte, ceux ayant déclarés prendre des traitements hormonaux (n=5) ont été exclus des analyses. Les hommes avec un cancer de la prostate (n=17) n'ont pas été pris en compte (52). Un sujet présentant des taux hormonaux élevés a été également exclu définitivement des analyses (niveau d'estradiol=118 pg/mL). A l'inclusion, 61 hommes ont déclaré avoir déjà eu un évènement coronaire et 20 un AVC dans la sous-cohorte. Dans la cohorte entière, nous avons dénombré 449 cas prévalents de cardiopathies ischémiques et 21 cas prévalents d'AVC. Les cas prévalents ont été exclus également pour cette étude. Les mêmes critères d'exclusion ont été appliqués pour les hommes appartenant à la cohorte entière.

Le schéma cas-cohorte a été construit avec les évènements validés après 4 ans de suivi. Les informations sur la survenue d'un évènement coronarien n'étaient pas connues pour 24 hommes dans la sous-cohorte. L'échantillon final contient 368 hommes dont 23 ont eu un évènement artériel ischémique. A cet échantillon, 123 cas d'évènements artériels ischémiques ont été rajoutés (évènements qui ont été observés en dehors de la sous-cohorte après 4 ans de suivi). Le premier évènement artériel ischémique ayant eu lieu a été pris en compte pour les sujets ayant eu à la fois un évènement coronaire et un AVC.

Le cas-cohorte chez les hommes est composé au total de 146 évènements artériels ischémiques (n=112 évènements coronaires, n=34 AVC ischémiques). (Figure 6).

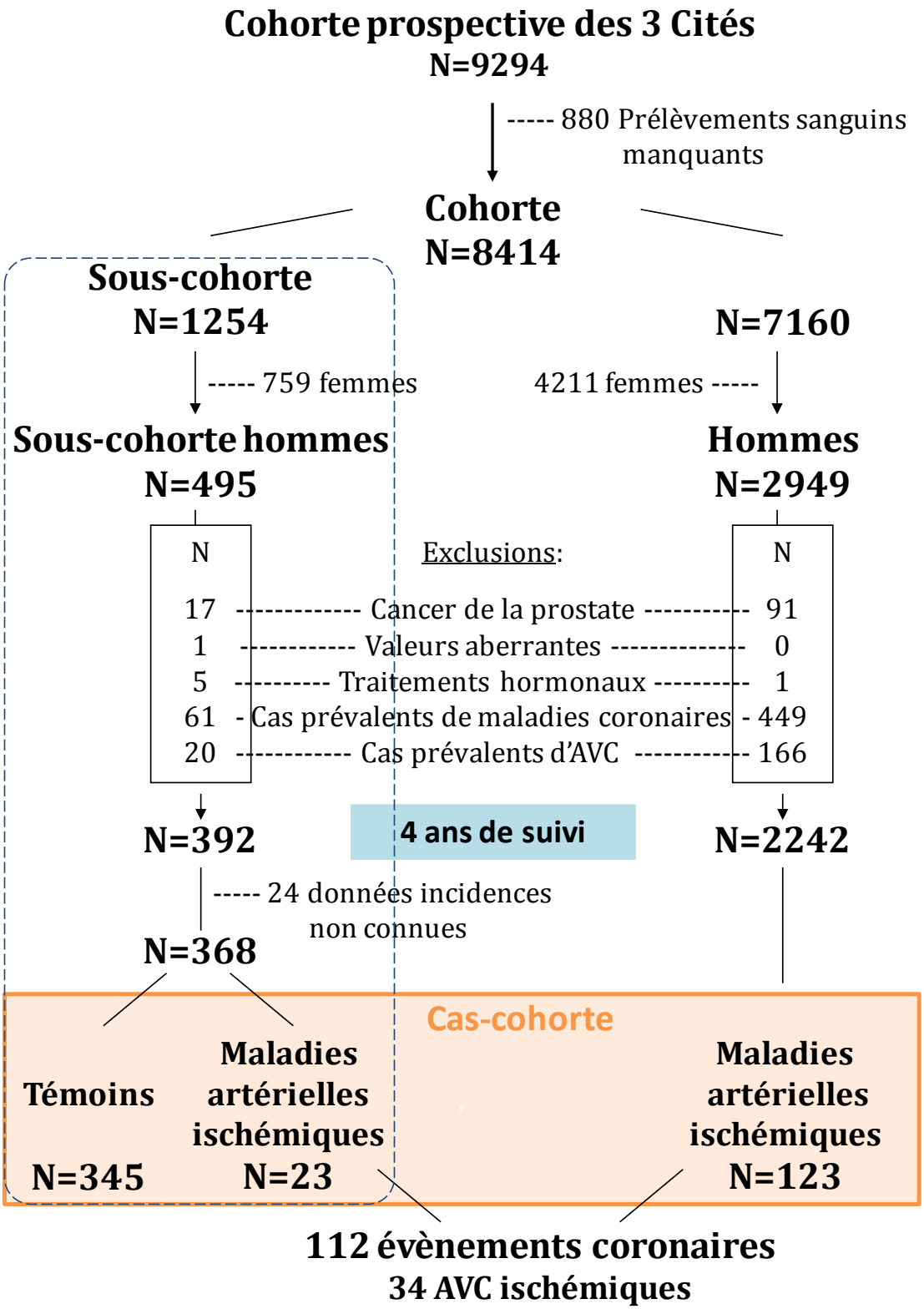


Figure 6 : Echantillonnage pour l'étude des maladies artérielles ischémiques

III. 3. DOSAGES DES PARAMETRES BIOLOGIQUES

La majorité des participants, environ 90%, ont accepté le prélèvement veineux. Cette prise de sang a été réalisée le matin au repos et chez le sujet à jeun depuis 12h. Avec l'accord des participants, une biothèque a également été constituée pour conserver le plasma, le sérum et l'ADN. La mesure de plusieurs paramètres biologiques a été effectuée à l'inclusion à partir de sang frais.

III. 3.1. Hormones sexuelles endogènes

Pour le dosage des hormones sexuelles endogènes, le sang a été recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA (acide Ethylène Diamine Tétra Acétique). Les échantillons plasmatiques ont été préparés par centrifugation à environ 1500g pendant 15 minutes à +4°C et à une vitesse de 3000 tours par minute (Heraeus Megafuge 2.0R). Les aliquotes obtenues ont été immédiatement congelées à -80°C dans des tubes en plastique de 1mL.

III. 3.1.a. Dosage de la testostérone

Principales méthodes utilisées : avantages et inconvénients

Deux grandes familles de méthode de dosage se distinguent : les méthodes immunologiques et la spectrométrie de masse (terme anglais : Mass Spectrometry, MS) couplée à la chromatographie gazeuse (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) ou liquide (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS).

La première application immunologique a été réalisée par Yalow et Berson en 1959 (53) pour le dosage de l'insuline. Les immunodosages sont basés sur la mise en évidence du complexe qui se forme lors de la réaction chimique antigène-anticorps. Le principe consiste à fixer un anticorps spécifique sur l'antigène d'intérêt puis à relever la présence de cet anticorps par un traceur, qui est soit un second anticorps soit un second antigène. Les traceurs ou marqueurs peuvent être de natures différentes (radioactives,

luminescentes ou enzymatiques). Un dosage immunologique dépend également du procédé utilisé. Il est déterminé selon les concentrations relatives en anticorps et en antigènes (méthode par compétition ou méthode sandwich).

Nous nous intéresserons dans ce chapitre uniquement aux dosages radio-immunologiques (RIA, Radioimunoassay) désignant plutôt les méthodes par compétition et utilisant un composé radioactif artificiel pour détecter la formation du complexe antigène-anticorps. Ces immunodosages sont faciles à mettre en œuvre. Cependant s'ils sont réalisés directement sans étape préalable de purification (RIA direct) du milieu (plasma ou serum), ils ne permettent pas d'identifier formellement et sans ambigüité le composé qui est analysé. En effet, malgré la spécificité des anticorps utilisés, des réactions croisées avec des molécules interférentes peuvent subsister. Les dosages directs ont une sensibilité suffisante pour distinguer les valeurs pathologiques des taux normaux (54). Une étape de purification peut être réalisée pour permettre d'éliminer la plupart des molécules de structure voisine de celle du stéroïde à doser. La chromatographie est souvent utilisée pour réaliser cette extraction. On parle alors de méthode indirecte (RIA indirect).

La spectrométrie de masse associée à la chromatographie gazeuse est un outil en plein essor et est devenue la méthode de référence car elle présente un gain en spécificité. La spectrométrie de masse est une technique de détection et d'identification des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Le principe de la chromatographie quant à elle est de séparer les constituants d'un mélange. En phase gazeuse, cette technique est réservée à l'analyse de composés relativement volatils et thermiquement stables. Un chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois parties: un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur qui peut être un spectromètre de masse. La chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry) permet alors de caractériser la structure chimique des molécules en analysant les produits de séparation.

Les principaux avantages et inconvénients des méthodes indiquées précédemment sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Avantages et inconvénients des méthodes de dosage de la testostérone totale.

Méthode utilisée	Avantages	Inconvénients
RIA direct	• Rapide et facile à mettre en œuvre • Faible quantité de plasma requise (~50µL) • Peu coûteuse • Automatisation	• Manque de spécificité et de reproductibilité • Pas de standardisation
RIA indirect	• Bonne reproductibilité pour les hauts et bas niveaux • Spécificité élevée	• Laborieux à mettre en œuvre • Coût élevé • Quantité importante de plasma requise
GC-MS ou LC-MS	• « Méthode de référence » (gold standard) • Spécificité élevée	• Laborieux à mettre en œuvre • Coût élevé • Quantité importante de plasma requise

RIA : dosage radio-immunologique (Radio-ImmunoAssay)

GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

LC-MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

Dans notre étude, le dosage de la testostérone totale a été effectué à l'aide de kits de radio-immunologie (Spectria RIA) commercialisés par la société Orion Diagnostica (Espoo, Finlande) sans étape préalable d'extraction. Cette méthode a été choisie en raison de la faible quantité de plasma mise à disposition et de son faible coût.

La limite de détection de ces kits pour cette mesure était de 0.02 ng/mL (0.06 nmol/L). Les coefficients de variation intra-essai sont de 3.8% pour une concentration de 3.2 ng/mL (11.4 nmol/L) et de 4.8% pour une concentration de 6.7 ng/mL (233 nmol/L). Les coefficients de variation inter-essai sont respectivement de 4.8% et de 5.5% pour les concentrations de 3.2 ng/mL (11.4 nmol/L) et de 3.2 ng/mL (11.4 nmol/L).

Validation du dosage de la testostérone

Dans notre étude, le dosage de la testostérone totale effectué par RIA direct a été comparé au dosage par GC-MS sur un échantillon de 44 hommes.

Une forte corrélation positive entre ces deux méthodes de dosage a été trouvé avec un coefficient de corrélation de Spearman r=0.98 (p<0.001). Les moyennes et écart-types de la testostérone totale étaient, respectivement, de 2.66 (2.30) ng/mL pour la méthode RIA et 2.85 (2.24) ng/mL pour la GC-MS et significativement différentes avec p<0.001.

Pour évaluer l'accord entre différentes méthodes, le coefficient de corrélation est souvent compléter par la méthode graphique de Bland et Altman (55). Le coefficient de corrélation n'est pas suffisant pour apprécier la concordance entre des valeurs obtenues selon des méthodes différentes. Bland et Altman ont proposé de représenter les différences des résultats fournis par les deux méthodes en fonction de la moyenne de ces résultats. Celle-ci permet alors d'apprécier graphiquement l'écart observé entre les valeurs obtenues pour la même mesure (le biais) et de visualiser les zones où les erreurs de mesure sont élevées. Le biais observé sur notre échantillon de 44 hommes entre les deux mesures de testostérone était de 0.19 avec un intervalle de confiance à 95% de [-0.28;-0.12]. Les bornes de concordances étaient comprises dans l'intervalle [-0.72;0.33] (cf Figure 7.). Les niveaux de testostérone mesurés par RIA étaient significativement sous-estimés de 7% par rapport aux niveaux de testostérone mesurés par chromatographie gazeuse.

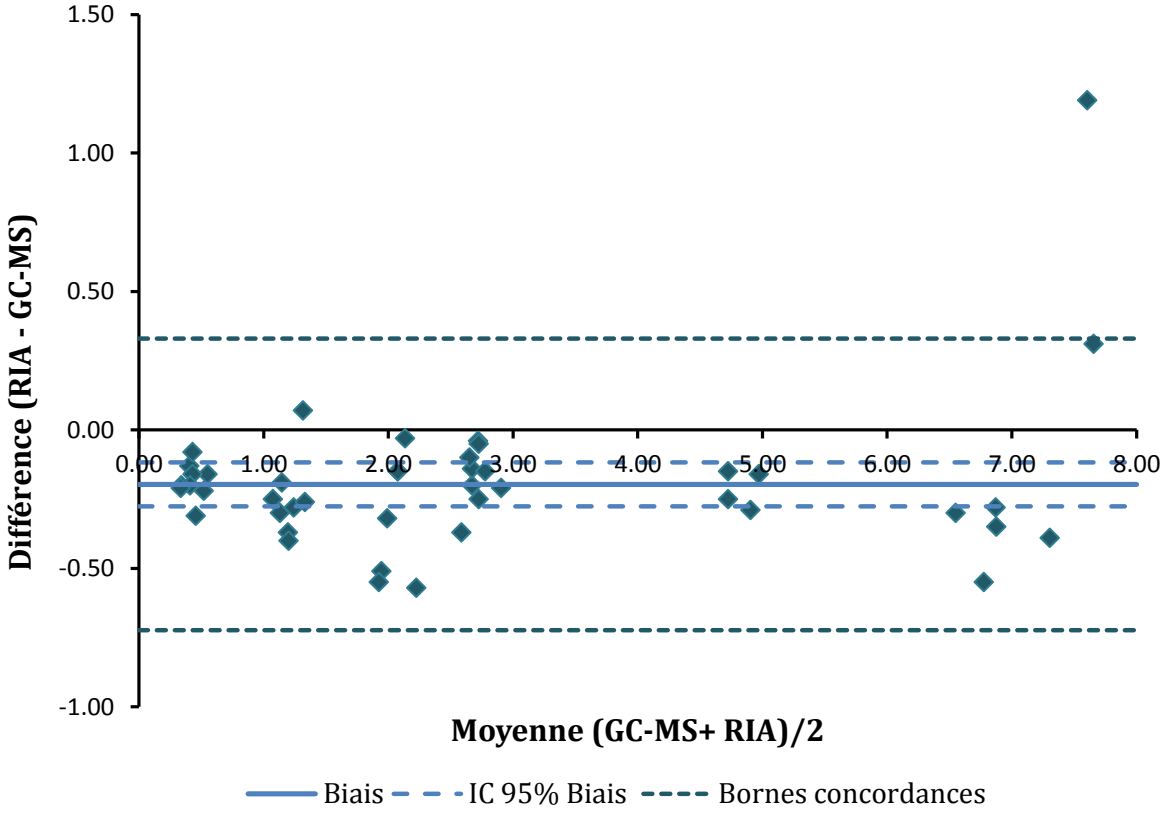


Figure 7: Graphique de Bland et Altman: concordance des méthodes RIA et GC-SM pour la mesure de testostérone

Testostérone biodisponible

La testosterone biodisponible a été obtenue à l'aide d'une méthode de dosage par précipitation au sulfate d'ammonium. Cette méthode consiste tout d'abord à séparer la testostérone liée à la SHBG de la testostérone libre ainsi que celle liée à l'albumine par précipitation de la SHBG au sulfate d'ammonium à 50% de saturation à 4°C. Ensuite, une extraction et un dosage radio-immunologique est effectué dans le surnageant du plasma, après équilibrage et une mise en présence d'une dose de testostérone marquée au tritium [3H]-testostérone (56).

Les coefficients de variation intra et inter-essai étaient respectivement de 7.0% et 8.5% pour une concentration de 1.4 ng/mL.

Testostérone libre

La fraction libre de la testostérone [TL] (nmol/L) a été estimée à partir des concentrations de testostérone totale [TT] (nmol/L), de SHBG [SHBG] (nmol/L) et d'albumine [Alb] (g/L) à l'aide des équations stœchiométriques de Vermeulen (57). La solution de l'équation du second degré obtenue par l'algorithme nous donne directement l'estimation de la concentration de testostérone libre par la formule suivante :

$$[TL] = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4 * a * (-[TT])}}{2a}$$

Avec,

$$a = k_t * (1 + k_a * [Alb]) \; et \; b = k_t * ([SHBG] - [TT]) + 1 + k_t * k_a * [Alb]$$

Où k_t est la constante d'association entre la testostérone et la SHBG, estimée à 10^9 et k_a, la constante d'association entre la testostérone et l'albumine 3,6*10^4 L/mol. La masse molaire de l'albumine est 69000 g/mol et pour convertir la testostérone en nmol/L à partir de sa concentration en ng/mL, il faut la multiplier par 3.47.

III. 3.1.b. Dosages des autres hormones sexuelles

SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin)

La SHBG a été mesurée par un dosage chimiluminescent immunométrique en phase solide (Immulite, Siemens Health Diagnostic Products ; Llanberis, UK).

La sensibilité du dosage était de 0.02 nmol/L.

Les coefficients de variation intra et inter-essai étaient respectivement de 2.5% et 5.2% pour une concentration de 21 nmol/L.

Albumine

Le dosage de l'albumine a été réalisé par la méthode colorimétrique au vert de bromocrésol à l'aide un « Albumin-Kit » (BioMerieux ; Marcy l'étoile, France) (58).

La limite de détection était de 0.35 g/L (5 mmol/L).

Les coefficients de variation intra et inter-essai étaient respectivement de 1.9% et 2.5% pour une concentration de 49.2 g/L (714 mmol/L).

Estradiol

L'estradiol a été mesuré également par une méthode de dosage radio-immunologique sans étape d'extraction (Spectria RIA, Orion Diagnostica ; Espoo, Finlande).

La limite de détection de ces kits était de 2.0 pg/mL (7.3 pmol/L).

Les coefficients de variation intra et inter-essai étaient respectivement de 2.8% et 5.8% pour une concentration de 24 pg/mL (88 pmol/L).

III. 3.2. Paramètres biologiques conventionnels

III. 3.2.a. Lipides plasmatiques et glycémie

Les mesures de la glycémie, des paramètres lipidiques (cholestérol total, LDL (Low-Density-Lipoprotein) cholestérol et le HDL (High-Density-Lipoprotein) cholestérol), et des triglycérides ont été centralisées et réalisées au laboratoire de biochimie du centre hospitalier universitaire de Dijon.

La fraction LDL-cholestérol a été estimée par la formule de Friedewald (59). La formule est applicable uniquement aux sujets dont la concentration de triglycérides est inférieure à 4,5g/L (5,08 mmol/L). Dans le cas contraire, l'estimation de cette concentration n'a pas été effectuée et ces sujets ne font pas partie des analyses.

III. 3.2.b. Protéine C-réactive ultra-sensible (CRP)

La protéine C-réactive ultra-sensible a été mesurée par un dosage immunologique turbidimétrique (PETIA, particle-enhanced turbidimetric immunoassay) (60).

La sensibilité du dosage et le coefficient de variation inter-essai étaient respectivement de 0.15 mg/L et 2.6%.

III. 4. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

Les données ont été analysées à l'aide des procédures courantes du logiciel SAS 9.2 (Statistical Analysis System 9.2 Institute Inc., Cary, NC, USA).

Les différentes analyses statistiques des données de l'étude 3C concernant le risque cardiovasculaire ont été réalisées en tenant compte du schéma cas-cohorte. En effet, des cas incidents étant ajoutés à la sous-cohorte, la proportion d'évènements étaient plus importante que celle dans la population d'étude initiale.

Pour les analyses descriptives, des déterminants des hormones sexuelles et de la relation entre la testostérone et l'athérome carotidien, l'échantillon de la sous-cohorte a été utilisé. Cet échantillon semblait le plus adapté pour ne pas introduire de biais dans la mesure des associations.

Pour les analyses de la relation entre la testostérone et le risque d'évènements artériels, le schéma cas-cohorte a été étudié.

III. 4.1. Analyse descriptive

Les caractéristiques générales des sujets appartenant à la sous-cohorte et de ceux appartenant à la cohorte entière ont été comparées à l'aide de tests du Chi-deux pour les variables catégorielles et de tests t de Student pour les variables continues. Les caractéristiques des hommes ont été présentées par : la moyenne et l'écart-type pour les

variables continues, la moyenne géométrique et l'intervalle interquartile pour les variables continues log-transformées ou par l'effectif et le pourcentage de la catégorie pour les variables catégorielles.

La normalité des distributions des paramètres d'intérêt et des variables d'ajustement a été vérifié graphiquement et par le test de Shapiro-Wilk. Le coefficient de symétrie (skewness) et le coefficient de concentration (kurtosis) ont été analysés également.

Les exclusions concernant les analyses sur les hormones sexuelles sont détaillées précédemment dans la partie III. 2. Elles concernent principalement les traitements hormonaux, les cancers de la prostate et les valeurs aberrantes.

La corrélation entre les hormones sexuelles a été évaluée à l'aide des coefficients partiels de Pearson, ajustés sur l'âge et le centre.

La comparaison des niveaux moyens d'hormones a été réalisée à l'aide de test de Student. Les moyennes ont été ajustées sur l'âge et le centre et présentées avec l'intervalle interquartile (Q1-Q3).

III. 4.2. Déterminants des hormones sexuelles

Les analyses ont été réalisées à partir de de la sous-cohorte des hommes et après les exclusions nécessaires.

Les associations brutes entre chaque hormone sexuelle endogène et les différentes variables explicatives (âge, IMC, diabète, hypertension, etc) ont été étudiées à l'aide de régression linéaire simple. Les variables associées avec une probabilité inférieure ou égale à 0.15 et les facteurs de risque traditionnels ont été inclus dans un modèle de régression linéaire multivariée. Les déterminants indépendants de l'hormone étudiée ont été évalués à l'aide des coefficients standardisés de la régression linéaire multivariée. Les cas prévalents de maladies artérielles ischémiques ou de démences n'ont pas été exclus. Une analyse de sensibilité a été également réalisée en excluant les cas prévalents.

III. 4.3. Testostérone et athérome carotidien

Nous sommes partis de l'échantillon précédent de la sous-cohorte. Parmi les 472 hommes, 360 hommes ont eu une échographie carotidienne. Les données sur la présence de plaques d'athérome étaient renseignées pour 360 hommes. Nous avons restreint les analyses aux sujets avec les données connues de l'épaisseur intima-média (EIM), à savoir 354 hommes.

III. 4.3.a. Epaisseur intima-média (EIM)

La mesure de l'EIM a été log-transformée car sa distribution n'était pas normale.

Les coefficients de corrélation de Pearson ajustés sur l'âge et le centre entre les mesures d'hormones et d'EIM ont été calculés.

Les associations entre les hormones sexuelles et l'EIM ont été testées à l'aide d'un modèle de régression linéaire multivariée. Les coefficients de régression ont été ajustés sur l'âge et le centre dans un premier modèle, puis sur les traditionnels facteurs de risque dans un second modèle. Les coefficients donnés correspondent à l'augmentation d'un écart-type de la distribution de l'hormone sexuelle endogène concernée. Les interactions entre les hormones et les facteurs de risque ont été évaluées.

La médiane a été choisie pour classer les hommes selon des bas ou des hauts niveaux de testostérone lors des analyses stratifiées. Nous avons considéré que les hommes avaient un statut pro-inflammatoire lorsque la CRP était inférieure à 2mg/L (61).

III. 4.3.b. Plaques d'athérome

La comparaison des critères des hommes avec et sans plaques d'athéromes a été effectuée à l'aide de test de Student pour les variables quantitatives et de test de Khi-deux pour les variables qualitatives. Les associations entre les hormones sexuelles et l'absence ou la présence de plaques d'athérome ont été évaluées à l'aide de régression

linéaire multivariée. Les coefficients des régressions ont été ajustés sur les mêmes facteurs des deux modèles vus pour l'EIM.

III. 4.4. Testostérone et évènements cliniques

Le cas-cohorte a été pris en compte et les cas prévalents de maladies artérielles ischémiques ont été exclus des analyses (Figure 6). Les moyennes arithmétiques ou géométriques et les proportions ont été comparées selon le statut cas/non cas en utilisant un test t de Student et un test du Chi-deux. Les moyennes des variables explicatives ont été également représentées selon la distribution par quintiles des niveaux de testostérone totale. Un test de tendance a été réalisé pour observer l'évolution des variables explicatives en fonction des quintiles de testostérone.

Les méthodes utilisées pour l'analyse de survie permettent d'associer la fréquence et le délai de survenue d'un évènement. Le modèle semi-paramétrique de Cox est l'une d'entre elles. Il permet d'exprimer le risque instantané associé à la survenue d'un évènement à l'instant t en prenant en compte simultanément l'effet de plusieurs covariables.

III. 4.4.a. Analyse de survie adaptée au schéma d'étude cas-cohorte

Dans le cadre de l'étude 3C, l'adaptation du modèle de Cox est nécessaire en raison de l'échantillonnage. Trois méthodes ont été proposées dans la littérature (62), nous avons choisi la méthode décrite par Barlow (63) en 1999 pour tenir compte de la fraction de sondage utilisée pour la constitution de l'échantillon aléatoire. Son principe repose sur le fait de prendre en considération la provenance différente des cas de l'échantillon. En effet, l'ajout des cas de la cohorte à l'échantillon aléatoire entraîne un changement de variance dû à la surreprésentation a priori des cas dans l'estimation des risques. Ainsi, la méthode consiste à appliquer un poids différent au cas selon qu'il provienne de la sous-cohorte ou de la cohorte entière (64).

Le modèle de Cox exprime la fonction de risque instantané h de l'individu i possédant p caractéristiques $Z_i = (Z_{i1}, Z_{i2}, \dots, Z_{ip})$ comme le produit d'une fonction de risque de base $h_0(t)$ et d'une fonction de régression des covariables Z_i :

$$h(t, Z_1, Z_2, \dots, Z_p) = h_0(t)e^{\beta' Z_i}$$

Où $\beta = (\beta_1, \dots, \beta_p)$ est le vecteur des coefficients de la régression.

Le rapport des risques instantanés de deux sujets i et j ayant pour covariables respectives Z_i et Z_j vaut :

$$\frac{h_i(t, Z_i)}{h_j(t, Z_j)} = \frac{h_0(t)e^{\beta' Z_i}}{h_0(t)e^{\beta' Z_j}}$$
$$= \frac{e^{\beta' Z_i}}{e^{\beta' Z_j}}$$

Ce rapport ne dépend pas du temps, les fonctions de risque instantané sont proportionnelles. C'est une conséquence du modèle mais aussi une hypothèse importante à vérifier. La fonction de base dépend du temps et représente le risque instantané de sujets ne présentant aucun facteur de risque ($X_i = 0$). Sa forme n'étant pas déterminée, l'intérêt du modèle résulte principalement dans l'estimation des paramètres β_i. Celle-ci est obtenue par la méthode du maximum de vraisemblance.

Le raisonnement de Cox est alors le suivant : aucune information de peut être donné sur β par les intervalles de temps durant lesquels aucun évènement n'a eu lieu, car on peut concevoir que h_0 soit nulle dans ces intervalles. On travaille alors conditionnellement à l'ensemble des instants où un évènement a eu lieu. On parle de vraisemblance partielle. La probabilité pour qu'il y ait un évènement en t_i (c'est-à-dire dans l'intervalle $[t_i, t_i + \Delta t]$ est :

$$\sum_{j \in R(t_i)} h_0(t_i)e^{\beta' Z_j}$$

Où $R(t_i)$ est l'ensemble des individus encore à risque juste avant l'instant t_i. La probabilité pour qu'un sujet i ait un évènement en t_i sachant qu'un évènement a eu lieu en t_i vaut :

$$\frac{e^{\beta' Z_i}}{\sum_{j \in R(t_i)} e^{\beta' Z_j}}$$

Cette probabilité dépend uniquement du paramètre β. A chaque évènement, le nombre de sujets à risque diminue au dénominateur. La vraisemblance partielle est définie alors comme le produit des probabilités conditionnelles sur les temps des évènements. Celle-ci sera maximisée et s'écrit :

$$L = \prod_{i=1}^{D} \frac{e^{\beta' Z_i}}{\sum_{j \in R(t_i)} e^{\beta' Z_j}}$$

Où D est le nombre d'évènements observés. Dans le cadre de l'analyse cas-cohorte, si on appliquait ce modèle, chaque évènement qu'il ait été sélectionné ou non dans la sous-cohorte, contribue de la même manière dans l'estimation des risques. La vraisemblance proposée par Prentice et Barlow (63) consiste à appliquer un poids différents au dénominateur des cas selon leur provenance. La vraisemblance partielle s'écrit alors :

$$\frac{e^{\beta' Z_i}}{w_i e^{\beta' Z_i} + \sum_{j \in R(t_i)} w_j e^{\beta' Z_j}}$$

Où w_i est le poids attribué au sujet i au temps t_i. Le dénominateur représente dans le nouveau calcul de la vraisemblance la somme de la contribution du sujet ayant fait l'évènement et de l'ensemble des sujets inclus dans la sous-cohorte $R(t_i)$. En effet, les cas ajoutés à l'échantillon aléatoire ne contribuent pas comme individus à risque ent_i.

Ainsi, en utilisant la méthode de Barlow, un poids dépendant de la probabilité d'appartenir au cas-cohorte a été appliqué. La fraction de sondage, ici 15%, a été déterminé selon le nombre de sujets nécessaires pour étudier les évènements souhaitées. Le poids a été approximé par l'inverse de la fraction de sondage pour les sujets de la sous-cohorte. Cette fraction inverse a également été appliquée aux sujets « cas » de la sous-cohorte tant que l'évènement n'ait pas eu lieu. Au moment de l'évènement, un poids de 1 a été attribué. Les cas additionnels n'interviendront dans le modèle qu'au moment de l'évènement avec un poids égal à 1. (Cf. Tableau 2).

Tableau 2 : Poids appliqués pour l'estimation des risques à partir d'un modèle de Cox adapté au schéma d'étude cas-cohorte selon la méthode de Barlow.

Sujets	Poids appliqué	Temps de suivi
Non cas (sous-cohorte)	1/0.15	Toute la période de suivi
Cas		
Issus de la sous-cohorte	1/0.15	Jusqu'à l'évènement
	1	Au moment de l'évènement
Additionnels	1	Au moment de l'évènement

III. 4.4.b. Estimation des risques

Nous avons évalué le risque de maladies artérielles ischémiques, de maladies coronaires et d'AVC ischémiques associés aux hormones sexuelles endogènes.

L'âge est un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires et des covariables étudiées. Le schéma d'étude nous permettant d'utiliser l'échelle de temps appropriée, nous avons choisi d'utiliser le modèle de Cox avec l'âge comme échelle de temps (65).

Les Risques Relatifs (RR) et leurs intervalles de confiance à 95% ont été calculés selon deux modèles. Le premier modèle est ajusté sur le centre et le deuxième prend en compte les facteurs de risques cardiovasculaires usuels (IMC, diabète, hypertension, hypercholestérolémie et consommation de tabac).

Les variables d'intérêt ont été incluses dans le modèle soit comme des variables continues soit comme des variables qualitatives (tertiles, quartiles ou quintiles). L'hypothèse des risques proportionnels a été vérifiée. Nous avons testé également l'écart à la linéarité. Si le test était significatif, nous nous sommes intéressés à des modèles multivariés quadratiques. Nous avons testé les associations en forme de J ou de U entre les hormones sexuelles et le risque de maladies artérielles ischémiques. Ces tests étaient réalisés avec les variables d'intérêt en continues et élevées au carré. Si une

relation quadratique était détectée, les risques étaient présentés généralement par les quintiles de la distribution des hormones avec le deuxième quintile en référence. Les quintiles ont été réalisés sur l'échantillon utilisé pour cette analyse et uniquement chez les hommes de la sous-cohorte.

Les interactions entre les facteurs de risques cardiovasculaires et les hormones sexuelles sur le risque d'évènement ont été testées et aucune d'elles n'étaient significatives.

IV. RESULTATS

IV. 1. CARACTERISTIQUES DE LA SOUS-COHORTE

La cohorte entière contient un échantillon de 3444 hommes dont 495 appartiennent à la sous-cohorte. Le Tableau 3 présente les caractéristiques générales de ces hommes. Pour la sous-cohorte, les valeurs manquantes concernent l'IMC/obésité (n=2), le niveau d'éducation (n=9), le mode de vie (n=2), les revenus (n=22), et le diabète (n=1). Les moyennes d'âge et d'IMC des hommes appartenant à la sous-cohorte et ceux dans le reste de la cohorte sont similaires. Aucune différence significative entre les caractéristiques des hommes selon l'appartenance ou non à la sous-cohorte n'a été observée. La proportion d'hommes hypertendus (seuils 140/90 mm Hg cf. III. 1.5) inclus dans la sous-cohorte est légèrement plus faible que celle des hommes du reste de la cohorte (p=0.06). Dans la sous-cohorte, 12% des hommes sont diabétiques, 79% hypertendus, 43% présentent une hypercholestérolémie, et 34% fument plus de 20 paquets-années. A l'inclusion, environ 15% des hommes ont présenté un évènement cardiovasculaire ou une démence (27 AVC, 36 infarctus du myocarde et 11 démences).

Les niveaux des hormones sexuelles endogènes sont disponibles pour tous les hommes sauf pour un sujet où sa valeur d'estradiol n'est pas connue. La Figure 8 présente les distributions des hormones sexuelles endogènes. Les distributions de la testostérone totale et biodisponible ont été considérées comme normales. Pour la testostérone libre, le test de Shapiro-Wilk était très significatif, rejetant ainsi l'hypothèse de normalité. Le logarithme ou la racine carrée ne sont pas des transformations envisageables pour cette variable. Cependant, le kurtosis et le skewness de la testostérone libre étant proches de zéro[1], sa distribution a été considérée comme normale. La distribution de la SHBG est concentrée sur la gauche avec une queue de distribution étalée sur la droite. Pour la normaliser, la transformation logarithmique est nécessaire (test de Shapiro-Wilk p=0.62). De la même manière, l'estradiol a été log-transformé.

[1] Dans le cadre de l'utilisation de ces paramètres à l'aide du logiciel SAS.

Tableau 3: Caractéristiques générales des hommes de la cohorte 3C et des hommes inclus dans la sous-cohorte

	Cohorte entière n=3444	**Sous-cohorte** n=495
	moyenne (ET) ou n (%)	moyenne (ET) ou n (%)
Âge, années	74.0 (5.5)	73.9 (5.4)
IMC, kg/m²	26.2 (3.4)	26.1 (3.2)
Centre		
Bordeaux	734 (21.3)	107 (21.6)
Dijon	1775 (51.5)	253 (51.1)
Montpellier	935 (27.2)	135 (27.3)
Niveau éducation		
Primaire	1001 (29.1)	135 (27.3)
Secondaire et CAP/BEP	896 (26.0)	141 (28.6)
Bac et université	1544 (44.9)	218 (44.1)
Mode de vie		
Seul	493 (14.3)	61 (12.4)
Cohabitation	2946 (85.7)	432 (87.6)
Revenus		
< 1500 €/mois	695 (21.1)	96 (20.3)
≥ 1500 €/mois	2599 (78.9)	377 (79.7)
Obésité	427 (12.5)	54 (10.9)
Consommation tabagique		
Jamais	1043 (31.5)	149 (31.2)
< 20 paquets-années	1137 (34.3)	164 (34.4)
≥ 20 paquets-années	1131 (34.2)	164 (34.4)
Diabète	454 (13.2)	58 (11.7)
Hypertension artérielle	2816 (81.8)	390 (78.8)
Hypercholestérolémie	1569 (45.6)	215 (43.4)
Maladies prévalentes		
AVC	198 (5.8)	27 (5.5)
Démence	75 (2.2)	11 (2.2)
Infarctus du myocarde	298 (8.7)	36 (7.3)

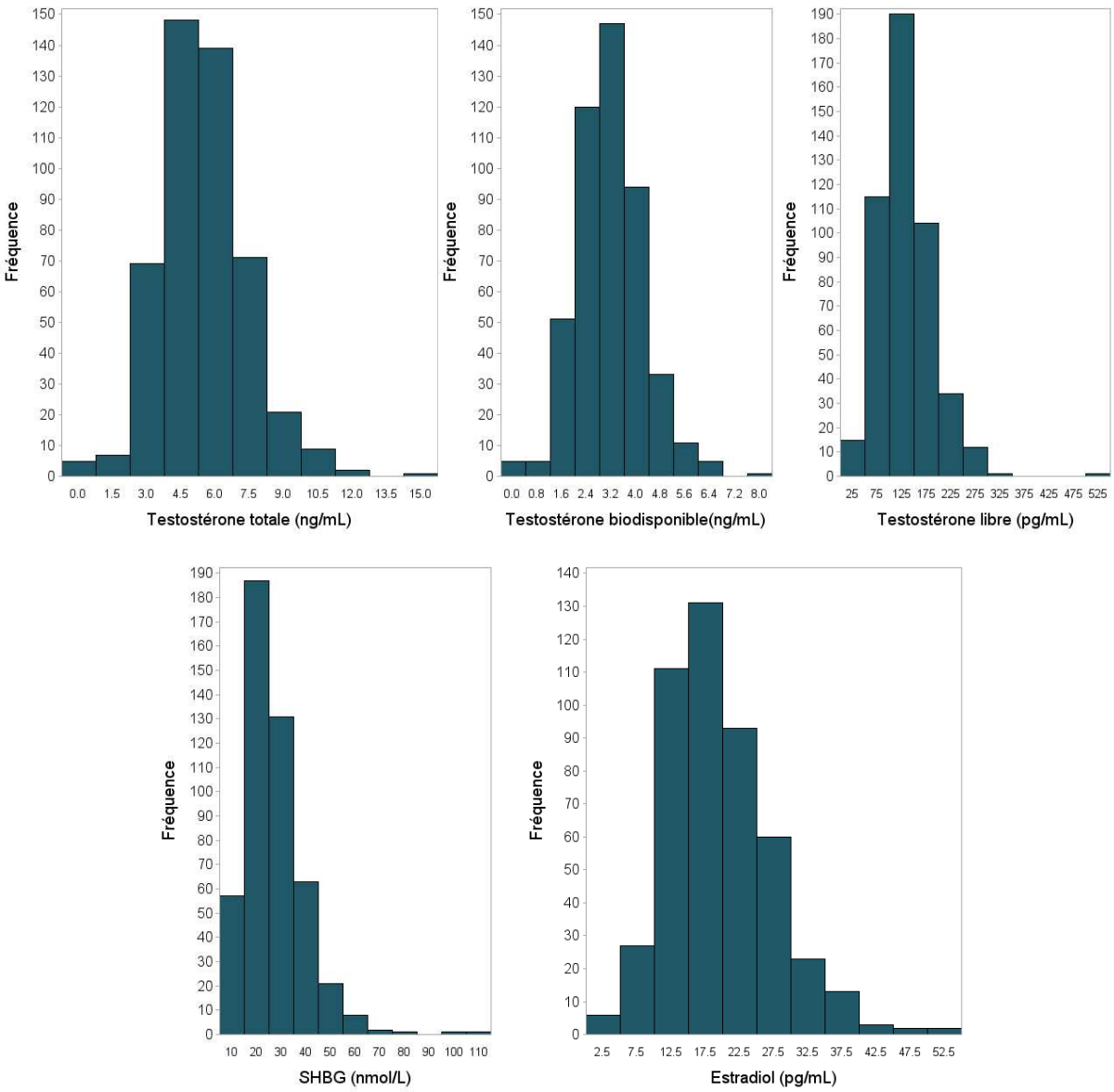


Figure 8: Distribution des hormones sexuelles endogènes

Les moyennes arithmétiques (écart-types) des hormones dans cet échantillon sont respectivement 5.5 (1.9) ng/mL pour la testostérone totale, 3.2 (1.1) ng/mL pour la testostérone biodisponible, 0.13 (0.05) ng/mL pour la testostérone libre, 26.9 (12.4) nmol/L pour la SHBG et 19.6 (8.0) pg/mL pour l'estradiol.

Les moyennes de testostérone, de SHBG et d'estradiol sont présentées selon le centre de recrutement dans le Tableau 4. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les niveaux de testostérone totale et biodisponible selon le centre, ainsi que les niveaux d'estradiol (p=0.83). Les niveaux de SHBG sont significativement différents selon le

centre (29.4 (21.7-38.0), 23.0 (17.2-30.3) et 24.3 (17.8-31.9) respectivement pour Bordeaux, Dijon et Montpellier. Les niveaux sont plus élevés à Bordeaux. Les niveaux de testostérone libre sont calculés à partir des niveaux de SHBG, on retrouve également une différence significative entre les taux de testostérone libre selon le centre d'étude. Les taux de testostérone libre sont diminués dans le centre bordelais.

Tableau 4: Moyennes[1] des hormones sexuelles selon le centre de recrutement

	Total n=472	**Bordeaux** n=97	**Dijon** n=245	**Montpellier** n=130	*p*
Testostérone totale (ng/mL)	5.5 (1.9)	5.1 (1.8)	5.6 (2.0)	5.5 (2.0)	*0.08*
Testostérone biodisponible (ng/mL)	3.2 (1.1)	3.0 (1.0)	3.3(1.1)	3.1 (1.1)	*0.06*
Testostérone libre (ng/mL)	0.13 (0.05)	0.11 (0.04)	0.14 (0.06)	0.13 (0.05)	*<0.01*
SHBG (nmol/L)	24.6 (18.1;32.9)	29.4 (21.7;38.0)	23.0 (17.2;30.3)	24.3 (17.8;31.9)	*<0.01*
Estradiol (pg/mL)	17.9 (13.9;24.0)	18.4 (15.0;23.8)	17.9 (13.3;24.5)	17.7 (13.8;23.0)	*0.82*

[1] Moyenne arithmétique (écart-type) pour la testostérone et moyenne géométrique (intervalle interquartile) pour la SHBG et l'estradiol

Aucune différence saisonnière significative n'a été détectée entre les niveaux de testostérone, en effet ceux-ci ne diffèrent pas selon la date du prélèvement sanguin.

Les coefficients de corrélation partielle (ajustés sur l'âge et le centre) entre les différentes hormones sexuelles sont présentés dans le Tableau 5. Les coefficients de corrélation sans ajustement sont similaires. On retrouve une forte corrélation positive et significative entre les différentes fractions de la testostérone. La testostérone totale et biodisponible sont corrélées positivement et significativement à la SHBG (r=0.43, p<.0001 et r=0.29, p<.0001 respectivement). Enfin, l'estradiol est positivement corrélée aux différentes formes de la testostérone.

Tableau 5: Corrélation de Pearson entre les hormones sexuelles endogènes ajustée sur l'âge et le centre

	Testostérone totale	Testostérone biodisponible	Testostérone libre	SHBG	Estradiol
Testostérone totale	1				
Testostérone biodisponible	0.91***	1			
Testostérone libre	0.82***	0.80***	1		
SHBG	0.43***	0.29***	-0.07	1	
Estradiol	0.45***	0.39***	0.45***	0.07	1

* p<0.05, **p<0.01, *** p<.0001

Le Tableau 6 montre la comparaison des moyennes (ajustées sur l'âge et le centre) des taux d'hormones sexuelles endogènes selon la présence ou l'absence d'une maladie (26 AVC, 11 démences et 33 infarctus du myocarde) à l'inclusion chez les hommes de la sous-cohorte (n=472). Les hommes avec un antécédent d'AVC ont des niveaux de testostérone totale et d'estradiol significativement plus faible que les hommes ne présentant pas d'AVC à l'inclusion, avant et après prise en compte de l'âge (4.7 vs 5.5 ng/mL, p=0.03 et 15.0 vs 18.1 pg/mL, p=0.03, respectivement). Les niveaux de testostérone biodisponible et de SHBG sont également plus bas (non significatif, borderline), chez les hommes avec des antécédents d'AVC. Aucune différence significative n'a été détectée entre les taux moyens des hormones sexuelles chez les hommes « sains » et chez les hommes présentant une démence ou ayant eu un infarctus du myocarde à l'inclusion.

Tableau 6: Moyennes des hormones sexuelles endogènes par type de maladies prévalentes dans la sous-cohorte 3C des hommes (n=472)

	Non cas moyenne (Q1-Q3)[a]	Cas prévalents moyenne (Q1-Q3)[a]	*p* [b]
AVC	n=438	n=26	
Testostérone totale (ng/mL)	5.5 (4.2-6.6)	4.7 (3.8-5.7)	***0.03***
Testostérone biodisponible (ng/mL)	3.2 (2.5-3.9)	2.8 (2.2-3.3)	*0.05*
Testostérone libre (ng/mL)	0.13 (0.10-0.16)	0.12 (0.09-0.14)	*0.17*
SHBG (nmol/L)[c]	24.8 (18.3-33.0)	21.4 (16.4-26.4)	*0.07*
Estradiol (pg/mL)[c]	18.1 (13.9-24.3)	15.0 (12.4-19.0)	***0.03***
Démence	n=461	n=11	
Testostérone totale (ng/mL)	5.5 (4.2-6.6)	5.5 (3.9-6.7)	*0.98*
Testostérone biodisponible (ng/mL)	3.2(2.5-3.8)	3.1 (1.8-3.9)	*0.96*
Testostérone libre (ng/mL)	0.13 (0.10-0.16)	0.13 (0.09-0.14)	*0.83*
SHBG (nmol/L)[c]	24.5 (18.1-32.9)	27.2 (26.4-32.9)	*0.41*
Estradiol (pg/mL)[c]	18.1 (14.0-24.1)	14.3 (9.1-20.2)	*0.08*
Infarctus du myocarde	n=439	n=33	
Testostérone totale (ng/mL)	5.5 (4.2-6.6)	5.6 (4.5-6.4)	*0.61*
Testostérone biodisponible (ng/mL)	3.2 (2.5-3.8)	3.2 (2.9-3.9)	*0.63*
Testostérone libre (ng/mL)	0.13 (0.10-0.16)	0.13 (0.11-0.16)	*0.85*
SHBG (nmol/L)[c]	24.6 (18.3-32.8)	23.9 (16.8-33.4)	*0.67*
Estradiol (pg/mL)[c]	18.0 (14.1-24.0)	17.0 (13.2-23.7)	*0.45*

[a] Moyennes ajustées sur l'âge et le centre (intervalle interquartile).

[b] Tests de comparaison de moyennes ajustées sur l'âge et le centre.

[c] Moyennes géométriques ajustées sur l'âge et le centre (intervalle interquartile).

IV. 2. DETERMINANTS DES HORMONES SEXUELLES

Les analyses concernant les déterminants des hormones sexuelles ont été réalisées à partir de l'échantillon des hommes de la sous-cohorte et après les exclusions vues précédemment (n=472).

IV. 2.1. Déterminants de la testostérone

Le Tableau 7 présente les associations brutes entre les différentes formes de la testostérone et les caractéristiques générales des hommes. Dans notre étude, les niveaux de testostérone sont plus faibles chez les hommes de plus de 73 ans. Cette association entre l'âge et les niveaux de testostérone est significative pour les fractions biodisponibles et libres. L'âge et la testostérone sont négativement corrélés ($r=-0.10$, $p=0.03$ pour la totale ; $r=-0.17$ $p<0.01$ pour la biodisponible et $r=-0.18$ $p<0.001$ pour la libre). Les hommes diabétiques ont des taux de testostérone significativement plus bas que les hommes non diabétiques. Une relation inverse et significative entre l'obésité et les niveaux de testostérone a été retrouvée. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre la testostérone et l'hypertension ou l'hypercholestérolémie.

Le Tableau 8 présente les associations brutes entre la testostérone et les paramètres biologiques. Les niveaux de testostérone ne sont pas significativement différents selon le statut inflammatoire, estimé par les niveaux de la CRP (<2 mg/L ou ≥2 mg/L). Plus les hommes ont un niveau de HDL-cholestérol élevé plus les niveaux de testostérone sont significativement augmenté. Les triglycérides sont significativement et inversement liés aux niveaux de testostérone.

Tableau 7: Associations brutes entre les différentes formes de la testostérone et les caractéristiques générales des hommes de la sous-cohorte 3C (n=472).

		Testostérone totale (ng/mL) moyenne (ET)	Testostérone biodisponible (ng/mL) moyenne (ET)	Testostérone libre (ng/mL) moyenne (ET)
Âge, années				
≤ 73 ans	n= 250	5.6 (2.0)	3.3 (1.1)	0.14 (0.06)
> 73 ans	n= 222	5.4 (1.9)	3.0 (1.0)	0.12 (0.05)
	p	*0.19*	***<0.01***	***<0.01***
Obésité				
Poids normal	n= 174	5.9 (2.2)	3.4 (1.1)	0.14 (0.06)
Surcharge pondérale	n= 244	5.3 (1.7)	3.1 (1.0)	0.13 (0.05)
Obésité	n= 52	4.9 (2.0)	2.8 (1.1)	0.12 (0.06)
	p	***<0.01****	***<0.01****	***0.02****
Consommation tabagique				
Jamais	n= 146	5.5 (2.0)	3.2 (1.1)	0.14 (0.05)
< 20 paquets-années	n= 153	5.4 (2.0)	3.1 (1.0)	0.13 (0.05)
≥ 20 paquets-années	n= 156	5.6 (1.9)	3.2 (1.1)	0.13 (0.06)
	p	*0.91**	*0.94**	*0.88**
Diabète				
Non	n= 418	5.6 (2.0)	3.2 (1.1)	0.14 (0.05)
Oui	n= 53	4.5 (1.5)	2.6 (0.9)	0.11 (0.04)
	p	***<0.01***	***<0.01***	***<0.01***
Hypertension artérielle				
Non	n= 103	5.5 (2.1)	3.2 (1.1)	0.14 (0.06)
Oui	n= 369	5.5 (1.9)	3.2 (1.1)	0.13 (0.05)
	p	*0.75*	*0.69*	*0.13*
Hypercholestérolémie				
Non	n= 268	5.5 (2.0)	3.2 (1.1)	0.13 (0.05)
Oui	n= 204	5.5 (1.9)	3.2 (1.0)	0.13 (0.05)
	p	*0.69*	*0.80*	*0.93*
Pression artérielle systolique, mmHg				
Q1: ≤ 134.5	n= 118	5.6 (2.0)	3.2 (1.0)	0.14 (0.05)
Q2: entre 134.5 et 149.5	n= 118	5.7 (2.1)	3.3 (1.2)	0.13 (0.07)
Q3: entre 149.5 et 163.0	n= 118	5.4 (1.9)	3.1 (1.0)	0.13 (0.05)
Q4: > 163.0	n= 118	5.3 (1.8)	3.1 (1.0)	0.13 (0.05)
	p	*0.23**	*0.44**	*0.37**
Pression artérielle diastolique, mmHg				
Q1: ≤ 75.0	n= 118	5.5 (2.0)	3.1 (1.1)	0.13 (0.05)
Q2: entre 75.0 et 83.0	n= 118	5.7 (1.9)	3.3 (1.0)	0.13 (0.05)
Q3: entre 83.0 et 89.5	n= 118	5.4 (2.0)	3.1 (1.1)	0.13 (0.06)
Q4: > 89.5	n= 118	5.3 (1.9)	3.1 (1.1)	0.13 (0.05)
	p	*0.28**	*0.55**	*0.66**

* Test de tendance linéaire

Tableau 8: Associations brutes entre les différentes formes de la testostérone et les paramètres biologiques dans la sous-cohorte 3C (n=472 hommes).

		Testostérone totale (ng/mL) moyenne (ET)	Testostérone biodisponible (ng/mL) moyenne (ET)	Testostérone libre (ng/mL) moyenne (ET)
Cholestérol total, mmol/L				
Q1: ≤ 5.00	n= 118	5.4 (1.9)	3.1 (1.0)	0.13 (0.05)
Q2: entre 5.00 et 5.56	n= 118	5.3 (1.9)	3.1 (1.1)	0.13 (0.05)
Q3: entre 5.56 et 6.09	n= 118	5.8 (2.1)	3.4 (1.2)	0.14 (0.06)
Q4: > 6.09	n= 118	5.4 (1.8)	3.2 (1.1)	0.13 (0.05)
	p	*0.40**	*0.25**	*0.44**
LDL-cholestérol, mmol/L				
Q1: ≤ 3.04	n= 118	5.4 (2.1)	3.1 (1.1)	0.13 (0.05)
Q2: entre 5.00 et 5.56	n= 117	5.6 (2.2)	3.2 (1.2)	0.14 (0.06)
Q3: entre 5.56 et 6.09	n= 117	5.5 (1.7)	3.3 (1.0)	0.13 (0.05)
Q4: > 6.09	n= 117	5.4 (1.8)	3.1 (1.0)	0.13 (0.05)
	p	*0.84**	*0.74**	*0.94**
HDL-cholestérol, mmol/L				
Q1: ≤ 1.21	n= 118	4.9 (1.7)	2.9 (1.0)	0.12 (0.05)
Q2: entre 1.21 et 1.40	n= 118	5.5 (1.8)	3.2 (1.0)	0.14 (0.05)
Q3: entre 1.40 et 1.62	n= 118	5.6 (1.9)	3.2 (1.0)	0.14 (0.05)
Q4: > 1.62	n= 118	5.9 (2.3)	3.4 (1.2)	0.14 (0.06)
	p	***<0.01****	***<0.01****	***0.01****
Triglycérides, mmol/L				
Q1: ≤ 0.86	n= 118	6.0 (2.2)	3.4 (1.2)	0.14 (0.07)
Q2: entre 0.86 et 1.11	n= 118	5.5 (1.8)	3.1 (0.9)	0.13 (0.04)
Q3: entre 1.11 et 1.52	n= 118	5.4 (1.7)	3.1 (1.0)	0.13 (0.05)
Q4: > 1.52	n= 118	5.1 (1.9)	2.9 (1.1)	0.13 (0.05)
	p	***<0.01****	***<0.01****	***0.03****
Inflammation: CRP, mg/L				
< 2 mg/L	n= 220	5.6 (2.1)	3.2 (1.2)	0.13 (0.06)
≥ 2 mg/L	n= 251	5.4 (1.8)	3.1 (1.0)	0.13 (0.05)
	p	*0.44*	*0.41*	*0.94*

* Test de tendance linéaire

Les résultats des régressions multivariées de chaque forme de testostérone sont présentés dans le Tableau 9. L'âge et le diabète ont été trouvés comme déterminants indépendants de chacune des formes de testostérone. Ces deux facteurs expliquent environ 5.6% de la variabilité de la testostérone libre. Aucun autre facteur n'intervient comme déterminant indépendant pour cette forme. L'IMC apparaît comme un paramètre indépendant de la testostérone totale et explique 2.3% de sa variabilité. L'âge et le HDL-cholestérol expliquent respectivement 0.8% et 1.6% de la variabilité de la testostérone totale. L'âge, l'IMC et le HDL-cholestérol sont également des déterminants indépendants de la testostérone biodisponible et expliquent 2.7%, 1.3% et 1.5% respectivement de sa variabilité.

Tableau 9: Analyses multivariées des déterminants des différentes fractions de testostérone

	β * standardisé	**IC (95%)**	***p***	**R^2 partiel**
Testostérone totale (ng/mL)				
Diabète	-0.159	(-0.247;-0.071)	*< 0.01*	2.5%
IMC	-0.151	(-0.241;-0.061)	*< 0.01*	2.3%
HDL-cholestérol	0.125	(0.035;0.215)	*0.01*	1.6%
Âge	-0.087	(-0.174;-0.003)	*0.04*	0.8%
		% de variance expliquée		7.2%
Testostérone biodisponible (ng/mL)				
Âge	-0.164	(-0.251;-0.077)	*< 0.01*	2.7%
Diabète	-0.154	(-0.242;-0.066)	*< 0.01*	2.4%
HDL-cholestérol	0.120	(0.027;0.207)	*0.01*	1.5%
IMC	-0.113	(-0.203;-0.023)	*0.01*	1.3%
		% de variance expliquée		7.9%
Testostérone libre (ng/mL)				
Âge	-0.182	(-0.268;-0.096)	*< 0.01*	3.3%
Diabète	-0.153	(-0.239;-0.067)	*< 0.01*	2.3%
		% de variance expliquée		5.6%

* Variation d'un écart-type de la variable s'accompagne d'une variation de β écart-type de testostérone (totale, biodisponible et libre, respectivement)

IV. 2.2. Déterminants de la SHBG et de l'estradiol

Le Tableau 10 présente les niveaux moyens de SHBG et d'estradiol en fonction des caractéristiques générales des hommes. Les niveaux de SHBG augmentent significativement avec l'âge ($p<0.01$) et diminuent significativement avec l'IMC ($p<0.01$). Bien que non significative, on retrouve une diminution du taux de SHBG chez les hommes diabétiques par rapport aux hommes non diabétiques. Les niveaux d'estradiol chez les hommes sont significativement plus faibles chez les diabétiques et chez les hypercholestérolémiques.

Le Tableau 11 présente les taux moyens de SHBG et d'estradiol selon les quartiles des paramètres biologiques. Les niveaux de SHBG augmentent significativement avec le taux de HDL-cholestérol (p de tendance linéaire $p=0.02$), tandis qu'ils diminuent avec les niveaux de triglycérides (p de tendance linéaire $p<0.01$). Les taux moyens de SHBG sont différents selon le quartile de pression artérielle systolique mais aucune tendance linéaire n'a été mise en évidence.

Les hommes avec un niveau de CRP ≥2 mg/mL ont des taux d'estradiol significativement plus élevés que les hommes avec un niveau de CRP <2 mg/mL. Aucune tendance linéaire significative entre l'estradiol et le cholestérol n'a été détecté mais les niveaux d'estradiol sont différents selon le quartile de cholestérol total.

Tableau 10: Associations brutes entre la SHBG, l'estradiol et les caractéristiques générales des hommes de la sous-cohorte 3C (n=472).

		SHBG (nmol/L) moyenne (ET)	Estradiol (pg/mL) moyenne (ET)
Âge, années			
≤ 73 ans	n= 250	23.0 (17.4-28.7)	17.7 (13.9-23.5)
> 73 ans	n= 222	26.5 (19.9-36.0)	18.2 (13.9-25.0)
	p	***<0.01***	*0.46*
Obésité			
Poids normal	n= 174	26.2 (17.9-35.3)	17.9 (13.1-24.0)
Surcharge pondérale	n= 244	23.9 (18.4-32.4)	17.9 (14.1-23.4)
Obésité	n= 52	22.6 (17.2-28.1)	18.2 (15.0-26.3)
	p	***<0.01****	*0.89**
Consommation tabagique			
Jamais	n= 146	24.3 (18.4-32.8)	18.1 (13.8-23.9)
< 20 paquets-années	n= 153	23.7 (17.1-31.4)	17.7 (13.5-23.6)
≥ 20 paquets-années	n= 156	25.2 (19.4-32.6)	17.7 (14.1-24.3)
	p	*0.44**	*0.64**
Diabète			
Non	n= 418	24.8 (18.4-33.2)	18.3 (14.4-24.0)
Oui	n= 53	22.6 (16.5-29.4)	15.5 (11.7-22.3)
	p	*0.13*	***<0.01***
Hypertension artérielle			
Non	n= 103	23.1 (17.5-30.5)	17.1 (13.1-23.2)
Oui	n= 369	25.0 (18.8-33.0)	18.2 (14.4-24.2)
	p	*0.08*	*0.18*
Hypercholestérolémie			
Non	n= 268	24.6 (18.3-32.4)	18.6 (14.3-24.8)
Oui	n= 204	24.5 (17.8-33.8)	17.1 (13.7-22.9)
	p	*0.94*	***0.04***
Pression artérielle systolique, mmHg			
Q1: ≤ 134.5	n= 118	23.5 (18.1-30.6)	16.6 (13.2-20.7)
Q2: entre 134.5 et 149.5	n= 118	27.1 (19.5-38.1)	18.5 (14.9-24.2)
Q3: entre 149.5 et 163.0	n= 118	24.5 (17.8-32.1)	18.4 (14.3-24.3)
Q4: > 163.0	n= 118	23.4 (17.2-32.0)	18.4 (14.3-25.0)
	p	***0.03***	*0.08**
Pression artérielle diastolique, mmHg			
Q1: ≤ 75.0	n= 118	24.7 (19.5-31.9)	16.4 (12.9-21.1)
Q2: entre 75.0 et 83.0	n= 118	25.9 (18.9-35.4)	19.0 (14.3-26.0)
Q3: entre 83.0 et 89.5	n= 118	24.3 (18.2-31.1)	18.0 (14.9-24.3)
Q4: > 89.5	n= 118	23.5 (16.9-32.5)	18.5 (13.8-24.7)
	p	*0.24**	*0.08**

* Test de tendance linéaire

Tableau 11: Associations brutes entre la SHBG, l'estradiol et les paramètres biologiques chez les hommes de la sous-cohorte 3C (n=472).

		SHBG (nmol/L) moyenne (ET)	**Estradiol** (pg/mL) moyenne (ET)
Cholestérol total, mmol/L			
Q1: ≤ 5.00	n= 118	25.1 (19.0-32.5)	18.7 (14.4-24.2)
Q2: entre 5.00 et 5.56	n= 118	24.2 (16.7-33.0)	16.5 (12.8-21.2)
Q3: entre 5.56 et 6.09	n= 118	24.3 (18.3-32.8)	19.1 (14.9-25.6)
Q4: > 6.09	n= 118	24.7 (17.8-33.0)	17.6 (13.9-23.5)
	p	*0.84**	***0.04***
LDL-cholestérol, mmol/L			
Q1: ≤ 3.04	n= 118	25.5 (19.0-32.9)	18.6 (14.4-24.2)
Q2: entre 5.00 et 5.56	n= 117	23.9 (18.3-33.6)	17.8 (14.6-22.4)
Q3: entre 5.56 et 6.09	n= 117	24.5 (17.4-32.6)	17.2 (12.7-24.8)
Q4: > 6.09	n= 117	24.4 (17.8-31.9)	18.2 (14.5-24.1)
	p	*0.52**	*0.57**
HDL-cholestérol, mmol/L			
Q1: ≤ 1.21	n= 118	23.3 (17.2-30.9)	18.9 (15.0-25.2)
Q2: entre 1.21 et 1.40	n= 118	24.2 (18.5-31.0)	17.6 (14.2-23.8)
Q3: entre 1.40 et 1.62	n= 118	24.4 (17.2-34.6)	17.5 (13.9-23.3)
Q4: > 1.62	n= 118	26.6 (21.0-33.6)	17.7 (13.1-24.1)
	p	***0.02****	*0.23**
Triglycérides, mmol/L			
Q1: ≤ 0.86	n= 118	26.7 (19.7-34.9)	17.3 (12.8-24.5)
Q2: entre 0.86 et 1.11	n= 118	24.9 (19.7-32.4)	18.2 (14.8-22.3)
Q3: entre 1.11 et 1.52	n= 118	24.6 (17.8-31.9)	18.7 (14.5-25.9)
Q4: > 1.52	n= 118	22.2 (16.1-30.1)	17.7 (14.5-23.7)
	p	***<0.01****	*0.57**
Inflammation: CRP, mg/L			
< 2 mg/L	n= 220	25.2 (19.0-33.5)	16.4 (12.2-21.6)
≥ 2 mg/L	n= 251	23.9 (17.4-31.8)	19.3 (15.4-25.7)
	p	*0.18*	***< 0.01***

* Test de tendance linéaire

Le Tableau 12 présente les déterminants indépendants de la SHBG. L'âge et l'IMC expliquaient respectivement 3.4% et 3.1% de la variabilité des niveaux de SHBG. L'hypertension et les triglycérides étaient également indépendamment associés à la SHBG. Environ 8.6% de la variabilité de la SHBG était expliquée par ces 4 variables.

Tableau 12: Analyse multivariée des déterminants de la SHBG

	β * standardisé	**IC (95%)**	***p***	**R^2 partiel**
SHBG (nmol/L)				
Âge	0.185	(0.099;0.271)	*< 0.01*	3.4%
IMC	-0.176	(-0.265;-0.087)	*< 0.01*	3.1%
Triglycérides	-0.107	(-0.194;-0.019)	*0.02*	1.1%
HTA	0.102	(0.014;0.189)	*0.02*	1.0%
		% de variance expliquée		8.6%

* Variation d'un écart-type de la variable s'accompagne d'une variation de β écart-type du log de SHBG

On retrouve les mêmes facteurs indépendants si on ne prend pas en compte les cas prévalents de maladies coronaires et d'AVC dans ces analyses multivariées.

Le Tableau 13 donne les facteurs indépendants de l'estradiol. La CRP, le diabète, la pression artérielle diastolique et l'hypercholestérolémie sont les facteurs indépendants associés aux niveaux d'estradiol. Ils expliquent 8.8% environ de sa variabilité, dont 5.4% expliqué par la CRP.

Tableau 13: Analyse multivariée des déterminants de l'estradiol

	β * standardisé	IC (95%)	*p*	R^2 partiel
Estradiol (pg/mL)				
CRP	0.227	(0.140;0.315)	*< 0.01*	5.4%
Diabète	-0.112	(-0.199;-0.024)	*0.01*	1.3%
Pression artérielle diastolique	0.103	(0.016;0.190)	*0.02*	1.1%
Hypercholestérolémie	-0.099	(-0.186;-0.011)	*0.03*	1.0%
		% de variance expliquée		8.8%

* Variation d'un écart-type de la variable s'accompagne d'une variation de β écart-type du log de l'estradiol

Lorsque les hommes avec des antécédents de maladies artérielles ischémiques sont exclus de l'échantillon, le diabète n'est plus un facteur indépendant de l'estradiol. Les trois autres facteurs expliquent dans cette régression multivariée environ 8,0% de la variation de l'estradiol.

IV. 3. TESTOSTERONE ET ATHEROME CAROTIDIEN

Dans cette partie, les analyses ont été réalisées à partir de l'échantillon des hommes appartenant à la sous-cohorte. Comme annoncée dans la partie méthode (III. 4.3), les analyses portent sur les sujets avec les données carotidiennes complètes, soit un échantillon de 354 hommes.

IV. 3.1. Caractéristiques générales

Le Tableau 14 présente les principales caractéristiques des hommes selon la présence de plaques d'athérome carotidien.

Les hommes sont âgés en moyenne de 73 ans (65 ans à 85 ans), 75,1% d'entre eux sont hypertendus et 11.9% souffrent de diabète. Parmi les hommes hypercholestérolémiques (41,2%), 57.5% utilisent des hypolipidémiants dont 52.4% correspondent aux

inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (statines). Les hommes ont en moyenne une EIM d'environ 0.72 mm et environ 52% d'entre eux présentent au moins une ou plusieurs plaques d'athérome carotidien. Les moyennes (écarts-types) de testostérone sont respectivement de 5.6 (2.0) ng/mL pour la fraction totale, 3.2 (1.1) ng/mL pour la biodisponible et 0.14 (0.05) ng/mL pour la libre. Les moyennes géométriques de la SHBG et de l'estradiol sont de 24.3 nmol/L et 18.6 pg/mL respectivement.

Les hommes avec des plaques d'athérome sont en moyenne plus âgés (72.2 vs 74.6 ans, $p<0.01$), ont une EIM plus élevée (0.76 vs 0.70 mm, $p<0.01$), un WHR plus élevé et une consommation de paquets-années (≥ 20 paquet-années) plus importante (29% vs 14%, $p<0.01$) que les hommes sans plaques d'athérome. L'hypercholestérolémie et l'hypertension sont également plus fréquentes chez les hommes avec des plaques d'athérome (53% vs 29%, $p<0.01$ et 82% vs 69%, $p<0.01$ respectivement). Aucune association entre la présence de plaque et l'obésité ou encore le diabète n'ont été mises en évidence. Le nombre de cas prévalents de maladie coronaire ou d'AVC est plus important chez les hommes avec des plaques d'athérome (18% vs 5%, $p<0.01$ et 8.2% vs 3.5% $p=0.06$ respectivement). Les moyennes brutes des hormones sexuelles endogènes ne sont pas significativement différentes selon l'absence ou la présence de plaques d'athérome.

Tableau 14: Caractéristiques des hommes de la sous-cohorte 3C avec des données carotidiennes selon la présence de plaques d'athérome.

	Sous-cohorte 3C n=354* hommes	**Absence de plaques d'athérome** n=171	**Présence de plaques d'athérome** n=183	
	moy (ET) ou moy géom (Q1-Q3) ou n (%)	moy¥ (Q1-Q3) ou n (%)	moy¥ (Q1-Q3) ou n (%)	$p^{£}$
Âge, années	73.4 (5.1)	72.2 (68.0-76.0)	74.6 (71.0-79.0)	*<0.01*
IMC, kg/m²	26.1 (3.2)	26.1 (23.9-27.8)	26.1 (23.8-28.3)	*0.86*
WHR	0.95 (0.06)	0.94 (0.90-0.98)	0.96 (0.92-1.00)	*0.02*
Lipids, mmol/L				
Cholestérol total	5.58 (0.88)	5.47 (5.07-5.97)	5.68 (4.99-6.24)	*0.03*
HDL-cholestérol	1.41 (1.20-1.62)	1.41 (1.19-1.66)	1.41 (1.22-1.60)	*0.95*
LDL-cholestérol	3.57 (0.77)	3.48 (3.03-3.94)	3.65 (3.05-4.11)	*0.04*
Triglycérides	1.17 (0.88-1.54)	1.15 (0.86-1.57)	1.19 (0.9-1.54)	*0.45*
Consommation tabagique				
Jamais	115 (33.5)	65 (38.0)	50 (27.3)	
< 20 paquets-années	113 (33.0)	59 (34.5)	54 (29.5)	
≥ 20 paquets-années	115 (33.5)	44 (25.7)	71 (38.8)	*0.01*
Antécédents médicaux				
Hypertension artérielle	266 (75.1)	117 (68.4)	149 (81.4)	*<0.01*
Diabète	41 (11.6)	16 (9.4)	25 (13.7)	*0.24*
Hypercholestérolémie	146 (41.2)	50 (29.2)	96 (52.5)	*<0.01*
Maladies coronaires	41 (11.6)	8 (4.7)	33 (18.0)	*<0.01*
AVC	21 (6.1)	6 (3.6)	15 (8.3)	*0.06*
Démence	8 (2.3)	2 (1.2)	6 (3.4)	*0.33*
Hormones sexuelles endogènes				
Testostérone totale (ng/mL)	5.6 (2.0)	5.5 (4.2-6.6)	5.6 (4.4-6.8)	*0.58*
Testostérone biodisponible (ng/mL)	3.2 (1.1)	3.2 (2.5-3.8)	3.2 (2.5-4.0)	*0.87*
Testostérone libre (ng/mL)	0.14 (0.05)	0.13 (0.10-0.16)	0.14 (0.10-0.17)	*0.33*
SHBG (nmol/L)	24.3 (17.9-31.9)	24.5 (18.1-29.8)	24.1 (17.8-33.9)	*0.73*
Estradiol (pg/mL)	18.6 (14.7-24.3)	18.7 (14.3-24.2)	18.6 (14.7-25.4)	*0.85*
Marqueurs carotidiens				
EIM, mm	0.72 (0.63-0.82)	0.70 (0.61-0.77)	0.74 (0.64-0.85)	*0.01*
Présence de plaques d'athérome	183 (51.7)	-	-	-
Inflammation				
CRP	2.4 (1.2-4.2)	2.2 (1.1-4.0)	2.5 (1.2-4.3)	*0.29*

* Données manquantes: IMC (n=1), WHR (n=11), LDL-cholesrérol (n=3), consommation tabagique (n=11), AVC (n=7), CRP (n=1)

¥ Moyennes ajustées sur l'âge et le centre et intervalle inter-quartile (Q1-Q3)

£ P-valeur des tests de comparaison de moyennes (test de Student) ou de comparaison de pourcentages (Chi-deux)

La distribution de l'EIM est présentée Figure 9. L'histogramme présente une légère asymétrie avec une accumulation des valeurs sur la gauche. L'EIM a donc été log-transformée pour la normaliser (Test Shapiro-Wilk p>0.05).

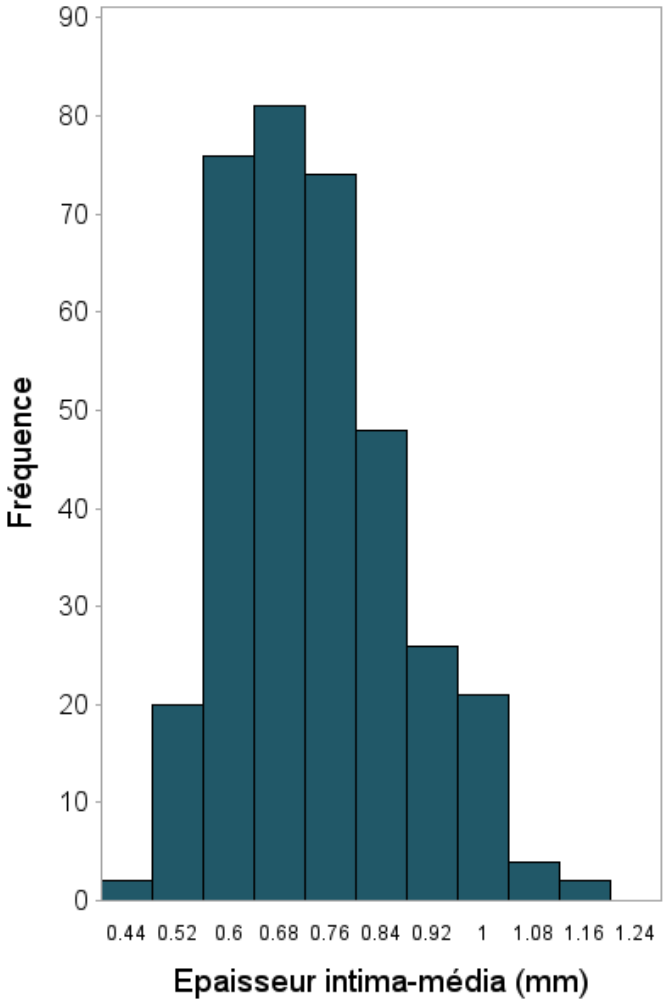


Figure 9: Distribution de l'épaisseur intima-média (N=354 hommes)

Le Tableau 15 donne les coefficients de corrélation de Pearson, ajustés sur l'âge et le centre, entre l'EIM ou la CRP et d'autres paramètres, dont les hormones sexuelles endogènes. L'EIM est corrélé positivement à l'âge (r=0.35, p<.0001), la CRP (r=0.09, p=0.09) et l'IMC (r=0.09, p=0.10). La CRP est significativement corrélé à l'estradiol (r=0.25, p<.0001) et l'IMC (r=-0.20, p<.0001). Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la CRP et la testostérone (r=-0.05, p=0.32 pour la forme totale, r=-0.07, p=0.20 pour la forme biodisponible et r=0.01, p=0.98 pour la forme libre).

Tableau 15: Coefficients de corrélation ajustés sur l'âge et le centre entre l'épaisseur intima-média, la CRP et d'autres paramètres

	Epaisseur intima-média	CRP
Epaisseur intima-média	1	-
CRP	0.09	1
Âge[1]	0.35***	0.06
IMC	0.09	-0.20***
Testostérone totale	-0.12*	-0.05
Testostérone biodisponible	-0.11*	-0.07
Testostérone libre	-0.10	0.01
SHBG	-0.04	-0.05
Estradiol	-0.09	0.25***

[1] Coefficients de corrélation ajustés sur le centre

* p<0.05, **p<0.01, *** p<.0001

IV. 3.2. Hormones sexuelles et marqueurs d'athérome carotidien

Le Tableau 16 présente les coefficients de la régression linéaire des hormones sexuelles endogènes selon la présence de plaques d'athérome carotidien. Les niveaux moyens des hormones sexuelles endogènes ne diffèrent pas statistiquement selon la présence ou l'absence de plaques d'athérome carotidien, même après prise en compte de l'âge et des autres facteurs de risque traditionnels.

Tableau 16: Relation entre les hormones sexuelles et la présence de plaques d'athérome carotidien

	Plaques d'athérome carotidien			
	Modèle 1		Modèle 2	
Hormones sexuelles	β* (95% CI)	*p*	β* (95% CI)	*p*
Testostérone totale (ng/mL)	0.094 (-0.351:0.540)	*0.68*	0.182 (-0.301;0.665)	*0.46*
Testostérone biodisponible (ng/mL)	-0.023 (-0.275;0.229)	*0.86*	0.045 (-0.229;0.320)	*0.74*
Testostérone libre (ng/mL)	0.005 (-0.007;0.016)	*0.42*	0.010 (-0.003;0.023)	*0.12*
SHBG (nmol/L)	-0.011 (-0.098;0.076)	*0.80*	-0.026 (-0.121;0.068)	*0.53*
Estradiol (pg/mL)	-0.011 (-0.102;0.080)	*0.81*	0.040 (-0.060;0.140)	*0.43*

Modèle 1 (n=354), ajustement sur l'âge et le centre.
Modèle 2 (n=337), ajustement sur l'âge, le centre, l'IMC, la pression artérielle, le diabète, l'hypercholestérolémie, la consommation tabagique et les maladies prévalentes.
* Différence entre les niveaux moyens des hormones sexuelles selon la présence de plaques

Le Tableau 17 donne les coefficients de la régression linéaire de l'épaisseur intima-média en fonction des hormones sexuelles endogènes. Les formes « totale » et « biodisponible » de la testostérone sont significativement et inversement reliées à l'épaisseur intima-média après ajustement sur l'âge et le centre (modèle 1). Le même résultat est retrouvé dans le deuxième modèle après prise en compte des ajustements du 1er modèle et de l'IMC, la pression artérielle, le diabète, l'hypercholestérolémie, la consommation tabagique et des maladies prévalentes. (β= -0.020, p=0.03 pour la forme totale et β=-0.021, p=0.02 pour la forme biodisponible). On retrouve une association similaire entre la testostérone libre et l'épaisseur intima-média (β=-0.019, p=0.04) après ajustement sur l'âge et le centre. Cette relation n'est plus significative après ajustement sur les facteurs de risques traditionnels (modèle 2). Les niveaux de SHBG ou d'estradiol ne modifient pas la moyenne de l'épaisseur intima-média, même après prise en compte des variables citées précédemment.

Tableau 17 : Coefficient de régression linéaire de l'épaisseur intima-média en fonction des hormones sexuelles endogènes

	Epaisseur intima-média			
	Modèle 1		Modèle 2	
Hormones sexuelles	β^* (95% CI)	*p*	β^* (95% CI)	*p*
Testostérone totale (ng/mL)	-0.022 (-0.039;-0.004)	*0.01*	-0.020 (-0.038;-0.002)	*0.03*
Testostérone biodisponible (ng/mL)	-0.024 (-0.036;-0.005)	*<0.01*	-0.021 (-0.040;-0.003)	*0.02*
Testostérone libre (ng/mL)	-0.019 (-0.037;-0.001)	*0.04*	-0.013 (-0.032;0.006)	*0.17*
SHBG (nmol/L)	-0.007 (-0.026;0.012)	*0.46*	-0.012 (-0.032;0.006)	*0.19*
Estradiol (pg/mL)	-0.015 (-0.039;0.003)	*0.10*	-0.015 (-0.033;0.003)	*0.11*

Modèle 1 (n=354), ajustement sur l'âge et le centre.
Modèle 2 (n=337), ajustement sur l'âge, le centre, l'IMC, la pression artérielle, le diabète, l'hypercholestérolémie, la consommation tabagique et les maladies prévalentes.
* Coefficients de régression associés à une augmentation d'un écart-type de la distribution de l'hormone sexuelle

Aucune interaction significative n'a été mise en évidence entre la concentration des hormones sexuelles endogènes et les facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels dans leur relation avec les marqueurs carotidiens.

Cependant, l'association entre la testosterone et l'épaisseur intima-média dépend du niveau de la protéine C-réactive ultra-sensible (CRP) (p interaction <0.05). Les moyennes géométriques de l'épaisseur intima-média selon les niveaux de testostérone biodisponible et les niveaux de CRP sont présentées Figure 10, après ajustement sur les facteurs de risque cardiovasculaire. Parmi les hommes ayant un statut pro-inflammatoire (CRP≥2 mg/mL), ceux avec des bas niveaux de testostérone biodisponible (≤3.2 mg/mL) ont une épaisseur intima-média significativement plus élevée que les hommes avec des hauts niveaux de testostérone biodisponible (>3.2 mg/mL) (0.76 mm vs 0.70 respectivement, p=0.002). La moyenne de l'épaisseur intima-média dans chacun des groupes de testostérone biodisponible (inférieur et supérieur à 3.2 mg/mL), quant à elle, est similaire chez les hommes avec des taux de CRP<2 mg/mL.

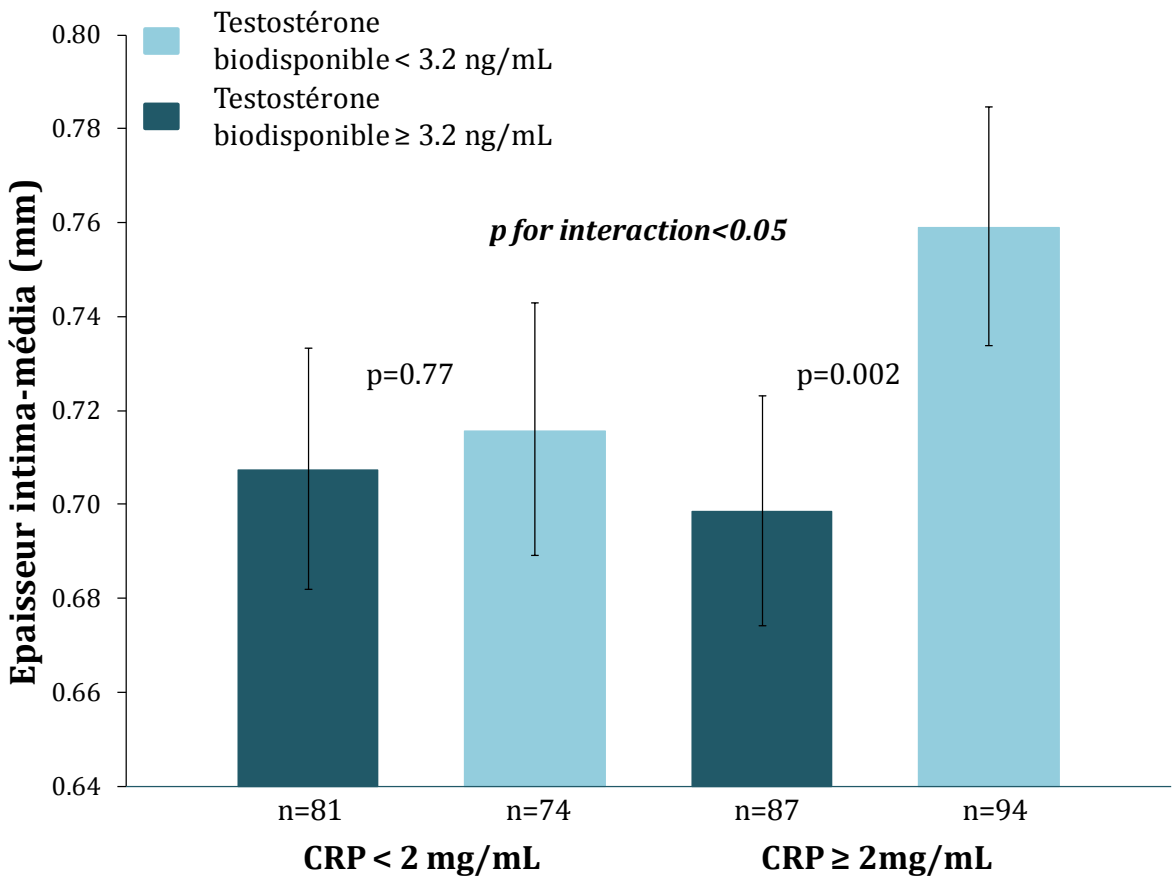


Figure 10: Moyennes géométriques et intervalle de confiance à 95% de l'épaisseur intima-média selon les niveaux de testostérone et de CRP, ajustées sur les facteurs de risque cardiovasculaire.

IV. 4. TESTOSTERONE ET EVENEMENTS ARTERIELS ISCHEMIQUES

Au cours des 4 années de suivi, 146 évènements artériels ischémiques ont été observés chez les hommes. L'échantillon pour cette partie est composé de 491 hommes (345 témoins et 146 cas, cf. Figure 6, partie III. 2.).

IV. 4.1. Evènements artériels ischémiques

Le Tableau 18 donne les principales caractéristiques à l'inclusion des hommes sans et avec un premier évènement artériel ischémique au cours des 4 premières années de suivi. Les cas de maladies artérielles ischémiques sont significativement plus âgés que les témoins (73.4 ans et 74.7 ans respectivement, p=0.01). L'IMC est similaire dans les deux groupes. La proportion de fumeurs actuels est plus importante chez les témoins. Les hommes avec un 1er évènement de maladies artérielles ischémiques sont plus fréquemment hypertendus, hypercholestérolémiques et diabétiques que les hommes sans évènements (84.9% vs 77.4%, 47.3% vs 40.9% et 20.8% vs 10.7% respectivement). Globalement, aucune différence significative entre les hormones sexuelles endogènes n'a été mise en évidence entre les cas et les non-cas de maladies artérielles ischémiques.

Tableau 18: Caractéristiques initiales des hommes de la cohorte 3C ayant eu ou non un premier évènement artériel ischémique au cours des 4 ans de suivi.

	Témoins	Cas de maladies artérielles ischémiques	
	(n = 345)	(n = 146)	*p*
Âge, années	73.4 (5.4)	74.7 (5.2)	*0.01*
IMC [a], kg/m²	26.1 (3.2)	26.1 (3.1)	*0.95*
Centre d'étude			
Bordeaux	73 (21.2)	33 (22.6)	
Dijon	173 (50.1)	76 (52.1)	
Montpellier	99 (28.7)	37 (25.3)	*0.92*
Niveau d'éducation [b]			
Aucune ou études primaires	87 (25.3)	30 (20.6)	
Secondaire et CAP/BEP	99 (28.8)	44 (30.1)	
Baccalauréat et université	158 (45.9)	72 (49.3)	*0.44*
Consommation tabagique			
Aucune	111 (32.2)	63 (43.2)	
Ancien fumeur	206 (59.7)	70 (47.9)	
Fumeur actuel	28 (8.1)	13 (8.9)	*0.04*
Consommation journalière d'alcool [c]			
Pas de consommation	9 (2.6)	9 (6.2)	
Anciens consommateurs	7 (2.0)	6 (4.1)	
≤ 2 verres (≤ 24 g d'alcool pur/jour)	217 (63.3)	89 (61.4)	
> 2 verres (> 24 g d'alcool pur/jour)	110 (32.1)	41 (28.3)	*0.07*
Antécédents médicaux			
Hypertension artérielle	267 (77.4)	124 (84.9)	*0.22*
Diabète [d]	37 (10.7)	30 (20.8)	*< 0.01*
Hypercholestérolémie	141 (40.9)	69 (47.3)	*0.13*
Niveaux des hormones sexuelles endogènes			
Testostérone totale, ng/mL	5.6 (1.9)	5.7 (2.1)	*0.17*
Testostérone biodisponible, ng/mL	3.2 (1.0)	3.3 (1.1)	*0.18*
Testostérone libre, ng/mL	0.13 (0.05)	0.13 (0.06)	*0.87*
SHBG, nmol/L	24.6 (18.3;32.8)	26.0 (19.2;35.7)	*0.24*
Estradiol total [e], pg/mL	18.3 (14.4;24.3)	18.3 (15.5;23.8)	*0.78*

Les moyennes (écart-type), la fréquence (%) ou les moyennes géométriques (intervalle interquartile) sont données respectivement pour les variables continues, qualitatives et log-transformées.

[a] 2 valeurs manquantes, [b] 1 valeur manquante, [c] 3 valeurs manquantes, [d] 2 valeurs manquantes, [e] 1 valeur manquante

Le Tableau 19 présente les caractéristiques des hommes selon la distribution en quintile de la testostérone totale. L'IMC des hommes est lié négativement aux niveaux de testostérone totale (p de tendance linéaire <0.01). Les hommes avec des niveaux de testostérone les plus faibles (1er quintile) sont plus souvent diabétiques (p de tendance linéaire=0.06). Les niveaux de SHBG et d'estradiol augmentent linéairement avec les taux de testostérone totale (p de tendance <0.01 pour les deux hormones).

Tableau 19: Caractéristiques principales des hommes de la cohorte 3C dans l'échantillon total (n=491) et par quintiles de testostérone.

		Total Testosterone quintile					
	Echantillon total (n = 491)	< 3.94 ng/mL (n = 101)	3.94-4.88 ng/mL (n = 89)	4.88-5.88 ng/mL (n = 97)	5.88-6.89 ng/mL (n = 98)	≥ 6.89 ng/mL (n = 106)	*p tendance linéaire*
Âge, années	73.7 (5.4)	73.7 (5.4)	74.2 (5.5)	73.9 (5.4)	73.4 (5.5)	73.6 (5.1)	*0.57*
IMC [a], kg/m²	26.1 (3.2)	27.1 (3.9)	26.3 (2.8)	26.1 (2.9)	26 (3.1)	24.9 (2.8)	*< 0.01*
Consommation tabagique	41 (8.4)	5 (4.9)	7 (7.9)	6 (6.2)	12 (12.4)	11 (10.4)	*0.08*
Niveau d'éducation ≥ baccalauréat/université [b]	230 (46.9)	43 (43.0)	46 (51.7)	48 (49.5)	43 (43.9)	50 (47.2)	*0.94*
Consommation journalière d'alcool > 2 verres [c]	151 (30.7)	33 (33.0)	29 (32.9)	31 (32.0)	26 (26.5)	32 (30.5)	*0.45*
Antécédants médicaux							
Hypertension artérielle	391 (79.6)	85 (84.2)	68 (76.4)	79 (81.4)	76 (77.5)	83 (78.3)	*0.39*
Diabète [d]	67 (13.7)	16 (15.8)	16 (18.2)	14 (14.4)	12 (12.4)	9 (8.5)	*0.06*
Hypercholesterolémie	210 (42.8)	41 (40.6)	39 (43.8)	43 (44.3)	36 (36.7)	51 (48.1)	*0.57*
Taux des hormones sexuelles endogènes							
Testostérone totale, ng/mL	5.6 (1.9)	3.1 (0.7)	4.4 (0.3)	5.3 (0.3)	6.3 (0.3)	8.3 (1.2)	-
Testostérone biodisponible, ng/mL	3.2 (1.1)	1.9 (0.5)	2.6 (0.3)	3.2 (0.4)	3.6 (0.5)	4.5 (0.9)	*< 0.01*
Testostérone libre, ng/mL	0.13 (0.05)	0.07 (0.02)	0.10 (0.01)	0.13 (0.01)	0.16 (0.01)	0.21 (0.04)	*< 0.01*
SHBG, nmol/L	25.0 (18.9;33.6)	14.4 (11.3;19.1)	17.4 (13.6;22.4)	17.3 (14.2;22.7)	19.7 (16.6;24.9)	23.9 (19.7;29.2)	*< 0.01*
Estradiol total [e], pg/mL	18.3 (14.7;24.2)	21.2 (17.0;26.0)	23.0 (16.7;30.3)	24.2 (18.2;31.8)	27.0 (21.1;35.3)	30.1 (22.8;38.4)	*< 0.01*

Les moyennes (écart-type), la fréquence (%) ou les moyennes géométriques (intervalle interquartile) sont données respectivement pour les variables continues,
[a] 2 valeurs manquantes, [b] 1 valeur manquante, [c] 3 valeurs manquantes, [d] 2 valeurs manquantes, [e] 1 valeur manquante

Le Tableau 20 présente les risques relatifs de maladies artérielles ischémiques associés à chaque quintile de testostérone (totale, biodisponible et libre). Nous n'avons pas mis en évidence d'association linéaire entre le risque d'évènements artériels ischémiques et la testostérone totale. Nous avons recherché une relation quadratique entre la testostérone totale et le risque de maladies artérielles ischémiques. Une relation en J a été trouvée entre la testostérone totale et le risque d'évènement artériel ischémique ($p=0.04$). Après ajustement sur les facteurs de risques traditionnels, cette relation quadratique persistait ($p<0.01$). Les risques relatifs (RR) ajustés et associés aux bas et hauts niveaux de testostérone totale par rapport au 2ème quintile étaient respectivement de 2.23 (IC 95%: 1.02; 4.88) et 3.61 (IC 95%: 1.55; 8.45). Des relations similaires quadratiques ont été trouvées pour les deux autres formes de la testostérone après prise en compte des facteurs de risques cardiovasculaires. Les RR ajustés pour les bas et hauts niveaux de testostérone étaient respectivement de 1.52 (IC 95%: 0.73 ; 3.16) et 1.99 (IC 95%: 0.90 ; 4.39) pour la forme biodisponible et 4.23 (IC 95% : 1.83 ;9.79) et 5.08 (IC 95% : 2.17 ;11.91) pour la forme libre.

L'association entre le risque d'IAD et la testostérone totale n'était pas modifiée par des ajustements complémentaires sur l'estradiol ou la SHBG.

Tableau 20: Risques relatifs de maladies artérielles ischémiques associés à chacune des formes de la testostérone

	Nombres d'évènements	Modèle 1 RR (95% IC)	Modèle 2 RR (95% IC)
Testostérone totale, ng/mL			
Q1 < 3.94	31	1.78 (0.89;3.56)	2.23 (1.02;4.88)
Q2 [3.94;4.88[	19	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [4.88;5.88[	28	1.72 (0.83;3.54)	1.97 (0.86;4.50)
Q4 [5.88;6.89[	29	1.88 (0.92;3.84)	2.16 (0.96;4.86)
Q5 ≥ 6.89	39	2.74 (1.36;5.52)	3.61 (1.55;8.45)
Test de la relation en J		*0.04*	*<0.01*
Test de tendance linéaire		*0.06*	*0.06*
Ecart à la linéarité		*0.07*	*<0.01*
Testostérone biodisponible, ng/mL			
Q1 < 2.35	28	1.27 (0.66;2.45)	1.52 (0.73;3.16)
Q2 [2.35;2.87[	25	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [2.87;3.34[	23	1.07 (0.54;2.11)	1.15 (0.54;2.48)
Q4 [3.34;4.02[	38	1.75 (0.94;3.29)	2.08 (1.02;4.25)
Q5 ≥ 4.02	32	1.77 (0.93;3.37)	1.99 (0.90;4.39)
Test de la relation en J		*0.05*	*0.01*
Test de tendance linéaire		*0.09*	*0.11*
Ecart à la linéarité		*0.29*	*0.09*
Testostérone libre, ng/mL			
Q1 < 0.09	40	3.39 (1.60;7.21)	4.23 (1.83;9.79)
Q2 [0.09;0.11[	12	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [0.11;0.14[	33	2.70 (1.30;5.63)	3.22 (1.44;7.22)
Q4 [0.14;0.17[	23	2.16 (0.95;4.87)	2.66 (1.09;6.45)
Q5 ≥ 0.17	38	4.10 (1.93;8.70)	5.08 (2.17;11.91)
Test de la relation en J		*0.07*	*0.02*
Test de tendance linéaire		*0.27*	*0.22*
Ecart à la linéarité		*<0.01*	*<0.01*

Modèle 1, ajusté sur le centre d'étude.

Modèle 2, ajusté sur le centre d'étude, l'IMC, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, et la consommation tabagique.

Le Tableau 21 montre les risques relatifs de maladies artérielles ischémiques associés soit à la SHBG soit à l'estradiol. Aucune association linéaire et quadratique n'a été mise en évidence entre ces hormones et le risque d'évènements artériels ischémiques.

Tableau 21: Risques relatifs de maladies artérielles ischémiques associés à la SHBG et à l'estradiol

	Nombres d'évènements	Modèle 1	Modèle 2
		RR (95% IC)	RR (95% IC)
SHBG, nmol/L			
Q1 < 17.20	27	1.07 (0.57-2.01)	1.02 (0.52-2.00)
Q2 [17.20;21.80[	25	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [21.80;27.80[	31	1.29 (0.69-2.41)	1.19 (0.61-2.33)
Q4 [27.80;35.30[	24	0.90 (0.46-1.76)	0.82 (0.39-1.70)
Q5 ≥ 35.30	39	1.43 (0.75-2.73)	1.44 (0.69-3.02)
Test de la relation en J		*0.37*	*0.46*
Test de tendance linéaire		*0.44*	*0.52*
Ecart à la linéarité		*0.51*	*0.38*
Estradiol total, pg/mL			
Q1 < 13.27	26	1.34 (0.66-2.71)	1.33 (0.63-2.81)
Q2 [13.27;16.90[	18	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [16.90;20.71[	41	2.32 (1.21-4.44)	2.51 (1.26-5.00)
Q4 [20.71;25.81[	33	1.72 (0.89-3.33)	1.79 (0.87-3.68)
Q5 ≥ 25.81	28	1.55 (0.77-3.14)	1.62 (0.77-3.38)
Test de la relation en J		*0.95*	*0.86*
Test de tendance linéaire		*0.28*	*0.24*
Ecart à la linéarité		*0.07*	*0.04*

Modèle 1, ajusté sur le centre d'étude.

Modèle 2, ajusté sur le centre d'étude, l'IMC, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, et la consommation tabagique.

IV. 4.2. Évènements coronaires

De la même manière, les risques relatifs associés au risque de maladies coronaires pour chaque quintile de testostérone sont données dans le Tableau 22. 112 hommes ont eu un premier évènement coronaire au cours des 4 ans de suivi.

Une relation quadratique en J a été retrouvée pour la forme totale et la libre de la testostérone avant et après ajustement sur les principaux facteurs de risque ($p<0.01$ et $p=0.02$ respectivement).

Tableau 22: Risques relatifs de maladies coronaires associés à chacune des formes de la testostérone.

	Nombres d'évènements	Modèle 1 RR (95% IC)	Modèle 2 RR (95% IC)
Testostérone totale, ng/mL			
Q1 < 3.94	27	2.29 (1.04;5.03)	3.11 (1.27;7.63)
Q2 [3.94;4.88[	12	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [4.88;5.88[	21	1.95 (0.84;4.55)	2.36 (0.89;6.25)
Q4 [5.88;6.89[	19	1.86 (0.80;4.31)	2.29 (0.88;6.01)
Q5 ≥ 6.89	33	3.40 (1.52;7.60)	4.75 (1.75;12.92)
Test de la relation en J		*0.03*	*<0.01*
Test de tendance linéaire		*0.13*	*0.14*
Ecart à la linéarité		*0.01*	*0.01*
Testostérone biodisponible, ng/mL			
Q1 < 2.35	23	1.21 (0.60;2.43)	1.49 (0.68;3.24)
Q2 [2.35;2.87[	21	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [2.87;3.34[	17	0.92 (0.45;1.91)	0.99 (0.44;2.26)
Q4 [3.34;4.02[	26	1.44 (0.72;2.87)	1.74 (0.80;3.81)
Q5 ≥ 4.02	25	1.53 (0.76;3.06)	1.67 (0.71;3.93)
Test de la relation en J		*0.15*	*0.07*
Test de tendance linéaire		*0.30*	*0.38*
Ecart à la linéarité		*0.48*	*0.21*
Testostérone libre, ng/mL			
Q1 < 0.09	32	4.14 (1.72;9.97)	5.65 (2.08;15.33)
Q2 [0.09;0.11[	8	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [0.11;0.14[	24	2.96 (1.25;7.05)	3.73 (1.41;9.88)
Q4 [0.14;0.17[	17	2.41 (0.94;6.18)	3.36 (1.16;9.73)
Q5 ≥ 0.17	31	5.01 (2.09;11.98)	6.89 (2.48;19.14)
Test de la relation en J		*0.05*	*0.02*
Test de tendance linéaire		*0.31*	*0.23*
Ecart à la linéarité		*< 0.01*	*< 0.01*

Modèle 1, ajusté sur le centre d'étude.

Modèle 2, ajusté sur le centre d'étude, l'IMC, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, et la consommation tabagique.

Le Tableau 23 montre les risques relatifs de maladies coronaires associés soit à la SHBG soit à l'estradiol. Aucune association linéaire et quadratique n'a été mise en évidence entre ces hormones et le risque d'évènements artériels ischémiques.

Tableau 23: Risques relatifs de maladies coronaires associés à la SHBG et à l'estradiol

	Nombres d'évènements	Modèle 1 RR (95% IC)	Modèle 2 RR (95% IC)
SHBG, nmol/L			
Q1 < 17.20	20	1.05 (0.52-2.12)	0.98 (0.46-2.09)
Q2 [17.20;21.80[	19	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [21.80;27.80[	24	1.30 (0.65-2.60)	1.16 (0.55-2.46)
Q4 [27.80;35.30[	17	0.88 (0.41-1.88)	0.78 (0.34-1.78)
Q5 ≥ 35.30	32	1.70 (0.84-3.45)	1.64 (0.71-3.76)
Test de la relation en J		*0.23*	*0.39*
Test de tendance linéaire		*0.24*	*0.38*
Ecart à la linéarité		*0.39*	*0.31*
Estradiol total, pg/mL			
Q1 < 13.27	23	1.49 (0.70-3.18)	1.47 (0.66-3.29)
Q2 [13.27;16.90[	15	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [16.90;20.71[	27	1.88 (0.91-3.88)	2.01 (0.94-4.32)
Q4 [20.71;25.81[	27	1.67 (0.82-3.41)	1.73 (0.79-3.78)
Q5 ≥ 25.81	20	1.44 (0.66-3.13)	1.54 (0.68-3.46)
Test de la relation en J		*0.79*	*0.79*
Test de tendance linéaire		*0.60*	*0.49*
Ecart à la linéarité		*0.41*	*0.37*

Modèle 1, ajusté sur le centre d'étude.

Modèle 2, ajusté sur le centre d'étude, l'IMC, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, et la consommation tabagique.

IV. 4.3. AVC ischémiques

Le Tableau 24 présente les RRs d'AVC associés à chaque quintile de testostérone. Au cours des 4 ans de suivi, 34 hommes ont eu un premier AVC. Aucune relation significative entre le risque d'AVC et la testostérone totale ou libre n'a été détectée. Après ajustement sur les facteurs de risque cardiovasculaire, l'association entre la testostérone biodisponible et le risque d'AVC est significative et en forme de J.

Tableau 24: Risques relatifs d'AVC associés à chacune des formes de la testostérone

	Nombres d'évènements	Modèle 1 RR (95% IC)	Modèle 2 RR (95% IC)
Testostérone totale, ng/mL			
Q1 < 3.94	4	0.76 (0.20;2.88)	0.77 (0.17;3.44)
Q2 [3.94;4.88[	7	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [4.88;5.88[	7	1.36 (0.40;4.64)	1.52 (0.38;6.14)
Q4 [5.88;6.89[	10	2.01 (0.63;6.45)	2.10 (0.59;7.45)
Q5 ≥ 6.89	6	1.48 (0.39;5.53)	1.84 (0.41;8.21)
Test de la relation en J		*0.65*	*0.41*
Test de tendance linéaire		*0.15*	*0.13*
Ecart à la linéarité		*0.78*	*0.89*
Testostérone biodisponible, ng/mL			
Q1 < 2.35	5	1.49 (0.34;6.65)	1.55 (0.27;9.08)
Q2 [2.35;2.87[	4	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [2.87;3.34[	6	1.74 (0.39;7.82)	1.77 (0.32;9.88)
Q4 [3.34;4.02[	12	3.53 (0.97;12.85)	4.05 (0.84;19.50)
Q5 ≥ 4.02	7	3.28 (0.79;13.53)	4.15 (0.71;24.33)
Test de la relation en J		*0.10*	*0.03*
Test de tendance linéaire		*0.04*	*0.06*
Ecart à la linéarité		*0.58*	*0.55*
Testostérone libre, ng/mL			
Q1 < 0.09	8	2.05 (0.56;7.51)	1.93 (0.48;7.79)
Q2 [0.09;0.11[	4	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [0.11;0.14[	9	2.28 (0.69;7.52)	2.43 (0.71;8.30)
Q4 [0.14;0.17[	6	1.73 (0.41;7.37)	1.62 (0.38;6.81)
Q5 ≥ 0.17	7	2.73 (0.71;10.56)	2.90 (0.68;12.39)
Test de la relation en J		*0.36*	*0.27*
Test de tendance linéaire		*0.50*	*0.49*
Ecart à la linéarité		*0.48*	*0.43*

Modèle 1, ajusté sur le centre d'étude.

Modèle 2, ajusté sur le centre d'étude, l'IMC, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, et la consommation tabagique.

Le Tableau 25 montre les risques relatifs d'AVC associés soit à la SHBG soit à l'estradiol. Aucune association linéaire et quadratique n'a été mise en évidence entre ces hormones et la survenue d'AVC à 4 ans.

Tableau 25: Risques relatifs d'AVC associés à la SHBG et à l'estradiol

		Modèle 1	Modèle 2
	Nombres d'évènements	RR (95% IC)	RR (95% IC)
SHBG, nmol/L			
Q1 < 17.20	7	1.25 (0.38-4.08)	1.25 (0.35-4.52)
Q2 [17.20;21.80[	6	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [21.80;27.80[	7	1.28 (0.39-4.19)	1.36 (0.39-4.72)
Q4 [27.80;35.30[	7	0.95 (0.29-3.19)	1.01 (0.25-4.12)
Q5 ≥ 35.30	7	0.83 (0.23-3.07)	1.03 (0.25-4.19)
Test de la relation en J		*0.67*	*0.81*
Test de tendance linéaire		*0.53*	*0.79*
Ecart à la linéarité		*0.98*	*0.98*
Estradiol total, pg/mL			
Q1 < 13.27	3	0.78 (0.14-4.40)	0.71 (0.10-5.28)
Q2 [13.27;16.90[	3	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [16.90;20.71[	14	4.10 (1.08-15.59)	4.80 (1.13-20.47)
Q4 [20.71;25.81[	6	1.86 (0.44-7.84)	2.02 (0.39-10.55)
Q5 ≥ 25.81	8	1.98 (0.45-8.74)	1.80 (0.38-8.61)
Test de la relation en J		*0.17*	*0.22*
Test de tendance linéaire		*0.13*	*0.18*
Ecart à la linéarité		*0.06*	*0.02*

Modèle 1, ajusté sur le centre d'étude.

Modèle 2, ajusté sur le centre d'étude, l'IMC, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, et la consommation tabagique.

V. DISCUSSION

V. 1. SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS

L'association entre la testostérone plasmatique et le risque de maladies artérielles ischémiques à 4 ans a été étudiée dans une cohorte d'hommes âgés de plus de 65 ans en tenant compte des taux circulants d'estradiol et de SHBG.

Dans un premier temps, les hormones sexuelles endogènes ont été analysées en relation avec les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels. Nous avons trouvé que la testostérone totale et biodisponible diminuaient avec l'âge, l'obésité et augmentaient avec le HDL-cholestérol. Chez les diabétiques, ces niveaux étaient également diminués. Dans notre étude, l'âge et le diabète étaient les seuls facteurs liés indépendamment à la testostérone libre. Les taux plasmatiques de SHBG étaient quant à eux corrélés positivement à l'âge et l'hypertension artérielle, négativement à l'IMC et aux triglycérides. On retrouvait par ailleurs que les concentrations d'estradiol augmentaient indépendamment avec l'inflammation et l'hypertension. Elles diminuaient avec le diabète et la cholestérolémie.

Dans une seconde étape, nous avons trouvé que les formes «totale» et «biodisponible» de la testostérone étaient inversement corrélées à l'épaisseur de l'intima-média carotidienne. Cependant, cette association dépendait du statut inflammatoire systémique. L'épaisseur de l'intima-média était significativement augmentée chez les hommes avec des bas niveaux de testostérone biodisponible mais seulement chez ceux présentant des niveaux élevés de CRP (66). Aucune association n'a été mise en évidence entre les hormones sexuelles endogènes et la présence de plaques d'athérome carotidien.

Dans l'analyse finale, une relation quadratique entre les niveaux plasmatiques de testostérone et le risque de maladies artérielles ischémiques a été observée. Les bas et les hauts niveaux de testostérone, en particulier la forme totale, étaient significativement associés à une augmentation du risque artériel ischémique. Cette relation en forme de J était vérifiée pour la forme totale avant et après prise en compte des facteurs de risque traditionnels (67). Elle était plus marquée pour le risque

coronaire que pour le risque d'AVC ischémique. Aucune association n'a été mise en évidence entre les niveaux sanguins d'estradiol ou de SHBG et le risque de maladies artérielles ischémiques.

V. 2. TESTOSTERONE ENDOGENE ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES : ETUDES ANTERIEURES

Les études antérieures sur la relation entre la testostérone plasmatique et le risque de maladies cardiovasculaires ont conduit à des résultats hétérogènes.

Les premières études de cohorte n'ont en général pas mis en évidence d'association entre les niveaux de testostérone et le risque cardiovasculaire. Dans une cohorte américaine (la Rancho-Bernado) d'environ 1000 hommes âgés de 40 à 79 ans comportant 114 cas incidents de maladies cardiovasculaires à 12 ans (dont 82 évènements artériels ischémiques), les moyennes de testostérone étaient similaires chez les cas et chez les témoins (30). Les résultats rapportés par les auteurs de la Caerphilly Study (2512 hommes, âgés de 45 à 59 ans avec 153 évènements ischémiques artériels incidents) ne plaident pas non plus en faveur d'un rôle des hormones sexuelles endogènes comme facteurs de risque cardiovasculaire. De même, dans la Framingham Heart Study (cohorte de 2 084 hommes âgés de 30 à 60 ans avec 386 cas incidents de maladies cardiovasculaires), aucune association significative entre le risque d'évènement cardiovasculaire et la testostérone n'a été mise en évidence. Dans cette étude, les niveaux élevés d'estradiol étaient associés à une diminution du risque cardiovasculaire (32). Dans une autre étude réalisée au cours du vieillissement (la Honolulu-Asia Aging Study portant sur 2.197 hommes âgés de 71 à 93 ans avec 124 cas incidents d'AVC), aucune association significative entre la testostérone et le risque d'AVC n'a été trouvée. En revanche, les niveaux élevés d'estradiol étaient liés à une augmentation de ce risque (68).

Plus récemment, la cohorte suédoise Osteoporotic Fractures in Men (MrOS), incluant 2416 hommes âgés de plus de 69 ans, a évalué la valeur prédictive de la testostérone à partir de 485 cas incidents de maladies cardiovasculaires (302 cas de maladies

coronaires et 225 AVC non indépendants). Pour la première fois dans une étude épidémiologique d'envergure, le dosage de la testostérone totale a été effectué par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie gazeuse (méthode considérée comme le "gold standard"). Les auteurs ont montré que les niveaux de testostérone totale étaient inversement associés au risque d'évènements cardiovasculaires à 5 ans chez des hommes âgés. Les hommes avec des niveaux de testosterone dans le quartile le plus élevé avaient un risque diminué d'évènements cardiovasculaires comparés aux hommes avec des niveaux dans les 3 premiers quartiles. Cette relation était également significative pour les évènements coronaires, mais pas pour les AVC (borderline). Des résultats similaires étaient observés avec la testostérone libre mais sa valeur prédictive restait cependant à la limite de la signification (35). Des bas niveaux de testostérone ont été également associés à un risque plus élevé d'AVC et d'accidents ischémiques transitoires dans la Health In Men Study portant sur 3443 hommes âgés de plus de 70 ans dont 119 cas incidents étaient survenus après un suivi de 3.5 ans (36). Toutes ces données d'incidence récentes sont à rapprocher des résultats d'une méta-analyse regroupant une vingtaine d'études (34) qui conclue à une augmentation de la mortalité toutes causes et de la mortalité cardiovasculaire chez les hommes ayant des taux bas de testostérone plasmatique. Cette conclusion est renforcée par la Health In Men Study (605 décès observés dont 207 d'origine cardiovasculaire) montrant que les bas niveaux de testostérone sont associés spécifiquement à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire et non à la mortalité due aux autres causes (69). De plus, une méta-analyse récente (70) confirme la relation entre des taux faibles de testostérone et une augmentation du risque cardiovasculaire mais ce lien est observé uniquement chez les hommes âgés de plus 70 ans. Nos résultats montrant que des bas niveaux de testostérone augmentent le risque de maladie artérielle ischémique sont cohérents avec les données actuelles de la littérature, notamment chez les hommes au cours du vieillissement.

Dans notre étude cependant, les hauts niveaux de testostérone sont également associés à une augmentation du risque artériel. Ce résultat est consistent avec celui de la Massachussetts Male Aging Study, une cohorte de 1 709 hommes âgés de 40 à 70 ans suivis pendant une quinzaine d'années. En effet, les auteurs trouvent une augmentation de la mortalité due à une maladie artérielle ischémique chez les hommes avec des taux

élevés de testostérone libre (71). Une seconde étude américaine (MrOS, incluant 6 000 hommes de plus de 65 ans) rapporte une association similaire dans un échantillon de 697 hommes dont 100 cas incidents de maladies coronaires après 4 ans de suivi (72). Ces résultats suggèrent que des taux élevés de testostérone pourraient avoir un rôle délétère dans le développement de l'athérothrombose. Ils peuvent être rapprochés des résultats récents d'un essai clinique, réalisé aux Etats-Unis, montrant un excès d'évènements cardiovasculaires chez des hommes âgés de plus de 65 ans (avec une mobilité réduite et des niveaux de testostérone totale endogène compris entre 100 et 350 ng/dL) recevant une supplémentation en testostérone. Cet essai a été stoppé en raison du taux élevé d'effets indésirables (37).

V. 3. INTERPRETATION DES RESULTATS

Le rôle des androgènes dans le développement des maladies cardiovasculaires reste aujourd'hui débattu. Des études de cohorte ont montré une association indépendante entre des taux bas de testostérone chez les hommes et la survenue ultérieure d'une maladie artérielle ischémique. Cependant, ces résultats n'impliquent pas nécessairement l'existence d'une relation causale. Une diminution des taux circulants de testostérone pourrait être le résultat d'un biais de sélection ou refléter seulement le processus de vieillissement et/ou un état de santé général altéré sans réelle signification pathogénique vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. Alternativement, des niveaux diminués de testostérone plasmatique pourraient jouer un rôle étiologique dans le développement des maladies artérielles ischémiques par une action directe sur l'athérothrombose et/ou ses facteurs de risques.

V. 3.1. Testostérone et athérosclérose

De nombreuses études ont établi une association inverse entre les niveaux de testostérone plasmatique et des marqueurs d'athérosclérose asymptomatique mesurés

de façon non-invasive notamment au niveau carotidien (épaisseur intima-média (EIM), plaque d'athérome) (33).

Une étude de cohorte néerlandaise portant sur 195 hommes âgés (la Zoetermeer) a montré que des taux diminués de testostérone étaient associés à une augmentation de l'EIM indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaire (73). Cependant aucune association entre la testostérone sérique et la présence de plaques d'athérome carotidien n'a été mise en évidence dans cette étude transversale (74). La Pomenaria, une étude transversale incluant 1177 hommes âgés de 62 ans en moyenne a montré, quant à elle, que la prévalence des plaques carotidiennes était augmentée chez les hommes avec de faibles niveaux sériques de testostérone comparés aux hommes avec des taux normaux de testostérone (75). Une autre étude (la Turku Aging Male Study), incluant des sujets d'âge moyen (239 hommes de 40 à 70 ans), a montré que les hommes avec un déficit androgénique avaient une EIM plus élevée que les hommes « sains ».

La relation inverse entre les niveaux de testostérone et l'athérome carotidien a été étendue à d'autres sites. La Rotterdam Study (504 hommes âgés de 55 ans et plus) a montré que chez les hommes avec des niveaux de testostérone totale et biodisponible plus faibles, le risque d'athérosclérose aortique était augmenté (76). Dans la MrOS Study (3014 hommes âgés en moyenne de 75 ans), la testostérone libre basse et l'estradiol libre élevé (mesurés dans le sérum) ont été associés à l'athérosclérose des membres inférieurs (77).

Une étude longitudinale récente a cependant remis en cause les associations entre les hormones sexuelles endogènes et l'athérome carotidien. En effet, la Tromsø Study, incluant 2290 hommes âgés en moyenne de 66 ans, n'a pas mis en évidence de relation significative entre les hormones sexuelles endogènes et la progression de l'athérome carotidien (plaques et EIM) (78).

Si nos données apportent de nouvelles preuves en faveur d'une corrélation inverse entre la testostérone plasmatique et l'EIM, en particulier chez les hommes âgés de plus de 65 ans, elles ne permettent pas de confirmer un lien direct entre les hormones sexuelles et la présence de plaque d'athérome carotidien. Nos résultats laissent suggérer que les faibles niveaux des androgènes sont impliqués dans l'athérome débutant plutôt que dans le développement de lésions avancées. Cependant, la signification de l'EIM est

aujourd'hui remise en cause par certains auteurs (79). En effet, les mesures de l'EIM sont souvent acquises dans l'artère carotide commune alors que l'athérome se développe en aval de la carotide interne. L'âge et l'hypertension sont les principaux facteurs d'évolution de l'EIM, qui ne reflète pas nécessairement le processus d'athérosclérose. De plus, une méta-analyse (80) a montré que les plaques carotidiennes étaient de meilleurs prédicteurs du risque coronaire que l'EIM (81). Ainsi, l'EIM pourrait être un indicateur de vieillissement vasculaire dont la diminution de la testostérone serait un simple reflet.

L'interaction entre la CRP, la testostérone et l'EIM observée dans notre étude n'a pas été rapportée précédemment dans la littérature. Elle est cohérente avec le rôle prédicteur de la CRP dans la survenue d'un infarctus du myocarde et suggère des interrelations complexes entre les androgènes et l'inflammation possiblement en lien avec l'athérothrombose.

V. 3.2. Testostérone et facteurs de risque cardiovasculaire

Dans l'étude 3C, des taux bas de testostérone sont associés à un profil de risque cardiovasculaire défavorable, confirmant ainsi les résultats de nombreuses études antérieures (27). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer un effet délétère de l'hypogonadisme masculin sur le système vasculaire (82). La testostérone joue un rôle métabolique important en contrôlant notamment la composition corporelle et la répartition de la graisse viscérale. Les androgènes peuvent également être impliqués dans le développement de l'insulino-résistance et du syndrome métabolique ainsi que dans la biosynthèse et la dégradation des lipides. Dans l'étude 3C, l'indice de corpulence et l'existence d'un diabète sont les deux principaux déterminants de la testostérone et expliquent une part importante de sa variabilité plasmatique. La diminution des androgènes et son effet sur l'obésité ou la surcharge pondérale pourraient jouer un rôle central dans l'interprétation causale de nos données d'incidence. Il est en effet bien établi que l'accumulation de graisse viscérale accélère la conversion de testostérone en estradiol par l'aromatase adipocytaire. Cette action

combinée à la libération en excès de cytokines pro-inflammatoires (interleukine 6 : IL6, Tumor Necrosis Factor α : TNF α, …) et de leptine peut inhiber l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire et diminuer la libération de LH via le système GnRH. Il en résulte une baisse de la production de testostérone endogène par les cellules de Leydig. Cet hypogonadisme relatif va quant à lui augmenter l'activité de la lipoprotéine lipase et faciliter ainsi le stockage des triglycérides et des acides gras dans les adipocytes. Le déséquilibre métabolique et hormonal ainsi créé contribue à son tour ainsi au développement de l'obésité et de l'insulino-résistance, réalisant ainsi une boucle hypogonado-adipocytaire potentiellement impliquée dans l'étiologie du diabète. Cette hypothèse séduisante est confortée en partie par des travaux montrant qu'une supplémentation en testostérone chez des hommes présentant un hypogonadisme peut restaurer un profil de risque cardiovasculaire favorable (83) (84) (85). De même, des travaux récents ont suggéré que les anti-androgènes utilisés dans le traitement de certains cancers de la prostate induisaient des effets adverses similaires à ceux observés chez les hommes ayant des taux bas d'androgènes circulants (29). La Figure 11 illustre synthétiquement cette hypothèse hypogonado-adipocytaire.

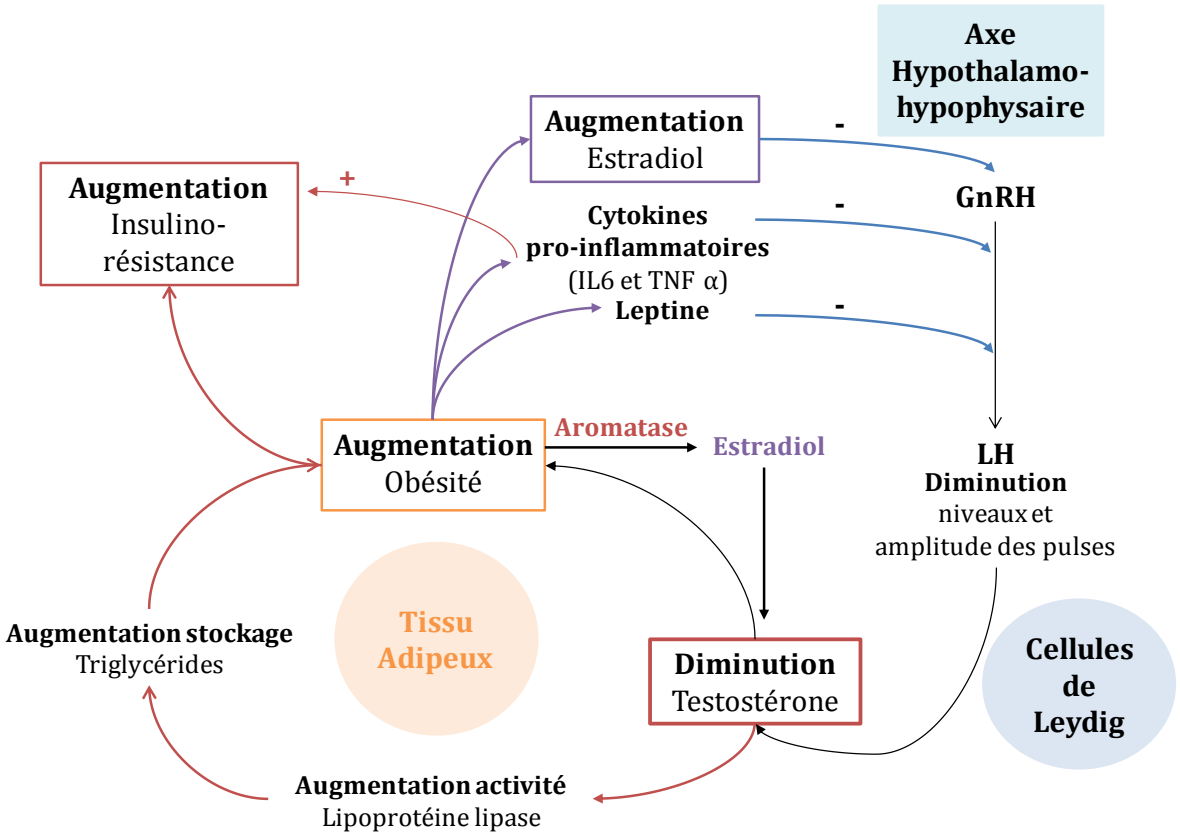


Figure 11: Schéma illustratif de l'hypothèse hypogonado-adipocytaire

Dans l'étude 3C, force est de reconnaître que le risque de maladie artérielle ischémique associé à la testostérone est peu modifié par l'ajustement sur les principaux facteurs de risque cardiovasculaire, notamment l'obésité et le diabète. Ce résultat suggère que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans l'excès d'évènements cliniques chez les hommes ayant des taux circulants d'androgènes diminués. Deux domaines-clé du risque vasculaire ont été explorés et concernent le statut inflammatoire systémique et les paramètres de l'hémostase. Des données expérimentales ont suggéré que la testostérone pouvait jouer un rôle modulateur dans l'immunité et l'inflammation (86). De plus, une corrélation négative entre les androgènes plasmatiques et la protéine C réactive sérique (CRP) a été rapportée dans plusieurs cohortes (87) (88). L'étude 3C ne permet pas de confirmer cette relation et des analyses stratifiées en fonction du statut inflammatoire ne révèlent aucune interaction entre la testostérone et la CRP dans la prédiction du risque vasculaire. En particulier, les hommes ayant simultanément des taux bas de testostérone et des niveaux élevés de CRP ne constituent pas un sous-groupe à haut risque comme le suggèrent nos résultats transversaux sur l'IMT carotidienne

(66). Par ailleurs, l'existence d'une hypercoagulabilité chez les hommes présentant un déficit en androgène a été suggérée par des données transversales antérieures (89) (90) (91). Dans l'étude 3C, des analyses portant sur le lien entre la testostérone et les facteurs de coagulation, notamment la génération de thrombine in vitro, n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse. En revanche, une augmentation de l'estradiol a été corrélée à un phénotype plasmatique prothrombotique. Ces résultats ne sont pas rapportés dans ce travail et méritent des développements dans de futurs travaux.

Des taux élevés d'androgènes circulants pourraient aussi être impliqués dans l'étiologie des maladies artérielles ischémiques, comme le suggère la relation en J observée dans l'étude 3C. La testostérone a des effets sur la rétention hydro-sodée notamment chez les hommes au cours du vieillissement et ce mécanisme pourrait contribuer au développement d'une hypertension artérielle et d'une insuffisance cardiaque (92). De plus, l'utilisation de stéroïdes anabolisants a été associée à l'hypertrophie ventriculaire gauche (93). Dans l'étude 3C, l'absence d'information systématique sur la fonction cardiaque ne permet pas d'explorer cette hypothèse. .

V. 3.3. Testostérone et vieillissement

L'état actuel des connaissances montre qu'un lien causal entre le déclin des androgènes et le développement des maladies artérielles ischémiques reste très incertain. Une diminution non spécifique de la production de testostérone a été observée dans de nombreuses situations pathologiques aigues ou chroniques dont la prévalence augmentent considérablement avec l'âge (21). Un stress chirurgical peut induire par exemple un hypogonadisme transitoire lié à un dérèglement de l'axe hypothalamo-hypophysaire (94). De nombreuses affections au long cours telles que les bronchopneumopathies obstructives chroniques (95) et l'insuffisance rénale peuvent également affecter de façon durable le statut androgénique (96). La prise de médicaments augmente aussi après 65 ans et certains traitements comme les corticoïdes ont des effets adverses sur la production d'androgènes (97). Ainsi, une diminution des taux circulants de testostérone avec l'âge pourrait être le reflet de comorbidités et/ou de traitements associés sans être réellement impliquée dans

l'étiologie des maladies cardiovasculaires. Il est difficile de prendre en compte ce phénomène dans l'étude 3C, compte tenu notamment de la prévalence élevée des pathologies associées et de leurs traitements. Rappelons, par exemple, qu'environ trois quarts des hommes recrutés dans cette cohorte sont hypertendus et/ou utilisent un traitement antihypertenseur.

Alternativement, une diminution des androgènes pourrait être un bon marqueur de vieillissement reflétant l'âge biologique plutôt que l'âge réel des sujets. Ceci pourrait expliquer dans l'étude 3C le peu d'effet des ajustements sur nos résultats, en particulier le faible impact de la prise en compte de l'âge.

Les études de cohorte réalisées chez les personnes âgées exposent à des biais de sélection qui doivent être considérés dans l'interprétation des résultats. La probabilité d'être recrutée dans de telles cohortes peut être lié à la maladie étudiée et, dans le cas d'évènements potentiellement fatals, la survenue d'un décès avant l'âge limite d'inclusion ne peut être prise en compte. Cette troncature à gauche dans la survie s'applique à l'étude 3C puisque tous les décès d'origine cardiovasculaire avant 65 ans échappent totalement à l'analyse et peuvent ainsi entacher la validité des résultats. Un tel biais de survie peut conduire à sous-estimer et même à inverser la relation entre un facteur de risque et la maladie d'intérêt. Dans nos données, un exemple simple est fourni par le tabagisme qui semble exercer paradoxalement un effet protecteur vis à vis des maladies artérielles ischémiques. De façon similaire, on peut supposer que les évènements cardiovasculaires fatals associés de faibles taux de testostérone avant 65 ans aient été systématiquement exclus de la cohorte 3C, atténuant ainsi le lien négatif entre les androgènes et le risque artériel et pouvant même générer une association positive (branche ascendante de la relation en J). L'impact de ce biais de sélection peut néanmoins être limité par la faible proportion d'évènements fatals contribuant au risque cardiovasculaire global (environ 10% des évènements cardiovasculaires sont fatals). De plus, les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels et les principaux déterminants de l'athérome carotidien sont en général retrouvés dans notre étude.

Une autre source de difficultés rencontrées dans les cohortes de personnes âgées concerne les risques compétitifs. Après 65 ans, la mortalité totale et l'incidence des autres maladies augmentent considérablement et ne peuvent être totalement ignorées.

L'analyse réalisée uniquement chez les survivants peut conduire à des estimations biaisées du risque cardiovasculaire. Dans notre étude, cependant, la censure des observations au moment d'un décès non cardiovasculaire ainsi que l'exclusion des cas incidents de démence n'ont pas d'effets importants dans les modèles de Cox.

Finalement, un soin particulier doit être apporté dans l'étude de la temporalité des évènements en présence d'une maladie chronique. L'athérosclérose est le résultat d'un long processus dégénératif évoluant tout au long de la vie, souvent de façon asymptomatique. La modification du facteur d'exposition (le phénotype hormonal plasmatique dans notre étude) pourrait ainsi être la conséquence du développement muet de l'athérome et/ou de son expression clinique. Cette causalité inversée ("reverse causation" des anglo-saxons) est fréquemment observée dans le contexte du vieillissement et notamment dans les pathologies liées à l'altération des fonctions cognitives. Dans l'étude 3C, l'exclusion des cas prévalents et des cas incidents survenant la première année de suivi modifie peu les résultats. D'autres analyses de sensibilité réalisées en fonction du niveau des facteurs de risque cardiovasculaire (exclusion des sujets présentant des plaques d'athérome carotidien, des diabétiques,...) n'ont pas non plus montré de modifications importantes des résultats.

V. 4. FORCES ET LIMITES

V. 4.1. Forces

La principale force de l'étude 3C réside dans son caractère prospectif, limitant ainsi l'influence d'un évènement de santé sur les facteurs d'exposition qui sont mesurés à l'entrée de la cohorte. Dans cette étude multicentrique en population générale, réalisée chez des personnes âgées non institutionnalisées, un taux élevé de participation au cours des 4 ans de suivi a été observé. Au premier suivi, le taux de perdus de vue ou de refus de participation était de 2.8% et de 8% au second suivi (38). Le schéma d'étude cas-cohorte mis en place pour l'étude des biomarqueurs respecte totalement la nature prospective de l'étude et permet en outre d'utiliser le même groupe témoin pour l'analyse de différents évènements cliniques (maladies cardiovasculaires, démences). De plus, la constitution de la sous-cohorte à partir d'un échantillon aléatoire de la cohorte entière autorise une estimation non biaisée des risques de maladies artérielles ischémiques.

Les informations collectées à l'examen initial proviennent d'interviews réalisés en face à face, limitant dans une certaine mesure les biais de mémoire. Leur quantité et leur richesse permettent la prise en compte simultanée de nombreux facteurs de confusion pour l'étude des maladies artérielles ischémiques. La recherche systématique des médicaments pris par chacun des participants, notamment des traitements hormonaux, sont également une force de l'étude, en particulier dans le contexte du vieillissement.

La définition des évènements cardiovasculaires repose sur des critères cliniques, électriques (ECG), biologiques et radiologiques bien standardisés et reconnus au niveau international. Leur validation a été réalisée pour chaque type de maladie par un panel d'experts indépendants et de manière précise à partir des comptes-rendus opératoire et des rapports d'hospitalisation. De plus, les enquêteurs complétaient les informations de suivi de chaque sujet indépendamment des diagnostics réalisés par les experts. Cette démarche à l'aveugle minimise ainsi les biais d'information. Le risque d'erreur de classement par statut de maladie est ainsi fortement diminué. Cet avantage concerne

également la recherche des causes de décès notamment d'origine cardiovasculaire par une procédure spécifique à l'étude 3C (46).

V. 4.2. Limites

L'étude 3C inclut des personnes âgées recrutées sur la base du volontariat. Les participants sont en moyenne en meilleure santé que la population générale du même âge, d'un niveau socioprofessionnel plus élevé et d'un niveau d'étude supérieur. La principale conséquence de ce biais de sélection est le nombre plus faible qu'attendu d'évènements artériels ischémiques. L'incidence des cardiopathies ischémiques et des accidents vasculaires cérébraux ischémiques observée chez les hommes dans la sous-cohorte (respectivement 1% et 2‰ par an) montrent en effet une sous-estimation du taux d'évènements cardiovasculaires par rapport aux données françaises (données INVS) (98) et internationales. Par exemple, dans la Cardiovascular Health Study, une étude de cohorte américaine d'environ 4000 hommes et femmes de plus de 65 ans, l'incidence de cardiopathies ischémiques après dix ans de suivi étaient de 2.2% par an chez les hommes (99). L'incidence des AVC dans la Health In Men Study, une cohorte de plus de 3400 hommes de plus de 70 ans est estimée à 9.9‰ par an (36). Dans une autre étude incluant plus de 1500 personnes âgées de 55 à 74 ans, l'incidence des cardiopathies ischémiques étaient de 3.2% par an et celle des AVC de 5.6‰ par an (100). Par ailleurs, les hommes de l'étude 3C sont majoritairement caucasiens et âgés de plus de 65 ans. Nos résultats ne peuvent être extrapolés aux hommes jeunes et d'une origine ethnique différente.

La période de surveillance limitée à 4 ans ne permet pas d'évaluer l'influence à long-terme des hormones sexuelles sur le risque cardiovasculaire. De plus, le faible nombre de cas incidents ne confère pas à nos analyses une puissance statistique optimale. Cette limitation peut en partie expliquer certains résultats négatifs observés notamment dans des sous-groupes définis en fonction du type d'évènements. Le nombre de cas incidents d'AVC reste à cet égard largement insuffisant. L'étude de la mortalité cardiovasculaire et des manifestations cliniques de l'insuffisance coronaire (angine de poitrine, infarctus du myocarde) est pratiquement impossible. De la même manière, il peut être difficile de

mettre en évidence d'éventuelles interactions entre les niveaux des hormones sexuelles endogènes et les facteurs de risque cardiovasculaire.

Tous les dosages des hormones circulantes ont été effectués par radio-immunoassay (RIA). Cette méthode, comparée au « gold standard » que représente la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) a été beaucoup critiquée (101). De nombreux RIA sont en effet disponibles et les résultats des mesures peuvent varier en fonction des réactifs et des techniques utilisées (102). La comparabilité des dosages entre laboratoires peut-être difficile et les performances diagnostiques des RIA se trouvent ainsi limitées. De plus, les RIA peuvent manquer de spécificité ce qui a conduit à proposer une étape de purification permettant de diminuer les réactions croisées et d'isoler le composé analysé (102). Cette procédure nécessite cependant une grande quantité de plasma incompatible avec les stocks disponibles dans la biobanque 3C. Des RIA directs, sans étape d'extraction, ont donc été utilisés dans l'étude 3C. Les réserves formulées à propos de ces méthodes de dosages s'appliquent également aux dosages des autres hormones circulantes, en particulier l'estradiol (103) et les formes biodisponible et libre de la testostérone (104). Néanmoins, ces problèmes concernent surtout les faibles concentrations de testostérone que l'on trouve chez les femmes et les enfants ainsi que les taux bas d'estradiol rencontrés chez les femmes ménopausées (105). Dans l'étude 3C, la reproductibilité des mesures hormonales donnée par le laboratoire était satisfaisante aux vues des coefficients de variation. De plus, un contrôle de qualité strict réalisé au laboratoire a permis d'assurer une bonne validité interne des dosages. Par ailleurs, dans notre étude, la comparaison effectuée entre les dosages par RIA et par GC-MS nous montre une forte corrélation entre les méthodes, même si les taux de testostérone mesurés par RIA sont sous-estimés par rapport à la GC-MS. Ainsi, l'utilisation des RIA a un impact modéré en épidémiologie puisque le classement des valeurs relatives de testostérone est généralement conservé et ne modifie pas ou peu la transformation des variables biologiques en données catégorielles (103).

La testostérone biodisponible a été mesurée par une méthode de précipitation permettant de séparer la testostérone liée à la SHBG de la testostérone libre plus celle liée à l'albumine. Cette méthode indirecte implique de connaître la testostérone totale avec laquelle elle partage des propriétés métrologiques similaires (21). Les formules utilisées pour estimer la fraction libre de la testostérone sont discutées dans la

littérature (106). Plusieurs algorithmes ont été mis au point pour estimer ce paramètre à partir de la testostérone totale, la SHBG et l'albumine (106) (107). La comparaison de ces algorithmes a montré une grande variabilité des mesures dépendant notamment de la concentration des protéines de liaison (108). La validité de la testostérone libre reste ainsi problématique dans notre étude mais rappelons qu'il s'agit ici d'une mesure secondaire. De plus, le concept même d'hormone biodisponible est aujourd'hui largement débattu (109).

Dans l'étude 3C, les mesures hormonales sont basées sur un dosage unique des stéroïdes sexuels endogènes. Cependant, les prises de sang ont toutes été réalisées le matin réduisant ainsi l'impact des variations diurnes bien connues de la testostérone (110). Cet effort de standardisation des prélèvements ne permet pas de contrôler entièrement la variabilité intra-individuelle des mesures qui peut ainsi conduire à une sous-estimation des risques relatifs et finalement contribuer à un manque de puissance. Cette source indésirable de variabilité ne peut cependant pas générer à tort des relations significatives comme celles observées dans notre étude.

Quelque soit la méthode de dosage utilisée, il est important de souligner que les taux plasmatiques de testostérone peuvent ne pas refléter l'état réel du statut androgénique. Ils ne donnent pas d'information sur les effets intra-cellulaires et les actions biologiques des hormones sexuelles notamment via leur récepteur.

VI. CONCLUSION

Ce travail de thèse avait pour objet d'améliorer les connaissances concernant le rôle étiologique des androgènes dans le développement des maladies artérielles ischémiques (cardiopathies et accidents vasculaires cérébraux ischémiques). Pour répondre à cette question, nous avons utilisé les données de l'étude 3C, réalisée chez des hommes de plus de 65 ans, dans laquelle un schéma cas-cohorte a été mis en place pour l'évaluation des biomarqueurs.

Dans un premier temps, j'ai confirmé la relation entre la testostérone plasmatique et certains facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels. La variabilité de la testostérone est en effet expliquée en majorité par l'obésité et le diabète. Il n'est pas possible, cependant, d'établir si les faibles niveaux de testostérone sont responsables d'une obésité et/ou d'un diabète ou si ces deux phénomènes entraînent eux-mêmes une diminution des androgènes. J'ai également confirmé que la testostérone était corrélée négativement à l'épaisseur intima-média des artères carotidiennes et j'ai montré pour la première fois que cette association dépendait du statut inflammatoire. Ce résultat reste cependant difficile à interpréter et l'absence de lien direct entre la testostérone et la présence de plaques carotidiennes ne plaident pas en faveur d'un rôle étiologique important des androgènes dans l'athérosclérose.

Dans un second temps, j'ai montré que la testostérone plasmatique était associée à la survenue de maladies artérielles ischémiques. Les hommes ayant des taux élevés ou diminués de testostérone présentent un risque accru d'évènements artériels et cette relation ne dépend pas des principaux facteurs de risque cardiovasculaire. Une baisse des androgènes pourraient ainsi être impliquée dans le développement des maladies artérielles ischémiques et ce résultat est concordant avec les données récentes de la littérature. Cependant, certains arguments plaident en faveur d'une interprétation non causale. Outre les résultats des explorations carotidiennes dans l'étude 3C, une diminution de la testostérone est un prédicteur de mortalité toutes causes et d'évènements de santé non cardiovasculaire. La baisse des androgènes pourrait simplement refléter le vieillissement et être un marqueur non spécifique d'une dégradation de la santé en général. Il sera intéressant de ce point de vue d'étudier dans l'étude 3C les décès après 10 ans de surveillance. Un premier résultat portant sur 150 décès montre une relation en J entre la testostérone et la mortalité toutes causes (Annexe). L'analyse des données par causes spécifiques est en cours.

Enfin, les études les plus récentes concernant la supplémentation en testostérone chez les hommes montrent une augmentation du risque cardiovasculaire et ne supportent pas un rôle étiologique majeur de la baisse des androgènes dans l'athérothrombose. Le lien observé dans l'étude 3C entre des taux élevés de testostérone et la survenue d'une maladie artérielle ischémique peut être rapproché de cet effet délétère des androgènes.

Nos résultats suggèrent finalement que des taux moyens de testostérone circulants (4-5 ng/mL pour la testostérone totale) protègeraient des maladies artérielles ischémiques. Ce rôle modulateur des androgènes pourrait être lié à un processus de vieillissement précoce non spécifique.

ANNEXE

Testostérone et mortalité

Au cours des 4 années de suivi, 40 décès ont été observés chez les hommes appartenant à la sous-cohorte. Parmi ces décès, 23 étaient d'origine coronaire mais aucun décès dû aux accidents vasculaires cérébraux ischémiques n'a été détecté.

Après 10 ans de suivi, 135 décès ont été observés au sein de la sous-cohorte des hommes. Le Tableau 26 présente les RR de mortalité toutes causes après 10 ans de suivi associés aux formes de testostérone circulante dans la sous-cohorte 3C des hommes.

Tableau 26: Risques relatifs de mortalité toutes causes après 10 ans de suivi associés aux formes de testostérone circulante dans la sous-cohorte 3C des hommes

	Nombres d'évènements	Modèle 1 RR (95% IC)	Modèle 2 RR (95% IC)
Testostérone totale, ng/mL			
Q1 < 3.91	34	1.65 (0.95;2.84)	1.80 (1.03;3.13)
Q2 [3.91;4.86[	22	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [4.86;5.84[	25	1.30 (0.73;2.31)	1.32 (0.74;2.37)
Q4 [5.84;6.90[	25	1.44 (0.81;2.56)	1.42 (0.79;2.54)
Q5 ≥ 6.90	29	1.66 (0.95;2.91)	1.72 (0.95;3.09)
Test de la relation en J		*<0.01*	*<0.01*
Test de tendance linéaire		*0.59*	*0.78*
Ecart à la linéarité		*0.37*	*0.25*
Testostérone biodisponible, ng/mL			
Q1 < 2.33	36	1.25 (0.75;2.08)	1.37 (0.81;2.31)
Q2 [2.33;2.84[	27	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [2.84;3.33[	25	1.01 (0.58;1.73)	1.00 (0.57;1.74)
Q4 [3.33;4.01[	26	0.94 (0.55;1.62)	0.92 (0.53;1.60)
Q5 ≥ 4.01	21	1.00 (0.56;1.77)	1.01 (0.55;1.85)
Test de la relation en J		*<0.01*	*<0.01*
Test de tendance linéaire		*0.37*	*0.22*
Ecart à la linéarité		*0.97*	*0.89*
Testostérone libre, ng/mL			
Q1 < 0.09	39	1.38 (0.82;2.31)	1.40 (0.83;2.37)
Q2 [0.09;0.11[	25	1.00 (référence)	1.00 (référence)
Q3 [0.11;0.14[	27	1.00 (0.58;1.72)	0.94 (0.54;1.64)
Q4 [0.14;0.17[	20	0.82 (0.45;1.48)	0.70 (0.38;1.28)
Q5 ≥ 0.17	24	1.27 (0.72;2.25)	1.25 (0.70;2.23)
Test de la relation en J		*<0.01*	*<0.01*
Test de tendance linéaire		*0.43*	*0.25*
Ecart à la linéarité		*0.41*	*0.21*

Modèle 1, ajusté sur le centre d'étude.

Modèle 2, ajusté sur le centre d'étude, l'IMC, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, et la consommation tabagique.

ARTICLES

Author's personal copy

Atherosclerosis 223 (2012) 244–249

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Low plasma testosterone and elevated carotid intima-media thickness: Importance of low-grade inflammation in elderly men

Véronique Soisson [a,*], Sylvie Brailly-Tabard [b,c], Jean-Philippe Empana [d], Catherine Féart [e,f], Joanne Ryan [g], Marion Bertrand [h], Anne Guiochon-Mantel [b,c], Pierre-Yves Scarabin [a]

[a] Center for Research in Epidemiology and Population Health, U1018, Hormones and Cardiovascular Disease, University Paris-Sud, UMR-S 1018, Villejuif, France
[b] Service de Génétique moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital Bicêtre, APHP, Le Kremlin-Bicêtre, France
[c] Inserm UMR-S693, University Paris-Sud, IFR Bicêtre, France
[d] Inserm U970, Paris Cardiovascular Research Center, University Paris Descartes, UMR-S970, Sorbonne Paris Cité, France
[e] Inserm, ISPED, Centre Inserm U897-Épidémiologie-Biostatistiques, Bordeaux, France
[f] University Bordeaux, ISPED, Inserm U897-Épidémiologie-Biostatistiques, Bordeaux, France
[g] Inserm U1061, University Montpellier 1, France
[h] University Hospital and Faculty of Medicine of Dijon, Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 February 2012
Received in revised form
4 May 2012
Accepted 8 May 2012
Available online 16 May 2012

Keywords:
Testosterone
C-Reactive protein
Atherosclerosis
Elderly men

ABSTRACT

Context and objective: An inverse correlation between plasma testosterone levels and carotid intima-media thickness (IMT) has been reported in men. We investigated whether this association could be mediated or modified by traditional cardiovascular risk factors as well as inflammatory status.
Methods: In the Three-City population-based cohort study, 354 men aged 65 and over had available baseline data on hormones levels and carotid ultrasonography. Plasma concentrations of testosterone (total and bioavailable), estradiol and sex hormone-binding globulin (SHBG), together with cardiovascular risk factors were measured. IMT in plaque-free site and atherosclerotic plaques in the extracranial carotid arteries were determined using a standardized protocol. Multiple linear regression models were used to analyze this association and interaction study.
Results: Analyses with and without adjustment for cardiovascular risk factors showed that carotid IMT was inversely and significantly correlated with total and bioavailable testosterone levels but not with SHBG and estradiol levels. This association depended on C-reactive protein (CRP) levels (p for interaction <0.05). Among men with low-grade inflammation (CRP $\geq$2 mg/L), mean IMT was higher in subjects with bioavailable testosterone $\leq$ 3.2 ng/mL than in those with bioavailable testosterone $>$ 3.2 ng/mL (0.76 mm and 0.70 mm respectively, $p < 0.01$). By contrast, among men with CRP $\leq$ 2 mg/L, mean IMT was similar in both groups (0.72 mm and 0.71 mm respectively, $p = 0.77$). Similar results were found for total testosterone although not significant. No association was found between plasma hormones levels and atherosclerotic plaques.
Conclusion: In elderly men, low plasma testosterone is associated with elevated carotid intima-media thickness only in those with low-grade inflammation. Traditional risk factors have no mediator role.
© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aging in men causes a gradual decline of endogenous testosterone levels by approximately 1.5% per year [1]. A decrease in testosterone levels may have detrimental effects on health status and some studies support the beneficial effects of testosterone supplementation in men who have an age-related androgen deficiency [2]. Low plasma testosterone levels have been consistently related to an increased risk of all-cause mortality [3,4]. However, whether decreased testosterone levels play a role in the development of cardiovascular disease (CVD) remains uncertain [5]. Population-based prospective studies reported conflicting results regarding the association between testosterone and cardiovascular mortality [6–8]. Furthermore, despite inverse relationships between plasma testosterone levels and traditional cardiovascular risk factors such as obesity [9], high blood pressure [10] or dyslipidemia [11], most prospective studies of cardiovascular events led to null findings [8,12,13]. Nevertheless, a recent cohort study of elderly Swedish men demonstrated that high serum

* Corresponding author. Inserm CESP – U1018 – Eq08, 16 av. Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex, France. Tel.: +33 1 45 59 52 58; fax: +33 1 45 59 51 70.
E-mail address: veronique.soisson@inserm.fr (V. Soisson).

0021-9150/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.009

Author's personal copy

testosterone levels were linked to a 5-year reduced risk of cardiovascular events [14]. In addition, low testosterone levels predicted an increased incidence of stroke in the Health In Men Study [15].

Carotid intima-media thickness (IMT) has been widely used as a surrogate marker of atherosclerosis and a number of IMT determinants have been identified [16]. Several cross-sectional and longitudinal studies have shown an inverse association between testosterone levels and carotid IMT [17–20]. However, very few studies focused on men over the age of 65 and whether cardiovascular risk markers, including C-reactive protein (CRP) levels, modify the association of IMT with testosterone levels has not been established. Therefore, we have investigated the association between sex hormones and carotid atherosclerosis markers in men aged 65 years and older considering the mediator role or modifiers effects of cardiovascular risk factors.

2. Methods

2.1. Subjects and study design

The Three-City (3C) study is a French multicentric prospective cohort study. The protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Kremlin-Bicêtre and all participants gave a legal consent. The design and the baseline characteristics of the subjects have been described [21]. Briefly, 5644 women and 3650 men, aged 65 years and over, mostly Caucasian and not institutionalized, were recruited in 3 French cities (Bordeaux, Dijon, and Montpellier) between 1999 and 2001. Baseline data were collected during a face to face interview. Socio-demographic characteristics, education, smoking habits, alcohol consumption, medication use and medical history were systematically recorded. Finally, baseline ultrasound examination of the carotid arteries was proposed to participants aged <85 years and the rate of acceptance was 74%.

In order to investigate the association of biological markers with the risk of CVD or dementia, a case-cohort study was designed as described [22]. In practice, 495 men with baseline plasma sample were randomly selected from the initial cohort after stratification by center and age. Within the subcohort, there were 378 men who had both sex hormones and carotid data. Exclusions from the present analysis included a past history of prostate cancer or the use of hormone medication ($n = 17$) or incomplete biological measurements ($n = 1$) or incomplete IMT data ($n = 6$). The final sample included 354 men.

2.2. Sex hormones measurement

Blood samples were collected at baseline in the morning after an overnight fast. Blood samples were centrifugated at +4 °C at 3000 rpm for 15 min. Steroid sex hormones, Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) and albumin concentrations were centrally measured from EDTA aliquots stored at −80 °C. Total testosterone was assessed by a radioimmunoassay (RIA) method performed on an Orion Diagnostica device (Spectria, Espoo, Finland) with a minimum detectable concentration (MDC) of 0.02 ng/mL (0.06 nmol/L); the intra and inter-assay coefficients of variation were 3.8% and 4.8% respectively for a concentration of 3.2 ng/mL (11.4 nmol/L) and 4.8% and 5.5% for a concentration of 6.7 ng/mL (23.3 nmol/L). Among 44 healthy men, serum total testosterone values measured by RIA method (range: 0.23–8.20 ng/mL) were highly correlated with those obtained by gas chromatography/mass spectrometry method ($r = 0.95$). Bland–Altman analysis [23] showed that mean levels of testosterone given by RIA method were significantly 7% lower than those obtained by gas chromatography/mass spectrometry method (2.66 ng/mL and 2.85 ng/mL respectively, $p < 0.01$). A RIA method (Spectria® Orion Diagnostica, Espoo, Finland) was used to measure total estradiol with an MDC of 2.0 pg/mL (7.3 pmol/L) and intra and inter-assay coefficients of variation of 2.8% and 5.8% respectively for a concentration of 24 pg/mL (88 pmol/L). SHBG was measured with a solid-phase chemiluminescent immunometric assay (Immulite®, Siemens Health Diagnostic Products Llanberis, UK) with an MDC of 0.02 nmol/L. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 2.5% and 5.2% respectively at 21 nmol/L. Albumin was measured by colorimetry with bromocresol green (Albumin-Kit, BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France). The MDC was lower than 0.35 g/L (5 μmol/L) and the intra and inter-assay coefficients of variation were respectively 1.9% and 2.5% for a concentration of 49.2 g/L (714 μmol/L). The bioavailable testosterone concentration was measured by an indirect method after differential precipitations of testosterone bound to globulins with 50% ammonium sulfate and equilibration of the plasma sample with [^{3}H]-testosterone [24]. The intra and inter-assay coefficients of variation were respectively 7.0% and 8.5% for a concentration of 1.4 ng/mL.

2.3. High-sensitivity serum C-reactive protein measurement

High-sensitivity serum CRP was centrally measured using a particle-enhanced turbidimetric immunoassay [25]. The sensitivity and inter-assay coefficient of variation for this assay were 0.15 mg/L and 2.6%, respectively.

2.4. Ultrasonography

For the ultrasound examination, the B-mode system (Ultramark 9 HDI-High Definition Imaging) with a 5- to 10-MHz sounding was used at each of the 3 centers according a standardized procedure. A centralized reading was performed at the Reference Reading Center (Broussais Hospital, Paris) as described before [26]. The examination involved scanning of the common carotid arteries, the carotid bifurcations, and the origin of the internal carotid arteries. The presence of plaques was assessed at the time of the examination, as previously reported [27]. The carotid IMT was measured at a site free of any discrete plaque along a 10 mm-long segment of the far wall of the common carotid arteries. Carotid IMT was assessed as the distance between the lumen–intima interface and the media–adventitia interface using an automated edge detection algorithm. The carotid IMT value used in the analyses was a mean of right and left mean values.

2.5. Statistical analysis

Characteristics of men are given as mean (standard deviation) for continuous variables, as geometric mean (interquartile range, Q1–Q3) for log-transformed continuous variables, and as frequency (percentage) for categorical variables. Body-mass index (BMI, kg/m^2) and waist to hip ratio (WHR) were calculated. A pack-year was defined as twenty cigarettes smoked everyday for one year. Hypertension was defined as a systolic blood pressure ≥140 mmHg, a diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg, and/or the use of antihypertensive drug. Diabetes included a diagnosis of diabetes, a fasting blood glucose ≥ 7.0 mmol/L, or a treatment for diabetes. Subjects with a total cholesterol level ≥ 6.2 mmol/L (2.40 g/L) or using a lipid lowering drug were considered to be hypercholesterolemic. Total, and bioavailable testosterone were considered normally distributed. Total estradiol, SHBG and carotid IMT were log-transformed before analysis to approximate normal distribution. Multiple linear regressions were used to describe the associations between sex hormones levels and carotid atherosclerosis markers. Regression coefficients were adjusted for center and

Author's personal copy

age (model 1) as well as for traditional risk factors including BMI, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, pack-year smoking history, and personal history of cardiovascular disease and dementia (model 2). Interactions of sex hormones with cardiovascular risk factors in relation to atherosclerosis markers were systematically tested using a multiplicative linear model. We used the median of sex hormones distributions for stratified analysis. As proposed by Blaha [28], a cut-off value of 2 mg/L or more for the CRP values defined men with low-grade inflammation. Data were analyzed with standard procedures from the Statistical Analysis System (SAS 9.2 Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results

General, ultrasonographic and sex hormone data of the 354 men from the 3C subcohort are presented in Table 1. Mean age at baseline was 73.4 years (range, 65–85 years). Hypertension was very common, affecting 75.1% of men and 11.9% suffered from diabetes. Among men with hypercholesterolemia (41.2%), 57.5% used lipid lowering medications, including 52.4% taking HMG Co-A reductase inhibitors. The average of IMT was 0.72 mm. One or more carotid plaques were present in 51.7% of the subjects. The mean total and bioavailable testosterone levels were 5.6 ng/mL and 3.2 ng/mL, respectively. Geometric mean of E2 and SHBG were 18.6 pg/mL and 24.3 nmol/L respectively.

Log-IMT was positively correlated with age ($r = 0.33$, $p < 0.0001$) and log-CRP ($r = 0.09$, $p = 0.09$). Bioavailable testosterone was inversely correlated with age ($r = -0.12$, $p = 0.03$), BMI ($r = -0.19$, $p = 0.0004$) and WHR ($r = -0.22$, $p < 0.0001$). There was a negative correlation of total testosterone with BMI ($r = -0.21$, $p < 0.0001$) and WHR ($r = -0.20$, $p = 0.003$). Log-CRP was positively correlated with estradiol ($r = 0.25$, $p < 0.0001$), BMI ($r = -0.20$, $p = 0.0001$), and WHR ($r = -0.21$, $p < 0.0001$). No significant correlation was found between log-CRP and bioavailable or total testosterone ($r = -0.08$, $p = 014$ and $r = -0.06$, $p = 0.28$ respectively).

Multiple linear regression models are presented in Table 2. There were no significant relationships between carotid plaques and hormones levels. Total and bioavailable testosterone were significantly and inversely associated with log-IMT before and after adjustment for center, age, BMI, blood pressure, diabetes, hypercholesterolemia, pack-year smoking history, and prevalent diseases ($\beta = -0.020$ and -0.021, $p = 0.03$ and $p = 0.02$ respectively). Further adjustment for lipid lowering medications did not affect the results. Estradiol and SHBG were not significantly associated with carotid IMT after adjustment for traditional risk factors.

There was no significant interaction between sex hormones concentrations and cardiovascular risk factors in their relations to atherosclerosis markers. However, the association of bioavailable testosterone with carotid IMT depended on CRP levels (p for interaction <0.05). Changes in geometric mean of carotid IMT by bioavailable testosterone and CRP levels are shown in Fig. 1, after adjustment for traditional cardiovascular risk factors. Among men with low-grade inflammation (CRP $\geq$2 mg/L), mean IMT was higher in subjects with bioavailable testosterone $\leq$ 3.2 ng/mL than in those with bioavailable testosterone $>$ 3.2 ng/mL (0.76 mm and 0.70 mm respectively, $p = 0.002$). By contrast, among men with CRP $\leq$ 2 mg/L, mean IMT was similar in both groups (0.72 mm and 0.71 mm respectively, $p = 0.77$). Within each subgroup defined by inflammatory status, further adjustment for log-CRP levels did not substantially change the IMT differences related to bioavailable testosterone.

Table 1
Baseline characteristics of 354[a] elderly men from the 3C subcohort study.

	Mean (SD) or geometric mean (Q1–Q3) or *n* (%)
Age, years	73.4 (5.1)
BMI, kg/m^2	26.1 (3.2)
WHR	0.95 (0.06)
Lipids, mmol/L	
Total cholesterol	5.58 (0.88)
HDL cholesterol	1.41 (1.20–1.62)
LDL cholesterol	3.57 (0.77)
Triglycerides	1.17 (0.88–1.54)
Pack-year smoking history	
Never smoker	115 (33.5)
<20 pack-year	113 (33.0)
≥20 pack-year	115 (33.5)
Medical history	
Hypertension	266 (75.1)
Diabetes	42 (11.9)
Hypercholesterolemia	146 (41.2)
Cardiovascular disease	
Coronary heart disease	40 (11.3)
Stroke	21 (6.1)
Dementia	8 (2.3)
Hormone levels	
Total testosterone, ng/mL	5.6 (2.0)
Bioavailable testosterone, ng/mL	3.2 (1.1)
Total estradiol, pg/mL	18.6 (14.7–24.3)
SHBG, nmol/L	24.3 (17.9–31.9)
Carotid atherosclerosis markers	
Intima-media thickness, mm	0.72 (0.63–0.82)
Presence of carotid plaques	183 (51.7)
Inflammation	
C-reactive protein, mg/L	2.36 (1.20–4.19)

[a] Data were missing for BMI ($n = 1$), WHR ($n = 11$), LDL cholesterol ($n = 3$), pack-year smoking history ($n = 11$), stroke ($n = 7$), CRP ($n = 1$).

4. Discussion

In this population-based study of older men, plasma total and bioavailable testosterone levels were inversely correlated with carotid IMT. These associations were not mediated through the traditional risk factors. In addition, CRP levels significantly modified this association. To the best of our knowledge, this study is the first to report an interaction between testosterone and CRP in their relation with carotid IMT. In contrast to testosterone, neither SHBG nor estradiol was associated with carotid IMT. No association was found between carotid plaques and hormones levels.

Most previous studies reported an inverse association between reduced testosterone levels and markers of carotid atherosclerosis [5]. Low levels of endogenous androgens have also been related to an increased risk of aortic atherosclerosis [29] and peripheral arterial disease [30]. Although a recent study failed to find any association between serum testosterone levels and progression of carotid atherosclerosis [31], our data provide further evidence for a role of testosterone as a correlate of IMT, with a focus on men over 65 years. In contrast with IMT, data on carotid plaques in relation to sex hormones are sparse and conflicting [32,33]. In the 3C study, low testosterone levels were associated with carotid IMT in plaque-free site but not with carotid plaques. This result suggests that low levels of androgens are involved in early atherosclerosis rather than in the development of more advanced lesions. However, the significance of carotid IMT as a marker of atherosclerosis has been questioned [34] and a meta-analysis have shown that carotid plaque was more closely related to coronary events than carotid IMT [35]. In addition, carotid plaque, but not IMT, was an independent predictor of coronary heart disease in the 3C study [36]. Thus, low testosterone could be relevant to vascular aging process in the absence of overt atherosclerosis.

The association of testosterone with carotid IMT was stronger for bioavailable testosterone than for total testosterone. This

Author's personal copy

Table 2
Linear regression coefficients (95% confidence interval) for the relation of endogenous hormones levels with carotid atherosclerosis markers among 354 elderly men from the 3C subcohort study.

Hormone levels	IMT				Carotid plaques			
	Model 1		Model 2		Model 1		Model 2	
	β^a (95% CI)	p	β^a (95% CI)	p	β^b (95% CI)	p	β^b (95% CI)	p
Total testosterone, ng/mL	−0.022 (−0.039; −0.004)	0.01	−0.020 (−0.038; −0.002)	0.03	0.094 (−0.351; 0.540)	0.68	0.182 (−0.301; 0.665)	0.46
Bio testosterone, ng/mL	−0.024 (−0.036; −0.005)	<0.01	−0.021 (−0.040; −0.003)	0.02	−0.023 (−0.275; 0.229)	0.86	0.045 (−0.229; 0.320)	0.74
Estradiol (log), pg/mL	−0.015 (−0.039; 0.003)	0.10	−0.015 (−0.033; 0.003)	0.11	−0.011 (−0.102; 0.080)	0.81	0.040 (−0.060; 0.140)	0.43
SHBG (log), nmol/L	−0.007 (−0.026; 0.012)	0.46	−0.012 (−0.032; 0.006)	0.19	−0.011 (−0.098; 0.076)	0.80	−0.026 (−0.121; 0.068)	0.53

Model 1 ($n = 354$), adjusted for age and center.
Model 2 ($n = 337$), adjusted for age, center, BMI, blood pressure, diabetes, hypercholesterolemia, pack-year smoking history, and prevalent diseases.
[a] Change in log-IMT associated with 1 SD increase in the distribution of hormones levels (or log-distribution).
[b] Difference in mean levels of hormones by carotid plaques (no/yes).

finding is in agreement with previous data [19,29] and is consistent with the concept that free or albumin-associated testosterone have more rapid access to target tissues and are more biologically active than testosterone bound to SHBG [37]. However, this bioavailable hormone hypothesis has been questioned and remains under debate [38]. There is no agreement on the accuracy of the formulas frequently used for calculated free testosterone values [38]. Our primary analysis focused on measured not calculated sex hormones and, therefore, free testosterone data were not reported.

Few studies have examined the relation of carotid atherosclerosis with estradiol levels and SHBG levels. An inverse relation between plasma estradiol levels and IMT has been reported in diabetic men [39], while elevated estradiol was an independent predictor of progression of carotid IMT in healthy middle-aged men [40]. In our study, SHBG and estradiol levels were unrelated with measures of carotid atherosclerosis. Thus, the role of estradiol and SHBG in the development of carotid atherosclerosis in men remains uncertain and requires further data.

Elevated IMT was observed among men with both low bioavailable testosterone and high CRP levels. This result is consistent with previous data showing that low testosterone is related with an adverse cardiovascular risk profile [2]. In addition, low testosterone and low-grade chronic inflammation are predictors of cardiovascular events [14] and mortality [41,42]. Interestingly, elevated CRP was associated with increased cardiovascular risk and all-cause mortality only in those with detectable carotid atherosclerosis [43]. Our findings of an interaction between testosterone and CRP in the development of early atherosclerosis provide further evidence supporting the hypothesis that modulation of inflammatory processes might be one of the pathways by which androgens affect cardiometabolic risk [2]. While some experimental data support an immunomodulatory role of testosterone that could potentially protect against atherogenesis, results from previous studies of association between endogenous sex hormones and inflammatory markers have not been consistent [44]. A robust negative correlation between serum testosterone and

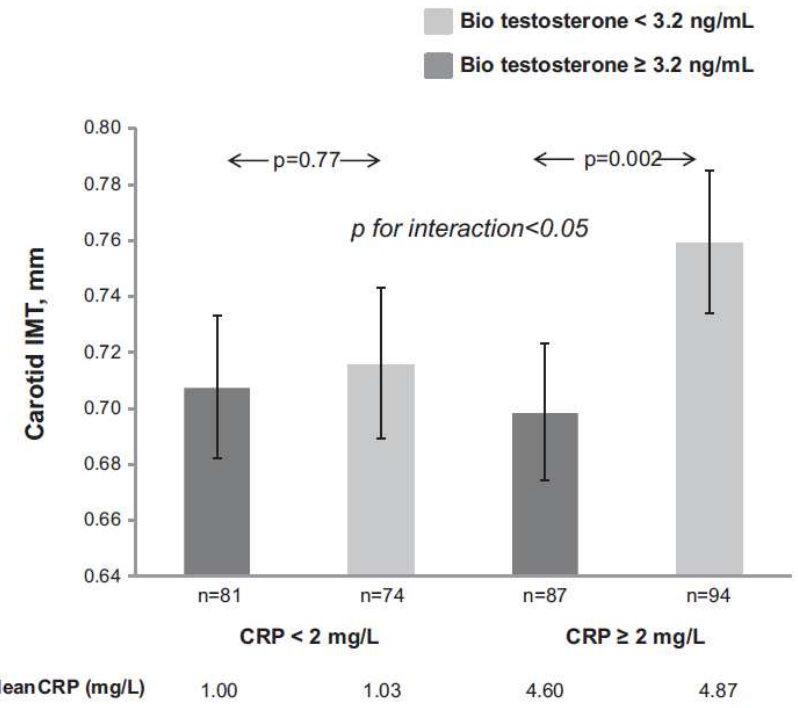


Fig. 1. Geometric means (95% confidence interval) of carotid IMT, adjusted for traditional cardiovascular risk factors, by plasma bioavailable testosterone and CRP levels among 354 elderly men from the 3C subcohort study.

Author's personal copy

CRP levels have been reported in healthy men [45,46], whereas increased levels of circulating estradiol were related to higher CRP levels in another population-based study [47]. The Rancho Bernardo study suggested that elevated mortality in men with low testosterone could be mediated in part through inflammatory process. However, stratified analysis showed that testosterone was not associated with mortality in men with elevated levels of CRP [46]. Our study failed to confirm a significant negative correlation between plasma testosterone and CRP levels. While the reasons for such a discrepancy remain unclear, further data on the role of sex hormones in inflammation are clearly required.

Alternatively, the combined effects of androgens and inflammation on atherosclerosis could be mediated through blood coagulation and fibrinolysis. Low levels of androgens may induce a hypercoagulability in men [48–50]. In addition, inflammation is closely related to platelets and coagulation system in some conditions and there is evidence that haemostatic variables may contribute to atherogenesis [51].

Other mechanisms could also explain our findings. Previous studies emphasized the crucial role of adiposity on circulating levels of testosterone [2] and inflammatory markers such as CRP [52]. A strong inverse association between obesity and serum testosterone levels has been consistently reported [53] and visceral adipose tissue is an important source of cytokines thereby contributing to proinflammatory [2] and prothrombotic state [54]. In our data, adjustment for BMI and WHR did not substantially affect the results. Nevertheless, elevated BMI and WHR may be an approximate assessment of fat mass and therefore, we cannot exclude an important role of adiposity in interpretating our findings. Further data including measurement of fat mass are required.

Other components of the metabolic syndrome and diabetes could also explain our results since both have been consistently related to high CRP levels and low circulating testosterone in men [2]. Although adjustment for cardiovascular risk factors and comorbidities made no material change to the results, residual confounding cannot be excluded and low testosterone together with high CRP levels could be merely a marker of illness and/or aging without any causal role in CVD.

One major limitation of our study is related to the specific-method variability in testosterone measurement by RIAs. In men, most testosterone assays have adequate sensitivity but are relatively inaccurate [55]. The lack of accuracy also applies to bioavailable testosterone [56] as well as to estradiol measurement by direct RIAs [57]. Our method comparison data showed that RIA underestimated the mass spectrometry-based methodology values but provided accurate results in term of relative ranking by hormone level. RIA measurements may thus be appropriate for epidemiologic studies in which population level inferences are more of interest than subject-specific inferences. While RIA-related measurement error may be notable at low levels of sex hormones, such a limitation lead to underestimate, not cause, associations between sex hormone and subclinical atherosclerosis [57]. Secondly, the study population consisted of volunteer community-dwelling older men, and, therefore, our findings may not be generalized to the French general population neither to the men younger than 65 years. Furthermore, our results were based on an almost entirely Caucasian community and may not apply to other ethnic groups. Third, our data rely on a single measurement of biomarkers and the large within-subject variability of sex hormones may have resulted in a lack of statistical power. However, all plasma samples were collected in the morning thus reducing changes in sex hormones due to diurnal variation [58]. Finally, interpretation of the results may be limited by the cross-sectional nature of our study. The temporal sequence of causality or specific mechanisms of action cannot be strictly assessed from our data and follow-up studies should be performed to confirm these results.

In conclusion, low bioavailable testosterone combined with high CRP levels are associated with elevated carotid IMT in elderly men. If confirmed in large-scale epidemiologic studies using well-validated gas chromatography/mass spectrometry, our data could be useful for detecting individuals expected to have an increased burden of atherosclerosis as well as an elevated risk of arterial disease. Information on inflammatory status could also be used for future trials assessing the benefit and safety of testosterone replacement therapy with respect to CVD.

Disclosures

None.

Acknowledgment

The Three-City Study is conducted under a partnership agreement between the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Victor Segalen-Bordeaux II University, and Sanofi-Aventis. The Fondation pour la Recherche Médicale funded preparation and initiation of the study. The Three-City Study is also supported by the Caisse Nationale Maladie des Travailleurs Salariés, Direction Générale de la Santé, MGEN, Institut de la Longévité, Conseils Régionaux of Aquitaine and Bourgogne, Fondation de France, and Ministry of Research-INSERM Programme "Cohortes et collections de données biologiques." The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Biological assays regarding haemostatic parameters was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2007-LVIE-005-01).

References

[1] Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2002;87:589–98.
[2] Jones TH. Testosterone deficiency: a risk factor for cardiovascular disease? Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM 2010;21:496–503.
[3] Araujo AB, Dixon JM, Suarez EA, Murad MH, Guey LT, Wittert GA. Clinical review: endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2011;96:3007–19.
[4] Ruige JB, Mahmoud AM, De Bacquer D, Kaufman JM. Endogenous testosterone and cardiovascular disease in healthy men: a meta-analysis. Heart (British Cardiac Society); 2011.
[5] Yeap BB. Androgens and cardiovascular disease, Current opinion in endocrinology. Diabetes, and Obesity 2010;17:269–76.
[6] Barrett-Connor E, Khaw KT. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A prospective population-based study. Circulation 1988;78:539–45.
[7] Khaw KT, Dowsett M, Folkerd E, Bingham S, Wareham N, Luben R, et al. Endogenous testosterone and mortality due to all causes, cardiovascular disease, and cancer in men: European prospective investigation into cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) prospective population study. Circulation 2007;116:2694–701.
[8] Vikan T, Schirmer H, Njolstad I, Svartberg J. Endogenous sex hormones and the prospective association with cardiovascular disease and mortality in men: the Tromso study. European Journal of Endocrinology/European Federation of Endocrine Societies 2009;161:435–42.
[9] Svartberg J, von Muhlen D, Sundsfjord J, Jorde R. Waist circumference and testosterone levels in community dwelling men. The Tromso study. European Journal of Epidemiology 2004;19:657–63.
[10] Khaw KT, Barrett-Connor E. Blood pressure and endogenous testosterone in men: an inverse relationship. Journal of Hypertension 1988;6:329–32.
[11] Khaw KT, Barrett-Connor E. Endogenous sex hormones, high density lipoprotein cholesterol, and other lipoprotein fractions in men. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 1991;11:489–94.
[12] Arnlov J, Pencina MJ, Amin S, Nam BH, Benjamin EJ, Murabito JM, et al. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease incidence in men. Annals of Internal Medicine 2006;145:176–84.

Author's personal copy

[13] Smith GD, Ben-Shlomo Y, Beswick A, Yarnell J, Lightman S, Elwood P. Cortisol, testosterone, and coronary heart disease: prospective evidence from the Caerphilly study. Circulation 2005;112:332–40.
[14] Ohlsson C, Barrett-Connor E, Bhasin S, Orwoll E, Labrie F, Karlsson MK, et al. High serum testosterone is associated with reduced risk of cardiovascular events in elderly men. The MrOS (Osteoporotic fractures in men) study in Sweden. Journal of the American College of Cardiology 2011;58:1674–81.
[15] Yeap BB, Hyde Z, Almeida OP, Norman PE, Chubb SA, Jamrozik K, et al. Lower testosterone levels predict incident stroke and transient ischemic attack in older men. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2009;94:2353–9.
[16] Salonen R, Salonen JT. Determinants of carotid intima-media thickness: a population-based ultrasonography study in eastern Finnish men. Journal of Internal Medicine 1991;229:225–31.
[17] Svartberg J, von Muhlen D, Mathiesen E, Joakimsen O, Bonaa KH, Stensland-Bugge E. Low testosterone levels are associated with carotid atherosclerosis in men. Journal of Internal Medicine 2006;259:576–82.
[18] De Pergola G, Pannacciulli N, Ciccone M, Tartagni M, Rizzon P, Giorgino R. Free testosterone plasma levels are negatively associated with the intima-media thickness of the common carotid artery in overweight and obese glucose-tolerant young adult men. International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders 2003;27:803–7.
[19] Muller M, van den Beld AW, Bots ML, Grobbee DE, Lamberts SW, van der Schouw YT. Endogenous sex hormones and progression of carotid atherosclerosis in elderly men. Circulation 2004;109:2074–9.
[20] Makinen J, Jarvisalo MJ, Pollanen P, Perheentupa A, Irjala K, Koskenvuo M, et al. Increased carotid atherosclerosis in andropausal middle-aged men. Journal of the American College of Cardiology 2005;45:1603–8.
[21] 3C Study Group. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-city study and baseline characteristics of the study population. Neuroepidemiology 2003;22:316–25.
[22] Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetiere P, Ritchie K, et al. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-city cohort study. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2011;31:1445–51.
[23] Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;1:307–10.
[24] Loric S, Guechot J, Duron F, Aubert P, Giboudeau J. Determination of testosterone in serum not bound by sex-hormone-binding globulin: diagnostic value in hirsute women. Clinical Chemistry 1988;34:1826–9.
[25] Straczek C, Ducimetiere P, Barberger-Gateau P, Helmer C, Ritchie K, Jouven X, et al. Higher level of systemic C-reactive protein is independently predictive of coronary heart disease in older community-dwelling adults: the three-city study. Journal of the American Geriatrics Society 2010;58:129–35.
[26] Zureik M, Gariepy J, Courbon D, Dartigues JF, Ritchie K, Tzourio C, et al. Alcohol consumption and carotid artery structure in older French adults: the Three-City Study, Stroke. Journal of Cerebral Circulation 2004;35:2770–5.
[27] Zureik M, Ducimetiere P, Touboul PJ, Courbon D, Bonithon-Kopp C, Berr C, et al. Common carotid intima-media thickness predicts occurrence of carotid atherosclerotic plaques: longitudinal results from the aging vascular study (EVA) study. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2000;20:1622–9.
[28] Blaha MJ, Rivera JJ, Budoff MJ, Blankstein R, Agatston A, O'Leary DH, et al. Association between obesity, high-sensitivity C-reactive protein >/=2 mg/L, and subclinical atherosclerosis: implications of JUPITER from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2011;31:1430–8.
[29] Hak AE, Witteman JC, de Jong FH, Geerlings MI, Hofman A, et al. Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: the Rotterdam study. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2002;87:3632–9.
[30] Tivesten A, Mellstrom D, Jutberger H, Fagerberg B, Lernfelt B, Orwoll E, et al. Low serum testosterone and high serum estradiol associate with lower extremity peripheral arterial disease in elderly men. The MrOS study in Sweden. Journal of the American College of Cardiology 2007;50:1070–6.
[31] Vikan T, Johnsen SH, Schirmer H, Njolstad I, Svartberg J. Endogenous testosterone and the prospective association with carotid atherosclerosis in men: the Tromso study. European Journal of Epidemiology 2009;24:289–95.
[32] van den Beld AW, Bots ML, Janssen JA, Pols HA, Lamberts SW, Grobbee DE. Endogenous hormones and carotid atherosclerosis in elderly men. American Journal of Epidemiology 2003;157:25–31.
[33] Dorr M, Wallaschofski H, Friedrich N. Association of low total testosterone levels and prevalent carotid plaques: result of the study of health in Pomerania. European Journal of Epidemiology 2009;24:389–91.
[34] Spence JD, Rundek T. Toward clinical Applications of carotid ultrasound: intima-media thickness, plaque area, and three-dimensional phenotypes. In: Nicolaides A, editor. Ultrasound and carotid bifurcation atherosclerosis. Springer; 2012.
[35] Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. Atherosclerosis 2012;220:128–33.
[36] Plichart M, Celermajer DS, Zureik M, Helmer C, Jouven X, Ritchie K, et al. Carotid intima-media thickness in plaque-free site, carotid plaques and coronary heart disease risk prediction in older adults. The three-city study. Atherosclerosis 2011;219:917–24.
[37] Dai WS, Kuller LH, LaPorte RE, Gutai JP, Falvo-Gerard L, Caggiula A. The epidemiology of plasma testosterone levels in middle-aged men. American Journal of Epidemiology 1981;114:804–16.
[38] Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease. Endocrine Reviews 2003;24:313–40.
[39] Fukui M, Kitagawa Y, Kamiuchi K, Hasegawa G, Yoshikawa T, Nakamura N. Association between serum estradiol concentrations and carotid atherosclerosis in men with type 2 diabetes mellitus. Metabolism: Clinical and Experimental 2008;57:285–9.
[40] Tivesten A, Hulthe J, Wallenfeldt K, Wikstrand J, Ohlsson C, Fagerberg B. Circulating estradiol is an independent predictor of progression of carotid artery intima-media thickness in middle-aged men. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2006;91:4433–7.
[41] Hyde Z, Norman PE, Flicker L, Hankey GJ, Almeida OP, McCaul KA, et al. Low free testosterone predicts mortality from cardiovascular disease but not other causes: the health in men study. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism; 2012.
[42] Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. Lancet 2010;375:132–40.
[43] Cao JJ, Arnold AM, Manolio TA, Polak JF, Psaty BM, Hirsch CH, et al. Association of carotid artery intima-media thickness, plaques, and C-reactive protein with future cardiovascular disease and all-cause mortality: the cardiovascular health study. Circulation 2007;116:32–8.
[44] Jones TH, Saad F. The effects of testosterone on risk factors for, and the mediators of, the atherosclerotic process. Atherosclerosis 2009;207:318–27.
[45] Kupelian V, Chiu GR, Araujo AB, Williams RE, Clark RV, McKinlay JB. Association of sex hormones and C-reactive protein levels in men. Clinical Endocrinology 2010;72:527–33.
[46] Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J. Low serum testosterone and mortality in older men. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2008;93:68–75.
[47] Nakhai Pour HR, Grobbee DE, Muller M, van der Schouw YT. Association of endogenous sex hormone with C-reactive protein levels in middle-aged and elderly men. Clinical Endocrinology 2007;66:394–8.
[48] Bonithon-Kopp C, Scarabin PY, Bara L, Castanier M, Jacqueson A, Roger M. Relationship between sex hormones and haemostatic factors in healthy middle-aged men. Atherosclerosis 1988;71:71–6.
[49] Caron P, Bennet A, Camare R, Louvet JP, Boneu B, Sie P. Plasminogen activator inhibitor in plasma is related to testosterone in men. Metabolism: Clinical and Experimental 1989;38:1010–5.
[50] Yang XC, Jing TY, Resnick LM, Phillips GB. Relation of hemostatic risk factors to other risk factors for coronary heart disease and to sex hormones in men. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 1993;13:467–71.
[51] Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. The New England Journal of Medicine 2011;364:1746–60.
[52] Yudkin JS. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. Hormone and Metabolic Research/Hormon- und Stoffwechselforschung/Hormones Et Metabolisme 2007;39:707–9.
[53] Blouin K, Boivin A, Tchernof A. Androgens and body fat distribution. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2008;108:272–80.
[54] Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. Current Opinion in Lipidology 2007;18:240–5.
[55] Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an endocrine society position statement. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2007;92:405–13.
[56] Matsumoto AM, Bremner WJ. Serum testosterone assays–accuracy matters. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2004;89:520–4.
[57] Toniolo P, Lukanova A. The challenge of measuring circulating estradiol at low concentrations. Breast Cancer Research 2005;7:45–7.
[58] Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2009;94:907–13.

Maturitas 75 (2013) 282–288

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Maturitas

journal homepage: www.elsevier.com/locate/maturitas

A J-shaped association between plasma testosterone and risk of ischemic arterial event in elderly men: The French 3C cohort study

Véronique Soisson[a,b,*], Sylvie Brailly-Tabard[c,d], Catherine Helmer[e], Olivier Rouaud[f], Marie-Laure Ancelin[g], Chahinez Zerhouni[h], Anne Guiochon-Mantel[c,d], Pierre-Yves Scarabin[a,b]

[a] Inserm, Center for Research in Epidemiology and Population Health, U1018, Hormones and Cardiovascular Disease Team, F-94807 Villejuif, France
[b] University of Paris-Sud, UMR-S 1018, F-94807 Villejuif, France
[c] Service de Génétique moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital Bicêtre, APHP, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre, France
[d] University of Paris-Sud, UMR-S 693, IFR Bicêtre, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre, France
[e] Inserm, ISPED, Centre Inserm U897-Épidémiologie-Biostatistiques, F-33076 Bordeaux, France
[f] Département de neurologie CHU Dijon, F-21079 Dijon, France
[g] Inserm U1061, Université Montpellier 1, Montpellier, France
[h] Inserm U708, Neuro-Epidémiologie, Hôpital de la Salpêtrière, F-75013 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 March 2013
Received in revised form 15 April 2013
Accepted 22 April 2013

Keywords:
Testosterone
Ischemic arterial disease
Epidemiology
Elderly men

ABSTRACT

Objectives: Low plasma testosterone is associated with increased mortality in men. However, the relation between testosterone and cardiovascular disease is uncertain. We assessed the association of plasma sex hormones with the incidence of ischemic arterial disease (IAD) in elderly men.
Methods: We used data from the French Three-City prospective cohort study (3650 men aged >65 years). A case-cohort design was set up including a random sample of 495 men and 146 incident cases of first IAD event (112 coronary heart disease (CHD) and 34 strokes) after a 4-year follow-up. Plasma total and bioavailable testosterone, total estradiol and sex hormone-binding globulin (SHBG) were measured at baseline. Multivariate hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals for IAD were assessed using Cox model.
Results: After adjustment for cardiovascular risk factors, a J-shaped association between plasma total testosterone and IAD risk was found ($p < 0.01$). The HRs associated with the lowest and the highest total testosterone quintiles relative to the second quintile were 2.23 (95% CI: 1.02; 4.88) and 3.61 (95% CI: 1.55; 8.45) respectively. Additional analysis for CHD showed similar results (HR: 3.11, 95% CI: 1.27; 7.63 and HR: 4.75, 95% CI: 1.75; 12.92, respectively). Similar J-shaped association was observed between bioavailable testosterone and IAD risk ($p = 0.01$). No significant association of estradiol and SHBG with IAD was found.
Conclusion: High and low plasma testosterone levels are associated with an increased risk of IAD in elderly men. Optimal range of plasma testosterone may confer cardiovascular protection and these results may have clinical implications in the management of testosterone deficiency.
© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Testosterone, the most important plasma androgen produced in men, progressively declines for the remainder of life about the age of thirty [1]. This decrease is thought to underlie many of symptoms and diseases of aging, and testosterone supplementation can provide beneficial metabolic effects in men who have signs and symptoms of hypogonadism [2,3]. Consistent data provided evidence for an association between low testosterone levels and increased risk of all-cause mortality in men [4]. However, the role of testosterone in the development of ischemic arterial diseases (IAD) remains uncertain.

Several studies have investigated the relation between endogenous testosterone and risk of death from cardiovascular diseases and they led to conflicting results. In the Health in Men Study, low testosterone levels were associated with increased of death from cardiovascular disease [5], whereas no significant association was found with androgen levels in the Rancho Bernado Study [6]. Moreover, higher levels of testosterone were associated with increased cardiovascular mortality in a prospective population-based cohort study [7]. For a long time large prospective studies failed to find significant associations between testosterone levels and risk of cardiovascular events in middle-aged men [8,9]. More recently, however, high serum testosterone levels were associated with a

* Corresponding author at: Center for Research in Epidemiology and Population Health (CESP UMR-S 1018), 16 Avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex, France. Tel.: +33 1 45 59 51 66; fax: +33 1 45 59 51 70.
E-mail address: veronique.soisson@inserm.fr (V. Soisson).

0378-5122/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.04.012

5-year reduced risk of cardiovascular events in a cohort study of elderly Swedish men [10]. This is consistent with the influence of testosterone levels on multiple risk factors for cardiovascular disease. Indeed, inverse associations were found between testosterone levels and obesity, diabetes, blood pressure and carotid atherosclerosis [11,12], whereas a positive association was reported between testosterone levels and HDL cholesterol [13].

Few studies focused on the relation between plasma testosterone levels and risk of cardiovascular events, especially in elderly men. In addition, since low and high testosterone levels have been associated with cardiovascular mortality, the relation between testosterone levels and risk of cardiovascular events may not be linear. Accordingly, we examined the association of plasma testosterone with the 4-year incidence of first IAD among men aged over 65 years from the French Three-City (3C) cohort study. Since sex hormone-binding globulin (SHBG) is an important determinant of total testosterone levels and testosterone may exert its effect by conversion to estradiol [1], plasma SHBG and estradiol were also taken into account.

2. Methods

2.1. Study population

The Three-City (3C) Study is a multicentric prospective cohort study aimed to evaluate the risk of coronary heart disease (CHD), stroke and dementia in older community-dwelling subjects. The Ethics Committee of the University of Hospital of Kremlin-Bicêtre approved the study protocol and an informed consent was obtained from each participant. The general methodology was described elsewhere [14]. Briefly, between 1999 and 2001, 9294 subjects (3650 men and 5644 women) aged over 65 years were selected from the electoral rolls of 3 French cities (Bordeaux, Dijon and Montpellier). At baseline trained psychologists or nurses gathered information on socio-demographic characteristics, education level, smoking status, consumption of alcohol, medical history and medication use during a face to face interview. In addition, blood pressure, height and weight were measured during a clinical examination.

2.2. Follow-up and event ascertainment

After their recruitment, subjects have been followed every 2 years at home or at the study center for the detection of cardiovascular events and dementia. The 4-year follow-up was selected for the present analysis. IAD included CHD events (fatal or nonfatal) and ischemic stroke (fatal or nonfatal). Subjects who were hospitalized with stable or unstable angina pectoris, coronary dilatation, artery bypass, myocardial infarction, or subjects who died from CHD were classified as CHD cases. Nonfatal CHD events were documented by using hospital charts and practitioners' reports. CHD deaths were documented by reviewing hospital records, medical data obtained from family physicians or specialists, and proxy interviews (coded I210 to I219, I251 to I259, I461 and R960). All CHD events were adjudicated by an independent trained physicians committee. Stroke was defined as a rapid onset of neurological deficit lasting >24 h and confirmed by a lesion compatible with an acute stroke on computed tomography or magnetic resonance imaging of the brain. Imaging brain allowed drawing a distinction between ischemic or hemorrhagic stroke. We excluded hemorrhagic stroke for this analysis. Similarly, all stroke events were validated by an independent medical committee. The first ischemic arterial event has been chosen for subjects with both CHD and ischemic stroke during follow-up.

2.3. Case-cohort design

A case-cohort study was conducted from the 3C study to investigate the association of blood biomarkers with cardiovascular risk and dementia. This design has been detailed [15] and consists of a random sample from the total cohort as well as all incident first-time IAD cases. Advantages of the case-cohort versus nested case-control design have been described [16]. Briefly, 1254 subjects (759 women and 495 men) were randomly selected from the initial cohort after stratification by study center, sex and age. After exclusions including history of prostate cancer ($n = 17$), receiving hormonal therapy ($n = 5$), prevalent CHD ($n = 60$) or stroke ($n = 21$), 392 men were selected from the random subcohort. Data on incident ischemic arterial status were missing for 24 men. During the 4 years of follow-up, 345 men remained free of IAD and 23 incident IAD events occurred in this subcohort. Similar exclusion criteria were applied to the outside subcohort and 123 additional IAD cases were added for final comparisons. From the 146 incident cases of IAD, 112 were CHD events and 34 were ischemic strokes (Fig. 1).

2.4. Biochemical assessment of sex hormones

At baseline, blood samples were collected for 90% of the entire cohort in the morning after an overnight fast. EDTA plasmas were generated by 1 centrifugation (3000 × *g* at 4 °C) and aliquots were stored at −80 °C in 1-mL plastic tubes until use. A radioimmunoassay (RIA) method (Spectria® Orion Diagnostica, Espoo, Finland) was used to measure total testosterone (minimum detectable concentration (MDC) = 0.02 ng/mL) and estradiol (MDC = 2.0 pg/mL). The intra and inter-assay coefficients of variation (CVs) were 3.8% and 4.8% respectively for a total testosterone concentration of 3.2 ng/mL and 4.8% and 5.5% for a total testosterone concentration of 6.7 ng/mL. The intra and inter-assay CVs were 2.8% and 5.8% for a total estradiol concentration of 24 pg/mL. A solid-phase chemiluminescent immunometric assay (Immulite®, Siemens Health Diagnostic Products Llanberis, UK) was used to measure SHBG (MDC = 0.02 nmol/L). The intra and inter-assay CVs were 2.5% and 5.2% at 21 nmol/L. A bromocresol green colorimetric method was used to measure albumin with an MDC lower than 0.35 g/L. The intra and inter-assay CVs were 1.9% and 2.5% for an albumin concentration of 49.2 g/L. The bioavailable testosterone concentration was assessed by an indirect method after differential precipitations of testosterone bound to globulins with 50% ammonium sulfate and equilibration of the plasma sample with [^{3}H]-testosterone [17]. The intra and inter-assay CVs were 7.0% and 8.5% for a bioavailable testosterone concentration of 1.4 ng/mL.

2.5. Statistical analysis

Baseline characteristics of men are presented as frequencies for categorical variables, as arithmetic means and standard deviation for continuous variables and, as geometric mean and interquartile range (Q1–Q3) for log-transformed continuous variables. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by the height squared (m^2). Smoking status was defined in three categories (never, past and current). Hypertension was characterized according to the World Health Organization criteria by a systolic blood pressure ≥140 mmHg or a diastolic blood pressure ≥90 mmHg, and/or by using a current blood-pressure-lowering therapy. Hypercholesterolemia was defined as a total cholesterol ≥6.2 mmol/L (2.4 g/L) and/or a cholesterol-lowering therapy and diabetes as a fasting blood glucose of 7 mmol/L and/or a treatment for diabetes. Baseline characteristics of men with and without incident ischemic arterial disease were compared by chi-square test and 2-tailed Student's *t*-test. Hazard ratios (HRs) for cardiovascular events and 95% confidence intervals (95% CI) were computed with

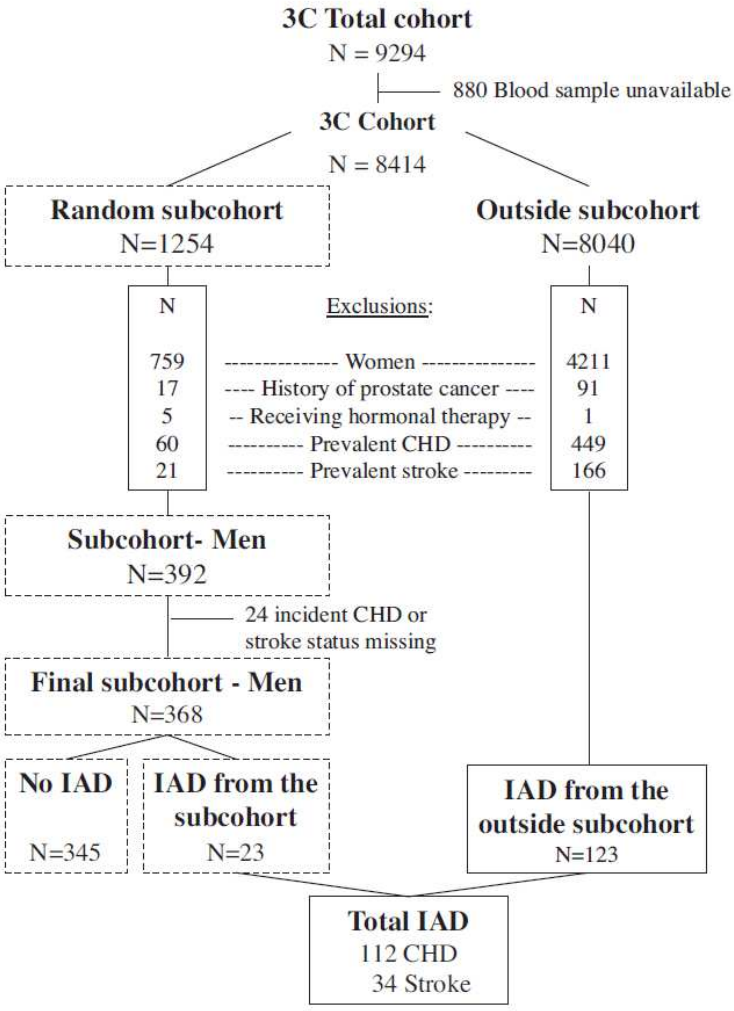


Fig. 1. Flowchart of the 3C case-cohort study for the investigation of first ischemic arterial event in relation to sex hormone levels in men.

a weighted Cox proportional hazards regression model adapted for the case-cohort design [18]. We used the weighting method proposed by Barlow [19]. As age is strongly related to arterial disease, age was used as the timescale for all analyses as recommended [20]. Two models are presented: the first one was adjusted for age (timescale) and center, and the second one was adjusted for age (timescale), center and traditional cardiovascular risk factors, including BMI, smoking status, diabetes, hypertension and hypercholesterolemia. The proportional hazards assumption was tested graphically using log-minus-log plots. Likelihood-ratio tests were used to assess the deviation from linearity of the relation between sex hormones levels and IAD. Nonlinear (J-shaped or U-shaped) associations between sex hormones and IAD were also evaluated including linear and quadratic terms for sex hormones in the models. Sex hormones levels were examined as quintiles based on distribution in men from the final subcohort. We have chosen the second quintile as a reference group for J-shaped associations. No significant interactions between hormones levels and IAD risk factors were detected. We performed statistical analyses using standard procedures from the Statistical Analysis System (SAS 9.2 Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results

Baseline characteristics of men with and without incident ischemic arterial disease are showed in Table 1. Cases were significantly older than noncase subjects (73.4 and 74.7 years respectively, $p = 0.01$). BMI was similar in both groups. The proportion of smokers was significantly different among cases and noncase subjects. Cases of IAD tended to be more hypertensive, hypercholesterolemic, and were more likely to have diabetes (20.8% and 10.7% respectively, $p < 0.01$) than noncases. Similar sex hormone mean levels were found among men with and without ischemic arterial disease.

Table 2 shows the baseline characteristics of the whole sample and by quintiles of plasma total testosterone levels. Body mass index decreased with increasing levels of total testosterone (p for trend <0.01). Similarly, men with the lowest testosterone levels were more likely to have diabetes (borderline significant $p = 0.06$). Levels of plasma estradiol and SHBG were positively associated with total testosterone levels (p for trend < 0.01 for both).

HRs for IAD, CHD, and ischemic stroke by quintiles of plasma testosterone are showed in Table 3. A significant J-shaped

Table 1
Baseline characteristics of men with and without incident ischemic arterial event during a 4-year follow-up from the 3C case-cohort study.

	Noncases (n = 345)	Ischemic arterial event cases (n = 146)	p
Age, years	73.4 (5.4)	74.7 (5.2)	*0.01*
BMI[a], kg/m^2	26.1 (3.2)	26.1 (3.1)	*0.95*
Study center			
Bordeaux	73 (21.2)	33 (22.6)	
Dijon	173 (50.1)	76 (52.1)	
Montpellier	99 (28.7)	37 (25.3)	*0.92*
Education level[b]			
Less then grade school	87 (25.3)	30 (20.6)	
Grade school or high school	99 (28.8)	44 (30.1)	
High school validated or university	158 (45.9)	72 (49.3)	*0.44*
Smoking			
Never	111 (32.2)	63 (43.2)	
Former	206 (59.7)	70 (47.9)	
Current	28 (8.1)	13 (8.9)	*0.04*
Daily alcohol consumption[c]			
None	9 (2.6)	9 (6.2)	
Former	7 (2.0)	6 (4.1)	
≤2 drinks	217 (63.3)	89 (61.4)	
>2 drinks	110 (32.1)	41 (28.3)	*0.07*
Medical history			
Hypertension	267 (77.4)	124 (84.9)	*0.22*
Diabetes[d]	37 (10.7)	30 (20.8)	*<0.01*
Hypercholesterolemia	141 (40.9)	69 (47.3)	*0.13*
Hormone levels			
Total testosterone, ng/mL	5.6 (1.9)	5.7 (2.1)	*0.17*
Bioavailable testosterone, ng/mL	3.2 (1.0)	3.3 (1.1)	*0.18*
Total estradiol[e], pg/mL	18.3 (14.4; 24.3)	18.3 (15.5; 23.8)	*0.78*
SHBG, nmol/L	24.6 (18.3; 32.8)	26.0 (19.2; 35.7)	*0.24*

Data are expressed as mean (SD) unless otherwise stated as n (%) or geometric mean (interquartile range).
[a] 2 Missed values.
[b] 1 Missed value.
[c] 3 Missed values.
[d] 2 Missed values.
[e] 1 Missed value.

association was found between total testosterone and the risk of IAD (p for J-shaped 0.04). After adjustment for traditional cardiovascular risk factors, this association persisted (p for J-shaped < 0.01). The adjusted-HR associated with the lowest and the highest total testosterone quintiles relative to the second quintile were 2.23 (95% CI: 1.02; 4.88) and 3.61 (95% CI: 1.55; 8.45) respectively. Similar associations between total testosterone and the risk of CHD were observed in both model (adjusted-HR: 3.11 95% CI (1.27; 7.63) and adjusted-HR: 4.75 95% CI (1.75; 12.92), p for J-shaped < 0.01). No significant association was found for stroke. Likewise, a J-shaped association was also observed between plasma bioavailable testosterone and IAD risk (p for J-shaped = 0.01). After adjustment for cardiovascular risk factors, the J-shaped relation was only significant for ischemic stroke, whereas a borderline

Table 2
Baseline characteristics of the entire sample and by quintile group of plasma testosterone.

	Total testosterone quintile						
	Whole sample (n = 491)	<3.94 ng/mL (n = 101)	3.94–4.88 ng/mL (n = 89)	4.88–5.88 ng/mL (n = 97)	5.88–6.89 ng/mL (n = 106)	>6.89 ng/mL (n = 106)	p for trend
Age, years	73.7 (5.4)	73.7 (5.4)	74.2 (5.5)	73.9 (5.4)	74.2 (5.5)	73.6 (5.1)	*0.57*
BMI[a], kg/m^2	26.1 (3.2)	27.1 (3.9)	26.3 (2.8)	27.1 (3.9)	26.0 (3.9)	24.9 (2.8)	*<0.01*
Current Smoking	41 (8.4)	5 (4.9)	7 (7.9)	6 (6.2)	12 (12.4)	11 (10.4)	*0.08*
Education level ≥ high school or university[b]	230 (46.9)	43 (43.0)	46 (51.7)	48 (49.5)	48 (49.5)	50 (47.2)	*0.94*
Daily alcohol consumption >2 drinks[c]	151 (30.7)	33 (33.0)	29 (32.9)	31 (32.0)	26 (26.5)	32 (30.5)	*0.45*
Medical history							
Hypertension	391 (79.6)	85 (84.2)	68 (76.4)	79 (81.4)	76 (77.5)	83 (78.3)	*0.39*
Diabetes[d]	67 (13.7)	16 (15.8)	16 (18.2)	14 (14.4)	12 (12.4)	9 (8.5)	*0.06*
Hypercholesterolemia	210 (42.8)	41 (40.6)	39 (43.8)	43 (44.3)	36 (36.7)	51 (48.1)	*0.57*
Hormone levels							
Total testosterone, ng/mL	5.6 (1.9)	3.1 (0.7)	4.4 (0.3)	4.4 (0.3)	4.4 (0.3)	8.3 (1.2)	–
Bioavailable testosterone, ng/mL	3.2 (1.1)	1.9 (0.5)	2.6 (0.3)	3.2 (0.4)	3.6 (0.5)	4.5 (0.9)	*<0.01*
SHBG, nmol/L	25.0 (18.9; 33.6)	14.4 (11.3; 19.1)	17.4 (13.6; 22.4)	17.3 (14.2; 22.7)	19.7 (16.6; 24.9)	23.9 (19.7; 29.2)	*<0.01*
Total estradiol[e], pg/mL	18.3 (14.7; 24.2)	21.2 (17.0; 26.0)	23.0 (16.7; 30.3)	24.2 (18.2; 31.8)	27.0 (21.1; 35.3)	30.1 (22.8; 38.4)	*<0.01*

Data are expressed as mean (SD) unless otherwise stated as n (%) or geometric mean (interquartile range), respectively.
[a] 2 Missed values.
[b] 1 Missed value.
[c] 3 Missed values.
[d] 2 Missed values.
[e] 1 Missed value.

Table 3
HRs for first ischemic arterial disease, CHD, and stroke events across quintiles of plasma testosterone.

	Ischemic arterial disease			CHD			Ischemic stroke		
	No. of events	Model 1 HR (95%CI)	Model 2 HR (95%CI)	No. of events	Model 1 HR (95%CI)	Model 2 HR (95%CI)	No. of events	Model 1 HR (95%CI)	Model 2 HR (95%CI)
Total testosterone, ng/mL									
Q1 < 3.94	31	1.78 (0.89; 3.56)	2.23 (1.02; 4.88)	27	2.29 (1.04; 5.03)	3.11 (1.27; 7.63)	4	0.76 (0.20; 2.88)	0.77 (0.17; 3.44)
Q2 [3.94; 4.88]	19	1.00 (referent)	1.00 (referent)	12	1.00 (referent)	1.00 (referent)	7	1.00 (referent)	1.00 (referent)
Q3 [4.88; 5.88]	28	1.72 (0.83; 3.54)	1.97 (0.86; 4.50)	21	1.95 (0.84; 4.55)	2.36 (0.89; 6.25)	7	1.36 (0.40; 4.64)	1.52 (0.38; 6.14)
Q4 [5.88; 6.89]	29	1.88 (0.92; 3.84)	2.16 (0.96; 4.86)	19	1.86 (0.80; 4.31)	2.29 (0.88; 6.01)	10	2.01 (0.63; 6.45)	2.10 (0.59; 7.45)
Q5 ≥ 6.89	39	2.74 (1.36; 5.52)	3.61 (1.55; 8.45)	33	3.40 (1.52; 7.60)	4.75 (1.75; 12.92)	6	1.48 (0.39; 5.53)	1.84 (0.41; 8.21)
p for J-shaped		*0.04*	*<0.01*		*0.03*	*<0.01*		*0.65*	*0.41*
Bioavailable testosterone, ng/mL									
Q1 < 2.35	28	1.27 (0.66; 2.45)	1.52 (0.73; 3.16)	23	1.21 (0.60; 2.43)	1.49 (0.68; 3.24)	5	1.49 (0.34; 6.65)	1.55 (0.27; 9.08)
Q2 [2.35; 2.87]	25	1.00 (referent)	1.00 (referent)	21	1.00 (referent)	1.00 (referent)	4	1.00 (referent)	1.00 (referent)
Q3 [2.87; 3.34]	23	1.07 (0.54; 2.11)	1.15 (0.54; 2.48)	17	0.92 (0.45; 1.91)	0.99 (0.44; 2.26)	6	1.74 (0.39; 7.82)	1.77 (0.32; 9.88)
Q4 [3.34; 4.02]	38	1.75 (0.94; 3.29)	2.08 (1.02; 4.25)	26	1.44 (0.72; 2.87)	1.74 (0.80; 3.81)	12	3.53 (0.97; 12.85)	4.05 (0.84; 19.50)
Q5 ≥ 4.02	32	1.77 (0.93; 3.37)	1.99 (0.90; 4.39)	25	1.53 (0.76; 3.06)	1.67 (0.71; 3.93)	7	3.28 (0.79; 13.53)	4.15 (0.71; 24.33)
p for J-shaped		*0.05*	*0.01*		*0.15*	*0.07*		*0.10*	*0.03*

Model 1: adjusted for study center.
Model 2: adjusted for study center, body mass index, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia and smoking status.

significant association was observed for CHD. No significant association between the estradiol/total testosterone ratio and the risk of IAD was found. No significant association of plasma total estradiol and SHBG with IAD was detected. Adjusting testosterone-IAD event association for SHBG or estradiol and vice versa made no substantial change to the results (Data not shown).

4. Discussion

In this French prospective population study of older men, a J-shaped association of total and bioavailable testosterone with the risk of first IAD was found after adjustment for traditional cardiovascular risk factors. To the best our knowledge, this is the first result showing that both low and high levels of testosterone are associated with an increased risk of cardiovascular disease. In contrast, no significant association of estradiol and SHBG levels with IAD risk was detected.

Previous cohort studies reported conflicting data on the association between testosterone levels and the risk of cardiovascular events. Early findings failed to detect an association between testosterone levels and incident cardiovascular disease [6,8,9,21]. However, a recent study including 2416 men aged 69–81 years showed that serum testosterone levels were inversely associated with the risk of cardiovascular events [10]. Low testosterone levels were also related with an increased risk of incident stroke or transient ischemic attack in the HIMS study including 3443 men aged over 70 years [22]. Moreover, a meta-analysis [4] and a recent report among 3637 community-dwelling men aged 70–88 years [5] showed a relationship between low testosterone levels and increased all-cause and cardiovascular mortality. Interestingly, further meta-analysis recently showed that low testosterone levels predicted risk for cardiovascular disease in elderly men but not in healthy middle aged men [23]. Thus, the ability to draw conclusions from the observational data is limited by differences in population age range, but also by differences in hormone assay, duration of follow-up and definition of clinical outcomes. However, our results confirm and extend the previous findings showing that low testosterone levels is an independent predictor of IAD risk in elderly men.

The association between low testosterone levels and cardiovascular events or mortality could be mediated through known effects of testosterone on cardiovascular risk factors [24]. In agreement with several studies [25], a strong inverse relation between obesity and plasma testosterone levels was observed in our study. Obesity activates an inflammatory process, especially in adipose tissue where increased circulating levels of cytokines contribute to proinflammatory [2] and prothrombotic state [26]. In addition, diabetes, a major contributory factor to the development of cardiovascular disease in men, has also been associated with increased prevalence of low testosterone levels. However, in our study, adjustment for traditional cardiovascular risk factors including BMI and diabetes made little change to the results. Other mechanisms including unfavorable changes in haemostasis [27] could therefore be involved.

In our study, high testosterone levels were also associated with an elevated risk of IAD. This finding is consistent with the MMAS study showing an association between high free testosterone levels and increased risk of ischemic heart disease mortality [7]. Higher endogenous testosterone levels were also related to an increased risk of CHD among elderly men in the MrOS study [28]. Besides, a recent placebo-controlled clinical trial of elderly men reported increased rates of adverse cardiovascular events in the group treated by a testosterone gel [29]. Although other trials found no similar adverse effect, we can hypothesize that high testosterone levels may have deleterious effects on cardiovascular

disease through the development of hypertension and congestive heart failure, especially in older men [30].

The question of whether changes in endogenous testosterone levels play a role in the development of IAD remains largely unsolved. Based on observational studies, the existence of an independent association between levels of endogenous testosterone and IAD risk does not necessarily imply that this relationship be causal. Although altered androgens levels could contribute to atherothrombosis through several potential mechanisms, low testosterone could be merely a marker of poor general health and/or aging without any causal role in cardiovascular disease. This hypothesis is supported by evidence that both acute and chronic illnesses reduce testosterone production [1]. Thus, a reverse causation could explain in part our results. In our study, data analysis was done among men who were free of cardiovascular disease at baseline, thus arguing against a substantial role of prevalent IAD. Furthermore, exclusion of the first few months of follow-up data did not affect materially our results. However, a reverse causation due to subclinical disease cannot be ruled out.

A major strength of our study relates to the prospective population-based and multicenter cohort design with a high participation rate during the 4 years of follow-up. Another strength is the adequate validation of incident cases of CHD and stroke by two independent committees of experts using hospital charts and practitioners' reports. Third, information on comorbidities and medications including drugs altering testosterone levels was systematically collected by direct interview.

A limitation of our study is the small number of incident cases, which may yield a lack of statistical power, especially for subgroup analyses and for testing potential interactions of sex hormones with cardiovascular risk factors on IAD. A second limitation pertains to the specific-method variability in sex hormones levels measurements performed by RIAs compared with the state-of-the-art mass spectrometry methodology. However, our method comparison data showed that RIA underestimated the mass spectrometry-based methodology values but provided accurate results in term of relative ranking by hormone level [31], which is the pre-requisite for adequate risk estimation in epidemiology. Thirdly, our results were based on a single measurement of biomarkers and the potential within-subject variability of sex hormones might have resulted in disease lack of statistical power. However, such a limitation lead to underestimate, not cause, associations between sex hormone and IAD risk. In addition, all plasma samples were collected in the morning thus reducing changes in sex hormones due to diurnal variation [32]. Finally, the 3C study population consisted of older volunteers with a better global health than the general population and our results may not apply to the whole men population.

In conclusion, high and low plasma testosterone levels are associated with an increased risk of arterial ischemic event in elderly men. Our data suggest that optimal range of plasma testosterone may confer protection against cardiovascular events. Testosterone may be useful for improving cardiovascular health among men with age-associated low levels of testosterone. However, more data are needed to assess the safety of testosterone supplementation, especially in older men with high prevalence of cardiovascular risk factors.

Contributors

Substantial contributions to conception and design or acquisition of data: Brailly-Tabard S, Helmer C, Rouaud O, Ancelin ML, Zerhouni C, Guiochon-Mantel A, Scarabin PY.

Analysis and interpretation of data: Soisson V, Scarabin PY.

Drafting the article: Soisson V, Scarabin PY.

Final approval of the version to be published: Soisson V, Brailly-Tabard S, Helmer C, Rouaud O, Ancelin ML, Zerhouni C, Guiochon-Mantel A, Scarabin PY.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Fundings

The Three-City Study is conducted under a partnership agreement between the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Victor Segalen-Bordeaux II University, and Sanofi-Aventis. The Fondation pour la Recherche Médicale funded preparation and initiation of the study. The Three-City Study is also supported by the Caisse Nationale Maladie des Travailleurs Salariés, Direction Générale de la Santé, MGEN, Institut de la Longévité, Conseils Régionaux of Aquitaine and Bourgogne, Fondation de France, and Ministry of Research-INSERM Programme "Cohortes et collections de données biologiques". The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Biological assays regarding sex hormones were supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2007-LVIE-005-01).

Ethical approval

The Ethics Committee of the University of Hospital of Kremlin-Bicêtre approved the study protocol and an informed consent was obtained from each participant.

References

[1] Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. Endocrine Reviews 2005;26(6 (October)):833–76.
[2] Jones TH. Testosterone deficiency: a risk factor for cardiovascular disease? Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM 2010;21(8 (August)):496–503.
[3] Wylie K, Rees M, Hackett G, et al. Androgens, health and sexuality in women and men. Maturitas 2010;67(3 (November)):275–89.
[4] Araujo AB, Dixon JM, Suarez EA, Murad MH, Guey LT, Wittert GA. Clinical review: Endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2011;96(10 (October)):3007–19.
[5] Hyde Z, Norman PE, Flicker L, et al. Low free testosterone predicts mortality from cardiovascular disease but not other causes: the Health in Men Study. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2012;97(1 (Jane)):179–89.
[6] Barrett-Connor E, Khaw KT. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A prospective population-based study. Circulation 1988;78(3 (September)):539–45.
[7] Araujo AB, Kupelian V, Page ST, Handelsman DJ, Bremner WJ, McKinlay JB. Sex steroids and all-cause and cause-specific mortality in men. Archives of Internal Medicine 2007;167(12 (June)):1252–60.
[8] Arnlov J, Pencina MJ, Amin S, et al. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease incidence in men. Annals of Internal Medicine 2006;145(3 (August)):176–84.
[9] Yarnell JW, Beswick AD, Sweetnam PM, Riad-Fahmy D. Endogenous sex hormones and ischemic heart disease in men. The Caerphilly prospective study. Arteriosclerosis and Thrombosis 1993;13(4 (April)):517–20.
[10] Ohlsson C, Barrett-Connor E, Bhasin S, et al. High serum testosterone is associated with reduced risk of cardiovascular events in elderly men. The MrOS (Osteoporotic Fractures in Men) study in Sweden. Journal of the American College of Cardiology 2011;58(16 (October)):1674–81.
[11] Soisson V, Brailly-Tabard S, Empana JP, et al. Low plasma testosterone and elevated carotid intima-media thickness: Importance of low-grade inflammation in elderly men. Atherosclerosis 2012;223(1 (July)):244–9.
[12] Yeap BB. Testosterone and ill-health in aging men. Nature Clinical Practice 2009;5(2 (February)):113–21.
[13] Bonithon-Kopp C, Scarabin PY, Bara L, Castanier M, Jacqueson A, Roger M. Relationship between sex hormones and haemostatic factors in healthy middle-aged men. Atherosclerosis 1988;71(1 (May)):71–6.
[14] 3C Study Group. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. Neuroepidemiology 2003;22(6 (November–December)):316–25.
[15] Carcaillon L, Gaussem P, Ducimetiere P, et al. Elevated plasma fibrin D-dimer as a risk factor for vascular dementia: the Three-City cohort study. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2009;7(12 (December)):1972–8.

[16] Wacholder S. Practical considerations in choosing between the case-cohort and nested case-control designs. Epidemiology 1991;2(2 (March)):155–8.
[17] Loric S, Guechot J, Duron F, Aubert P, Giboudeau J. Determination of testosterone in serum not bound by sex-hormone-binding globulin: diagnostic value in hirsute women. Clinical Chemistry 1988;34(9 (September)):1826–9.
[18] Barlow WE, Ichikawa L, Rosner D, Izumi S. Analysis of case-cohort designs. Journal of Clinical Epidemiology 1999;52(12 (December)):1165–72.
[19] Barlow WE. Robust variance estimation for the case-cohort design. Biometrics 1994;50(4 (December)):1064–72.
[20] Korn EL, Graubard BI, Midthune D. Time-to-event analysis of longitudinal follow-up of a survey: choice of the time-scale. American Journal of Epidemiology 1997;145(1 (Jane)):72–80.
[21] Abbott RD, Launer LJ, Rodriguez BL, et al. Serum estradiol and risk of stroke in elderly men. Neurology 2007;68(8 (February)):563–8.
[22] Yeap BB, Hyde Z, Almeida OP, et al. Lower testosterone levels predict incident stroke and transient ischemic attack in older men. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2009;94(7 (July)):2353–9.
[23] Ruige JB, Mahmoud AM, De Bacquer D, Kaufman JM. Endogenous testosterone and cardiovascular disease in healthy men: a meta-analysis. Heart (British Cardiac Society) 2011;97(11 (December)):870–5.
[24] Wu FC, von Eckardstein A, Androgens. coronary artery disease. Endocrine Reviews 2003;24(2 (April)):183–217.
[25] Blouin K, Boivin A, Tchernof A. Androgens and body fat distribution. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2008;108(3–5 (February)):272–80.
[26] Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. Current Opinion in Lipidology 2007;18(3 (June)):240–5.
[27] Yang XC, Jing TY, Resnick LM, Phillips GB. Relation of hemostatic risk factors to other risk factors for coronary heart disease and to sex hormones in men. Arteriosclerosis and Thrombosis 1993;13(4 (April)):467–71.
[28] Sueoka KT, Ewing SK, Ensrud KE, et al. Higher Endogenous Testosterone Levels Associated with Increased Risk of Coronary Heart Disease in Elderly Men: A Prospective Study. Endocrine Reviews 2010;31(3 (June)): S858.
[29] Basaria S, Coviello AD, Travison TG, et al. Adverse events associated with testosterone administration. New England Journal of Medicine 2010;363(2 (July)):109–22.
[30] Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, et al. Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2005;90(2 (February)):678–88.
[31] Toniolo P, Lukanova A. The challenge of measuring circulating estradiol at low concentrations. Breast Cancer Research 2005;7(2):45–7.
[32] Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2009;94(3 (March)):907–13.

RÉFÉRENCES

1. **http://www.who.int** 1954 World Health Organization.
2. **Stary HC** 1994 Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. Basic research in cardiology 89 Suppl 1:17-32
3. **Steinberg D** 1997 Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. The Journal of biological chemistry 272:20963-20966
4. **Giral P** 1998 Athérome : anatomie pathologique, physiopathologie, épidémiologie et facteurs de risque, prévention. La Revue du praticien 48:99-106
5. **http://www.123bio.net/revues/jleoni/intro.html** 2001 Physiopathologie de l'athérosclérose - Mécanismes et prévention de l'athérothrombose.
6. **Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ** 1995 Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. Circulation 91:2488-2496
7. **http://umvf.univ-nantes.fr/medecine-vasculaire/enseignement/vasculaire_128/site/html/cours.pdf** 2010 Athérogenèse, athérome: épidémiologie et traitement.
8. **http://www-sante.ujf-grenoble.fr/sante/CardioCD/cardio/chapitre/412.htm** Athérosclérose: épidémiologie, physiopathologie et prévention.
9. **Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Roger VL, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J** 2010 Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. Circulation 121:e46-e215
10. **http://www.invs.sante.fr/beh/2011/22/** 2011 InVS BEH Données sur la mortalité en France: principales causes de décès en 2008 et évolution depuis 2000.
11. **http://www.drees.sante.gouv.fr/l-etat-de-sante-de-la-population-en-france-rapport-2009-2010 h** 2009 L'état de santé de la population en France - rapport 2009-20010.
12. **Ulucam MZ** 2012 Cardiovascular Risk Factors in the Elderly. Available from: http://wwwintechopencom/books/cardiovascular-risk-factors/cardiovascular-risk-factors-in-the-elderly
13. **Levine BS, Kannel W** 2003 Coronary heart disease risk in people 65 years of age and older. Progress in cardiovascular nursing 18:135-140
14. **Law MR, Wald NJ, Thompson SG** 1994 By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? BMJ (Clinical research ed 308:367-372
15. **Franklin SS, Larson MG, Khan SA, Wong ND, Leip EP, Kannel WB, Levy D** 2001 Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. Circulation 103:1245-1249

16. **de Ruijter W, Westendorp RG, Assendelft WJ, den Elzen WP, de Craen AJ, le Cessie S, Gussekloo J** 2009 Use of Framingham risk score and new biomarkers to predict cardiovascular mortality in older people: population based observational cohort study. BMJ (Clinical research ed 338:a3083

17. **Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB** 1998 Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation 97:1837-1847

18. **Koller MT, Leening MJ, Wolbers M, Steyerberg EW, Hunink MG, Schoop R, Hofman A, Bucher HC, Psaty BM, Lloyd-Jones DM, Witteman JC** 2012 Development and validation of a coronary risk prediction model for older U.S. and European persons in the cardiovascular health study and the Rotterdam Study. Annals of internal medicine 157:389-397

19. **Tostain J, Rossi D, Martin PM** 2004 [Physiology of androgens in adult men]. Prog Urol 14:639-660

20. **Schulze C** 1984 Sertoli cells and Leydig cells in man. Advances in anatomy, embryology, and cell biology 88:1-104

21. **Kaufman JM, Vermeulen A** 2005 The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. Endocrine reviews 26:833-876

22. **Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, Bremner WJ, McKinlay JB** 2002 Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 87:589-598

23. **Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarras P** 2003 AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. Molecular and cellular endocrinology 211:21-31

24. **Vermeulen A, Kaufman JM, Giagulli VA** 1996 Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 81:1821-1826

25. **Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C** 1991 Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 73:1016-1025

26. **Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR** 2001 Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 86:724-731

27. **Maggio M, Basaria S** 2009 Welcoming low testosterone as a cardiovascular risk factor. International journal of impotence research 21:261-264

28. **Jones TH** 2010 Testosterone deficiency: a risk factor for cardiovascular disease? Trends in endocrinology and metabolism: TEM 21:496-503

29. **Levine GN, D'Amico AV, Berger P, Clark PE, Eckel RH, Keating NL, Milani RV, Sagalowsky AI, Smith MR, Zakai N** 2010 Androgen-deprivation therapy in prostate cancer and cardiovascular risk: a science advisory from the American Heart Association, American Cancer Society, and American Urological Association: endorsed by the American Society for Radiation Oncology. Circulation 121:833-840

30. **Barrett-Connor E, Khaw KT** 1988 Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A prospective population-based study. Circulation 78:539-545

31. **Yarnell JW, Beswick AD, Sweetnam PM, Riad-Fahmy D** 1993 Endogenous sex hormones and ischemic heart disease in men. The Caerphilly prospective study. Arterioscler Thromb 13:517-520

32. **Arnlov J, Pencina MJ, Amin S, Nam BH, Benjamin EJ, Murabito JM, Wang TJ, Knapp PE, D'Agostino RB, Sr., Bhasin S, Vasan RS** 2006 Endogenous sex hormones and cardiovascular disease incidence in men. Annals of internal medicine 145:176-184

33. **Yeap BB** 2010 Androgens and cardiovascular disease. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity 17:269-276

34. **Araujo AB, Dixon JM, Suarez EA, Murad MH, Guey LT, Wittert GA** 2011 Clinical review: Endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 96:3007-3019

35. **Ohlsson C, Barrett-Connor E, Bhasin S, Orwoll E, Labrie F, Karlsson MK, Ljunggren O, Vandenput L, Mellstrom D, Tivesten A** 2011 High serum testosterone is associated with reduced risk of cardiovascular events in elderly men. The MrOS (Osteoporotic Fractures in Men) study in Sweden. Journal of the American College of Cardiology 58:1674-1681

36. **Yeap BB, Hyde Z, Almeida OP, Norman PE, Chubb SA, Jamrozik K, Flicker L, Hankey GJ** 2009 Lower testosterone levels predict incident stroke and transient ischemic attack in older men. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 94:2353-2359

37. **Basaria S, Coviello AD, Travison TG, Storer TW, Farwell WR, Jette AM, Eder R, Tennstedt S, Ulloor J, Zhang A, Choong K, Lakshman KM, Mazer NA, Miciek R, Krasnoff J, Elmi A, Knapp PE, Brooks B, Appleman E, Aggarwal S, Bhasin G, Hede-Brierley L, Bhatia A, Collins L, LeBrasseur N, Fiore LD, Bhasin S** 2010 Adverse events associated with testosterone administration. The New England journal of medicine 363:109-122

38. **3C Study Group** 2003 Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. Neuroepidemiology 22:316-325

39. **http://www.cnhim.org/** 1979 Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament.

40. **Katz S** 1983 Assessing self-maintenance: activities of daily living, mobility, and instrumental activities of daily living. Journal of the American Geriatrics Society 31:721-727

41. **Lawton MP, Brody EM** 1969 Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. The Gerontologist 9:179-186

42. **Rosow I, Breslau N** 1966 A Guttman health scale for the aged. Journal of gerontology 21:556-559

43. **Zureik M, Ducimetiere P, Touboul PJ, Courbon D, Bonithon-Kopp C, Berr C, Magne C** 2000 Common carotid intima-media thickness predicts occurrence of carotid atherosclerotic plaques: longitudinal results from the Aging Vascular Study (EVA) study. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 20:1622-1629

44. **Zureik M, Gariepy J, Courbon D, Dartigues JF, Ritchie K, Tzourio C, Alperovitch A, Simon A, Ducimetiere P** 2004 Alcohol consumption and carotid artery structure in older French adults: the Three-City Study. Stroke; a journal of cerebral circulation 35:2770-2775

45. **Graf S, Gariepy J, Massonneau M, Armentano RL, Mansour S, Barra JG, Simon A, Levenson J** 1999 Experimental and clinical validation of arterial diameter waveform and

intimal media thickness obtained from B-mode ultrasound image processing. Ultrasound in medicine & biology 25:1353-1363

46. **Alperovitch A, Bertrand M, Jougla E, Vidal JS, Ducimetiere P, Helmer C, Ritchie K, Pavillon G, Tzourio C** 2009 Do we really know the cause of death of the very old? Comparison between official mortality statistics and cohort study classification. European journal of epidemiology 24:669-675

47. **http://www.who.int/classifications/icd/en/ WHO** 2010 Classification internationale des maladies CIM-10.

48. **Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd** 1993 Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke; a journal of cerebral circulation 24:35-41

49. **http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html WHO** 2004 BMI classification.

50. **Wacholder S** 1991 Practical considerations in choosing between the case-cohort and nested case-control designs. Epidemiology (Cambridge, Mass 2:155-158

51. **Prentice RL** 1986 On the design of synthetic case-control studies. Biometrics 42:301-310

52. **Rove KO, Debruyne FM, Djavan B, Gomella LG, Koul HK, Lucia MS, Petrylak DP, Shore ND, Stone NN, Crawford ED** 2012 Role of testosterone in managing advanced prostate cancer. Urology 80:754-762

53. **Yalow RS, Berson SA** 1959 Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184 (Suppl 21):1648-1649

54. **Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff RS** 2004 Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 89:534-543

55. **Bland JM, Altman DG** 1986 Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1:307-310

56. **Loric S, Guechot J, Duron F, Aubert P, Giboudeau J** 1988 Determination of testosterone in serum not bound by sex-hormone-binding globulin: diagnostic value in hirsute women. Clinical chemistry 34:1826-1829

57. **Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM** 1999 A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 84:3666-3672

58. **Doumas BT, Watson WA, Biggs HG** 1971 Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 31:87-96

59. **Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS** 1972 Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clinical chemistry 18:499-502

60. **Straczek C, Ducimetiere P, Barberger-Gateau P, Helmer C, Ritchie K, Jouven X, Carcaillon L, Amouyel P, Tzourio C, Empana JP** 2010 Higher level of systemic C-reactive protein is independently predictive of coronary heart disease in older community-dwelling adults: the three-city study. Journal of the American Geriatrics Society 58:129-135

61. **Blaha MJ, Rivera JJ, Budoff MJ, Blankstein R, Agatston A, O'Leary DH, Cushman M, Lakoski S, Criqui MH, Szklo M, Blumenthal RS, Nasir K** 2011 Association between obesity, high-sensitivity C-reactive protein >/=2 mg/L, and subclinical atherosclerosis: implications of JUPITER from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 31:1430-1438

62. **Onland-Moret NC, van der AD, van der Schouw YT, Buschers W, Elias SG, van Gils CH, Koerselman J, Roest M, Grobbee DE, Peeters PH** 2007 Analysis of case-cohort data: a comparison of different methods. Journal of clinical epidemiology 60:350-355

63. **Barlow WE, Ichikawa L, Rosner D, Izumi S** 1999 Analysis of case-cohort designs. Journal of clinical epidemiology 52:1165-1172

64. **Barlow WE** 1994 Robust variance estimation for the case-cohort design. Biometrics 50:1064-1072

65. **Korn EL, Graubard BI, Midthune D** 1997 Time-to-event analysis of longitudinal follow-up of a survey: choice of the time-scale. American journal of epidemiology 145:72-80

66. **Soisson V, Brailly-Tabard S, Empana JP, Feart C, Ryan J, Bertrand M, Guiochon-Mantel A, Scarabin PY** 2012 Low plasma testosterone and elevated carotid intima-media thickness: Importance of low-grade inflammation in elderly men. Atherosclerosis 223:244-249

67. **Soisson V, Brailly-Tabard S, Helmer C, Rouaud O, Ancelin ML, Zerhouni C, Guiochon-Mantel A, Scarabin PY** 2013 A J-shaped association between plasma testosterone and risk of ischemic arterial event in elderly men: The French 3C cohort study. Maturitas 75:282-288

68. **Abbott RD, Launer LJ, Rodriguez BL, Ross GW, Wilson PW, Masaki KH, Strozyk D, Curb JD, Yano K, Popper JS, Petrovitch H** 2007 Serum estradiol and risk of stroke in elderly men. Neurology 68:563-568

69. **Hyde Z, Norman PE, Flicker L, Hankey GJ, Almeida OP, McCaul KA, Chubb SA, Yeap BB** 2012 Low free testosterone predicts mortality from cardiovascular disease but not other causes: the Health in Men Study. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 97:179-189

70. **Ruige JB, Mahmoud AM, De Bacquer D, Kaufman JM** 2011 Endogenous testosterone and cardiovascular disease in healthy men: a meta-analysis. Heart (British Cardiac Society) 97:870-875

71. **Araujo AB, Kupelian V, Page ST, Handelsman DJ, Bremner WJ, McKinlay JB** 2007 Sex steroids and all-cause and cause-specific mortality in men. Archives of internal medicine 167:1252-1260

72. **Sueoka KT, Ewing SK, Ensrud KE, Laughlin GA, Hoffman AR, Varosy PD, Stefanick ML, Barrett-Connor E, Stone KL, Bauer D** 2010 Higher Endogenous Testosterone Levels Associated with Increased Risk of Coronary Heart Disease in Elderly Men: A Prospective Study. Endocrine reviews 31:S858

73. **Muller M, van den Beld AW, Bots ML, Grobbee DE, Lamberts SW, van der Schouw YT** 2004 Endogenous sex hormones and progression of carotid atherosclerosis in elderly men. Circulation 109:2074-2079

74. **van den Beld AW, Bots ML, Janssen JA, Pols HA, Lamberts SW, Grobbee DE** 2003 Endogenous hormones and carotid atherosclerosis in elderly men. American journal of epidemiology 157:25-31

75. **Dorr M, Wallaschofski H, Friedrich N** 2009 Association of low total testosterone levels and prevalent carotid plaques: result of the study of health in Pomerania. European journal of epidemiology 24:389-391

76. **Hak AE, Witteman JC, de Jong FH, Geerlings MI, Hofman A, Pols HA** 2002 Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: the Rotterdam study. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 87:3632-3639

77. **Tivesten A, Mellstrom D, Jutberger H, Fagerberg B, Lernfelt B, Orwoll E, Karlsson MK, Ljunggren O, Ohlsson C** 2007 Low serum testosterone and high serum estradiol associate with lower extremity peripheral arterial disease in elderly men. The MrOS Study in Sweden. Journal of the American College of Cardiology 50:1070-1076

78. **Vikan T, Johnsen SH, Schirmer H, Njolstad I, Svartberg J** 2009 Endogenous testosterone and the prospective association with carotid atherosclerosis in men: the Tromso study. European journal of epidemiology 24:289-295

79. **Spence JD, Rundek T** 2012 Toward Clinical Applications of Carotid Ultrasound: intima-Media Thickness, Plaque Area, and Three-Dimensional Phenotypes. In: Nicolaides A ed. Ultrasound and Carotid Bifurcation Atherosclerosis: Springer

80. **Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR** 2012 Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: A meta-analysis. Atherosclerosis 220:128-133

81. **Plichart M, Celermajer DS, Zureik M, Helmer C, Jouven X, Ritchie K, Tzourio C, Ducimetiere P, Empana JP** 2011 Carotid intima-media thickness in plaque-free site, carotid plaques and coronary heart disease risk prediction in older adults. The Three-City Study. Atherosclerosis 219:917-924

82. **Kelly DM, Jones TH** 2013 Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. The Journal of endocrinology 217:R25-45

83. **Shores MM, Smith NL, Forsberg CW, Anawalt BD, Matsumoto AM** 2012 Testosterone treatment and mortality in men with low testosterone levels. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 97:2050-2058

84. **Muraleedharan V, Jones TH** 2010 Testosterone and the metabolic syndrome. Therapeutic advances in endocrinology and metabolism 1:207-223

85. **Srinivas-Shankar U, Roberts SA, Connolly MJ, O'Connell MD, Adams JE, Oldham JA, Wu FC** 2010 Effects of testosterone on muscle strength, physical function, body composition, and quality of life in intermediate-frail and frail elderly men: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 95:639-650

86. **Jones TH, Saad F** 2009 The effects of testosterone on risk factors for, and the mediators of, the atherosclerotic process. Atherosclerosis 207:318-327

87. **Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyyssonen K, Tuomainen TP, Salonen R, Rauramaa R, Salonen JT** 2003 Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 149:601-608

88. **Kupelian V, Chiu GR, Araujo AB, Williams RE, Clark RV, McKinlay JB** 2010 Association of sex hormones and C-reactive protein levels in men. Clinical endocrinology 72:527-533

89. **Bonithon-Kopp C, Scarabin PY, Bara L, Castanier M, Jacqueson A, Roger M** 1988 Relationship between sex hormones and haemostatic factors in healthy middle-aged men. Atherosclerosis 71:71-76

90. **Caron P, Bennet A, Camare R, Louvet JP, Boneu B, Sie P** 1989 Plasminogen activator inhibitor in plasma is related to testosterone in men. Metabolism: clinical and experimental 38:1010-1015

91. **Yang XC, Jing TY, Resnick LM, Phillips GB** 1993 Relation of hemostatic risk factors to other risk factors for coronary heart disease and to sex hormones in men. Arterioscler Thromb 13:467-471

92. **Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Mac RP, Lee M, Yarasheski KE, Sinha-Hikim I, Dzekov C, Dzekov J, Magliano L, Storer TW** 2005 Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 90:678-688

93. **Far HR, Agren G, Thiblin I** 2012 Cardiac hypertrophy in deceased users of anabolic androgenic steroids: an investigation of autopsy findings. Cardiovasc Pathol 21:312-316

94. **Wang C, Chan V, Yeung RT** 1978 Effect of surgical stress on pituitary-testicular function. Clinical endocrinology 9:255-266

95. **Aasebo U, Gyltnes A, Bremnes RM, Aakvaag A, Slordal L** 1993 Reversal of sexual impotence in male patients with chronic obstructive pulmonary disease and hypoxemia with long-term oxygen therapy. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 46:799-803

96. **Handelsman DJ, Dong Q** 1993 Hypothalamo-pituitary gonadal axis in chronic renal failure. Endocrinology and metabolism clinics of North America 22:145-161

97. **MacAdams MR, White RH, Chipps BE** 1986 Reduction of serum testosterone levels during chronic glucocorticoid therapy. Annals of internal medicine 104:648-651

98. **http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Maladies-cardio-vasculaires** 2010 Institut de veille sanitaire.

99. **Cushman M, Arnold AM, Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Burke GL, Polak JF, Tracy RP** 2005 C-reactive protein and the 10-year incidence of coronary heart disease in older men and women: the cardiovascular health study. Circulation 112:25-31

100. **Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG** 2007 Relative value of inflammatory, hemostatic, and rheological factors for incident myocardial infarction and stroke: the Edinburgh Artery Study. Circulation 115:2119-2127

101. **Muller M, van der Schouw YT, Thijssen JH, Grobbee DE** 2003 Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 88:5076-5086

102. **Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, Lacroix I, Somma-Delpero C, Boudou P** 2003 Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. Clinical chemistry 49:1381-1395

103. **Toniolo P, Lukanova A** 2005 The challenge of measuring circulating estradiol at low concentrations. Breast Cancer Res 7:45-47

104. **Matsumoto AM, Bremner WJ** 2004 Serum testosterone assays--accuracy matters. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 89:520-524

105. **Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H** 2007 Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 92:405-413

106. **Ly LP, Sartorius G, Hull L, Leung A, Swerdloff RS, Wang C, Handelsman DJ** 2010 Accuracy of calculated free testosterone formulae in men. Clinical endocrinology 73:382-388

107. **Hackbarth JS, Hoyne JB, Grebe SK, Singh RJ** 2011 Accuracy of calculated free testosterone differs between equations and depends on gender and SHBG concentration. Steroids 76:48-55

108. **Barrack ER, Coffey DS** 1980 The specific binding of estrogens and androgens to the nuclear matrix of sex hormone responsive tissues. The Journal of biological chemistry 255:7265-7275

109. **Liu PY, Death AK, Handelsman DJ** 2003 Androgens and cardiovascular disease. Endocrine reviews 24:313-340

110. **Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB** 2009 The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 94:907-913

RÉSUMÉ

Le déclin des hormones sexuelles avec l'âge a été mis en cause dans le développement de nombreuses maladies. Chez les hommes, la baisse de la testostérone circulante est un prédicteur de la mortalité toutes causes mais son impact sur le risque cardiovasculaire est incertain. A partir de l'étude de cohorte des Trois Cités (3C), réalisée en France dans la population générale, j'ai étudié le rôle de la testostérone plasmatique dans la survenue des évènements artériels ischémiques chez les hommes de plus de 65 ans.

J'ai montré, dans une première partie, que des taux diminués de testostérone étaient associés à des facteurs de risque cardiovasculaire. J'ai notamment confirmé le rôle central de la masse grasse et du diabète comme déterminants des androgènes. De plus, j'ai mis en évidence une association inverse entre la testostérone et l'épaisseur intima-media (EIM) des artères carotidiennes. J'ai montré que cette relation dépendait du statut inflammatoire systémique avec des variations significatives de l'EIM observées uniquement chez les hommes ayant des niveaux élevés de protéine C-réactive. En revanche, aucune association significative n'a pu être détectée entre les androgènes et la présence de plaques d'athérome.

Dans une seconde partie, j'ai mis en évidence une relation originale en forme de J entre la testostérone et le risque de maladies artérielles ischémiques. Les hommes ayant des taux élevés ou diminués de testostérone présentaient un risque accru d'évènements artériels et cette relation ne dépendait pas des principaux facteurs de risque cardiovasculaire. Des résultats similaires étaient observés pour les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux ischémiques.

Ces résultats suggèrent que des taux moyens de testostérone totale circulante (4-5 ng/mL) protègent des maladies artérielles ischémiques. Ce rôle modulateur des androgènes pourrait être lié à un processus de vieillissement précoce non spécifique.

Mots-clés : testostérone, athérosclérose, maladie cardiovasculaire, vieillissement, homme âgé, protéine C-réactive.