



Hormones sexuelles et mortalité chez les hommes au cours du vieillissement dans l'étude de cohorte des Trois Cités

Abdel Nasser Laouali Mahamadou

► To cite this version:

Abdel Nasser Laouali Mahamadou. Hormones sexuelles et mortalité chez les hommes au cours du vieillissement dans l'étude de cohorte des Trois Cités. Santé publique et épidémiologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS226 . tel-02182944

HAL Id: tel-02182944

<https://theses.hal.science/tel-02182944>

Submitted on 14 Jul 2019

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.

Hormones sexuelles et mortalité chez les hommes au cours du vieillissement dans l'étude de cohorte des Trois Cités.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°570 Santé Publique EDSP
Spécialité de doctorat: Santé publique - Epidémiologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 13 juillet 2018, par

Abdel Nasser LAOUALI MAHAMADOU

Composition du Jury :

Monsieur Jean BOUYER Directeur de recherche, Université Paris Saclay (INSERM U1018)	Président
Madame Nathalie CHABBERT-BUFFET Professeure des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris 6 (Hôpital Tenon)	Rapporteur
Monsieur Babak KHOSHNOOD Directeur de recherche, Université Paris 5 (INSERM U1153)	Rapporteur
Madame Marianne CANONICO Chargée de recherche, Université Paris Saclay (INSERM U1018)	Directeur de thèse

Titre : Hormones sexuelles et mortalité chez les hommes au cours du vieillissement dans l'étude de cohorte des Trois Cités.

Mots clés : épidémiologie, hormones, syndrome métabolique, récepteurs aux estrogènes, mortalité, hommes.

Résumé : Malgré de nombreuses études concernant le rôle des hormones sexuelles endogènes sur la mortalité chez les hommes, les résultats demeurent à ce jour contradictoires et pourraient dépendre des caractéristiques des sujets ainsi que des causes de décès. A partir de l'étude prospective de cohorte des Trois Cités réalisée en France, nous avons évalué le rôle de la testostérone et de l'estradiol endogènes sur le risque de mortalité après 12 ans de suivi chez les hommes de plus de 65 ans, en prenant en compte le contexte clinique et génétique des sujets ainsi que les causes spécifiques de décès. Tout d'abord, nous avons mis en évidence une interaction significative entre les concentrations de testostérone et la présence du syndrome métabolique (SM) sur la mortalité. Les taux bas d'hormone étaient associés à une augmentation du risque de mortalité chez les hommes présentant un SM alors qu'aucune relation entre la testostérone et le décès n'a été observée chez les sujets sains. De plus, des analyses réalisées exclusivement chez les hommes sains ont montré que les taux élevés de testostérone

étaient associés à un risque de mortalité cardiovasculaire mais pas de mortalité par cancers ou par autres causes. Enfin, nous avons mis en évidence une association quadratique entre les niveaux d'estrogène et le risque de mortalité toutes causes. Cette relation n'était pas modifiée par les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes mais dépendait en revanche des causes de décès. Une relation quadratique plus marquée a été mise en évidence avec la mortalité cardiovasculaire alors qu'aucune association n'a été trouvée entre les niveaux d'estradiol et le risque de mortalité par cancers et par autres causes. En conclusion, ce travail a confirmé les liens complexes entre les hormones endogènes et le risque de mortalité chez les hommes et a permis de comprendre en partie la divergence des résultats de la littérature. Ces résultats pourraient permettre l'identification de sous-groupes à haut risque et d'améliorer la prise en charge clinique et thérapeutique des hommes au cours du vieillissement.

Title: Sex steroid hormones and mortality in elderly men from the Three-City cohort study.

Keywords: epidemiology, hormones, metabolic syndrome, estrogen receptors, mortality, men.

Abstract: Despite a number of studies regarding the association of endogenous sex steroid hormones with mortality in men, the results remain controversial and could depend on the characteristics of the subjects and the cause of death. Using the data from the prospective Three-City cohort study set-up in France, we investigated the role of endogenous testosterone and estradiol on 12-year mortality in men over 65 years, taking into account the clinical and genetic background, as well as the cause-specific of death. Firstly, we found a significant interaction of testosterone with metabolic syndrome (MetS) on mortality. Low levels of testosterone were associated with an increased risk of mortality among men suffering from MetS while there was no association of hormone with death in healthy subjects. Then, analyses restricted to healthy men showed that high levels of testosterone increased

the risk of death from cardiovascular disease but not from cancer or other cause. Finally, we highlighted a quadratic association between endogenous estradiol and all-cause mortality. This relationship was not modified by genetic polymorphisms of estrogen receptors but could depend on the cause of death. A stronger quadratic association was found with cardiovascular disease mortality but estradiol did not influence the risk of cancer or other cause of mortality. In conclusion, this thesis confirmed the complex role of endogenous sex steroid hormones on mortality in men and allowed to better understand previous controversial results. If confirmed, these results could help identifying subgroups at high risk, improving the clinical and therapeutic management of men during aging.

Unité d'accueil

Cette thèse a été préparée au sein du centre de recherche en épidémiologie et santé des populations (CESP), INSERM U1018, équipe « Epidémiologie du vieillissement et des maladies liées à l'âge ».

Hôpital Paul Brousse, Bâtiment 15/16

16 avenue Paul Vaillant-Couturier,

94800 Villejuif, France.

Financement

Cette thèse a été financée par l'Université Paris-Sud, dans le cadre d'un contrat doctoral et d'une mission d'enseignement à l'Université.

Dédicace

Je dédie cette thèse à :

Mes parents : Mariama Abdou Mazawagé et Laouali Mahamadou Adelli

Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement.

Vous n'avez pas cessé de me conseiller, m'encourager et de prier pour moi. Vos prières et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

Ma très chère femme : Nana Fatchima Moudi, pour la patience et le soutien dont elle a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse.

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse Marianne Canonico, pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse, pour sa bonne humeur et pour sa disponibilité permanente. Je tiens à la remercier particulièrement pour sa bienveillance, son soutien, sa confiance et sa gentillesse qui m'ont permis d'aimer simplement mon travail et de mener à bien cette thèse dans d'excellentes conditions.

J'exprime toute ma gratitude envers les membres de mon jury qui ont accepté de juger cette thèse. A Monsieur Jean Bouyer pour avoir accepté d'être examinateur, ainsi que le Professeure Nathalie Chabbert-Buffet et Monsieur Babak Khoshnood qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de recherche.

Je remercie Alexis Elbaz, directeur de l'équipe Inserm « Epidémiologie du vieillissement et des maladies liées à l'âge » de m'avoir accueilli au sein de son équipe, de m'avoir fait profiter de son expérience par ses conseils, son œil critique, sa rigueur scientifique et ses remarques pertinentes. Je remercie Bruno Falissard, directeur de l'unité 1018 de l'Inserm, pour son accueil dans l'unité.

Cette thèse a été effectuée au sein de l'ED570 de Santé Publique, dont je tiens à remercier le Directeur, Jean Bouyer pour sa gentillesse et sa disponibilité à l'égard de tous. Evidemment, Josiane Warszawski, je vous remercie pour votre confiance et l'opportunité que vous m'avez donnée d'être chargé de TP. Je remercie Fabienne Renoirt, notre super secrétaire de l'ED, pour son aide, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Toute l'équipe « Vieillissement ». Travailler avec vous tous a été très enrichissant autant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Merci pour tout ce partage épidémiologique, statistique, mode, gastronomie... Au-delà des rires et des larmes, je vous remercie aussi pour votre écoute, pour les parties de Moulkky, les moments « thé » à la salle de détente, et tous ces moments philosophiques surtout lors du déjeuner à la cantine dont vous seuls avez le secret. Je remercie Corinne Pinguet pour sa disponibilité et son aide précieuse dans la gestion administrative. Je remercie Sofiane et Emmanuel avec lesquels j'ai partagé mon bureau.

Je remercie l'ensemble des investigateurs de l'étude des Trois cités et plus particulièrement Christophe Tzourio, Jean-François Dartigues et Claudine Berr pour la mise à disposition des données de l'étude.

Je remercie Pierre-Yves Scarabin, investigateur principal du projet Hyperstar qui a permis d'effectuer le dosage des hormones dans l'étude des Trois cités. Je remercie également l'ensemble de l'équipe du laboratoire d'Hormonologie de l'Université Paris XI et plus particulièrement Anne Guiochon-Mantel et Sylvie Brailly-Tabard pour leur soutien méthodologique dans ces dosages.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Épidémiologie des Cancers, Gènes et Environnement, en particulier son directeur Pascal Guénel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire lors de mon stage de Master 2 et pour sa grande disponibilité et sa bonne humeur. Je remercie également Emilie cordina-Duverger et Marie Sanchez pour leur soutien technique.

Je voudrais également remercier les personnels de la cantine du CNRS de Villejuif, particulièrement Katy et Malika.

Enfin, ma famille et mes amis. Merci de m'avoir montré l'exemple, de m'avoir aidé, accompagné, encouragé et supporté (dans tous les sens du terme) pendant ce marathon. Merci infiniment à mon Coco-Adnane de faire partie de ma vie et de l'enrichir chaque jour.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	15
COMMUNICATIONS AFFICHEES	17
LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATIONS.....	19
LISTE DES TABLEAUX	21
LISTE DES FIGURES.....	25
1. INTRODUCTION.....	27
1.1 TESTOSTERONE.....	30
1.1.1 <i>Synthèse et régulation</i>	<i>30</i>
1.1.2 <i>Effets physiologiques</i>	<i>33</i>
1.2 ESTRADIOL	35
1.2.1 <i>Synthèse et régulation</i>	<i>35</i>
1.2.2 <i>Effets physiologiques</i>	<i>37</i>
1.3 DEFICIT HORMONAL LIE A L' AGE	40
1.3.1 <i>Andropause</i>	<i>40</i>
1.3.2 <i>Conséquence du déficit androgénique lié à l'âge.....</i>	<i>41</i>
1.4 ASSOCIATION ENTRE LES HORMONES SEXUELLES ET LA MORTALITE	43
1.4.1 <i>Testostérone et mortalité.....</i>	<i>44</i>
1.4.1.1 <i>Influence des caractéristiques cliniques des sujets</i>	<i>44</i>
1.4.1.2 <i>Mortalité par causes spécifiques.....</i>	<i>45</i>
1.4.2 <i>Estradiol et mortalité</i>	<i>47</i>
1.4.2.1 <i>Influence du contexte génétique</i>	<i>47</i>
1.4.2.2 <i>Mortalité par causes spécifiques.....</i>	<i>47</i>
2. OBJECTIFS	49
2.1 OBJECTIF GENERAL.....	51
2.2 OBJECTIFS DETAILLES.....	51
3. POPULATION ET METHODES	53
3.1 ETUDE DES TROIS CITES.....	55
3.1.1 <i>Protocole de l'étude.....</i>	<i>55</i>
3.1.2 <i>Recueil des données</i>	<i>55</i>

3.1.3	<i>Suivi, validation des cas et définition des causes de mortalité</i>	56
3.2	LA SOUS-COHORTE	58
3.2.1	<i>L'étude cas-cohorte</i>	58
3.2.2	<i>Echantillon de l'étude</i>	58
3.3	MESURE DES PARAMETRES BIOLOGIQUES ET GENETIQUES	60
3.3.1	<i>Les hormones sexuelles endogènes</i>	60
3.3.1.1	Méthodes de dosage des hormones	60
3.3.1.2	Dosage de la testostérone totale.....	62
3.3.1.3	Dosage de la testostérone biodisponible.....	63
3.3.1.4	Dosage de l'estradiol total	63
3.3.2	<i>Autres paramètres biologiques</i>	64
3.3.3	<i>Génotypage des récepteurs aux estrogènes</i>	64
3.4	COVARIABLES.....	65
3.4.1	<i>Syndrome métabolique</i>	65
3.4.2	<i>Autres covariables</i>	65
3.5	ANALYSES STATISTIQUES	67
3.5.1	<i>Validation de la sous-cohorte</i>	67
3.5.2	<i>Utilisation de la pondération inverse</i>	67
3.5.3	<i>Description des caractéristiques de l'échantillon d'étude</i>	69
3.5.3.1	Caractéristiques générales	69
3.5.3.2	Polymorphismes génétiques	69
3.5.3.3	Hormones sexuelles	70
a)	Distribution des hormones sexuelles.....	70
b)	Corrélation et déterminants des hormones sexuelles	70
3.5.4	<i>Facteurs de risque de mortalité</i>	71
3.5.5	<i>Hormones et risque de mortalité toutes causes et par causes spécifiques</i>	71
3.5.5.1	Analyse de survie.....	72
c)	Echelle de temps du modèle de Cox : Age.....	73
d)	Condition de validité du modèle de Cox	74
3.5.5.2	Prise en compte des variables d'exposition	75
3.5.5.3	Variables d'ajustement	76
3.5.5.4	Modèle de médiation permettant une interaction	77
3.5.5.5	Modèle cas-seuls d'interaction gène-environnement	81
3.5.6	<i>Analyses de sensibilité</i>	82

3.5.6.1	Testostérone et mortalité toutes causes	82
3.5.6.2	Estradiol et mortalité toutes causes	82
4.	RESULTATS.....	83
4.1	VALIDATION DE L'ECHANTILLONNAGE DE LA SOUS-COORTE.....	85
4.2	DISTRIBUTION ET DEFINITION DES POIDS POUR L'IPW	87
4.3	DESCRIPTION DES CARACTERISTIQUES DE L'ECHANTILLON D'ETUDE	89
4.3.1	<i>Caractéristiques générales des sujets</i>	89
4.3.2	<i>Hormones sexuelles</i>	91
4.3.2.1	Distribution des hormones sexuelles	91
4.3.2.2	Corrélation et déterminants des hormones	93
4.3.3	<i>Facteurs de risque de mortalité</i>	97
4.3.3.1	Mortalité toutes causes	97
4.3.3.2	Mortalité par causes spécifiques.....	98
4.4	TESTOSTERONE ET MORTALITE	102
4.4.1	<i>Mortalité toutes causes : influence du syndrome métabolique</i>	102
4.4.1.1	Caractéristiques des hommes à l'inclusion selon le syndrome métabolique	102
4.4.1.2	Testostérone et risque de mortalité toutes causes en fonction du syndrome métabolique	105
4.4.1.3	Modèle de médiation permettant l'interaction testostérone-syndrome métabolique	109
4.4.1.4	Analyses de sensibilité.....	110
4.4.2	<i>Mortalité par causes spécifiques</i>	113
4.5	ESTRADIOL ET MORTALITE	115
4.5.1	<i>Mortalité toutes causes : influence des caractéristiques génétiques</i>	115
4.5.1.1	Distribution des polymorphismes génétiques.....	115
4.5.1.2	Polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes et risque de mortalité toutes causes	115
4.5.1.3	Estradiol et risque de mortalité toutes causes	118
4.5.1.4	Estradiol et mortalité toutes causes en fonction des polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes	119
4.5.1.5	Modèle cas-seuls d'interaction gènes-estradiol	121
4.5.1.6	Analyses de sensibilité.....	123
4.5.2	<i>Mortalité par causes spécifiques</i>	123

5. DISCUSSION	127
5.1 TESTOSTERONE.....	130
5.1.1 <i>Synthèse des principaux résultats</i>	<i>130</i>
5.1.2 <i>Données antérieures</i>	<i>131</i>
5.1.3 <i>Interprétation des résultats</i>	<i>134</i>
5.2 ESTRADIOL	137
5.2.1 <i>Synthèse des principaux résultats</i>	<i>137</i>
5.2.2 <i>Données antérieures</i>	<i>137</i>
5.2.3 <i>Interprétations des résultats</i>	<i>139</i>
5.3 FORCES ET LIMITES DE L'ETUDE 3C	141
5.3.1 <i>Forces</i>	<i>141</i>
5.3.2 <i>Limites.....</i>	<i>142</i>
5.3.2.1 Validité externe.....	142
5.3.2.2 Biais inhérents à l'étude	142
5.3.2.3 Puissance	144
5.4 PERSPECTIVES	146
6. CONCLUSION	147
RÉFÉRENCES.....	151
ANNEXES.....	167
ANNEXE A : CORRELATIONS ET DETERMINANTS DE LA TESTOSTERONE BIODISPONIBLE	169
ANNEXE B : ASSOCIATION ENTRE LA TESTOSTERONE BIODISPONIBLE ET LA MORTALITE ..	171
B1 : <i>Risque de mortalité toutes causes.....</i>	<i>171</i>
B2 : <i>Risque de mortalité par causes spécifiques.....</i>	<i>174</i>
ANNEXE C : TESTOSTERONE TOTALE ET RISQUE DE MORTALITE : ANALYSES COMPLEMENTAIRES	175
ANNEXE D : ESTRADIOL ET RISQUE DE MORTALITE CARDIOVASCULAIRE: ANALYSE COMPLEMENTAIRE.....	177
ANNEXE E : PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	178

Productions scientifiques

Articles originaux en rapport avec la thèse

Article 1

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

Laouali N, Brailly-Tabard S, Helmer C, Ancelin ML, Tzourio C, Singh-Manoux A, Dugravot A, Elbaz A, Guiochon-Mantel A, Canonico M. **Testosterone and All-Cause Mortality in Older Men: The Role of Metabolic Syndrome.** J Endocr Soc. 2018 Feb 26;2(4):322-335. doi: 10.1210/js.2018-00005. eCollection 2018 Apr 1.

Article 2

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

Laouali N, Brailly-Tabard S, Helmer C, Ancelin ML, Tzourio C, A, Elbaz A, Guiochon-Mantel A, Canonico M. **Estradiol Level, Estrogen Receptors, and Mortality in Elderly Men: The Three-City Cohort Study.** Clinical Endocrinol (Oxf), *in press*

Article 3

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

Laouali N, Brailly-Tabard S, Helmer C, Ancelin ML, Tzourio C, A, Elbaz A, Guiochon-Mantel A, Canonico M. **Testosterone Level and Cause-Specific Mortality in Older Men without Metabolic Syndrome: The Three-City Cohort Study.**

Autre article durant la thèse

Laouali N, Pilorget C, Cyr D, Neri M, Kaerlev L, Sabroe S, Gorini G, Richiardi L, Morales-Suárez-Varela M, Llopis-Gonzalez A, Ahrens W, Jöckel KH, Afonso N, Eriksson M, Merletti E, Olsen J, Lynge E, Guénel P. **Occupational exposure to organic solvents and risk of male breast cancer: a European multicenter case-control study.** Scand J Work Environ Health. 2018 Feb 6. pii: 3717. doi: 10.5271/sjweh.3717.

Communications affichées

Testostérone endogène, syndrome métabolique et risque de mortalité toute cause chez les hommes âgés. Résultats de l'étude de cohorte des Trois Cités.

N. Laouali, S. Brailly-Tabard, C. Helmer, C. Tzourio, ML. Ancelin, A. Guiochon-Mantel, M. Canonico

Poster au congrès de la Société Française d'Endocrinologie à Bordeaux en octobre 2016.

Estradiol endogène, récepteurs aux estrogènes et risque de mortalité toute cause chez les hommes âgés. Résultats de l'étude de cohorte Trois Cités.

N. Laouali, S. Brailly-Tabard, C. Helmer, C. Tzourio, ML. Ancelin, A. Guiochon-Mantel, M. Canonico

Poster au congrès de la Société Française d'Endocrinologie à Bordeaux en octobre 2016.

Estradiol Levels, Estrogen Receptors and Risks of All-Cause Mortality in Elderly Men: The Three-City Prospective Cohort Study.

N. Laouali, S. Brailly-Tabard, C. Helmer, C. Tzourio, ML. Ancelin, A. Guiochon-Mantel, M. Canonico

Poster au congrès de la Society for Epidemiologic Research à Seattle en juin 2017.

Liste des acronymes et abréviations

3C : Etude des Trois Citées

95% IC : Intervalle de confiance à 95%

ATC : Classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

CBG : Corticosteroid-Binding globulin

CépiDC : Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès

CIM : Classification Internationale des Maladies

CRP : Protéine C réactive

DHT : Dihydrotestostérone

EDC : Effet Direct Contrôlé

EDN : Effet Direct Naturel

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EGSIR : European Group for the Study of Insulin Resistance

EIN : Effet Indirect Naturel

ER : Récepteur aux estrogènes

ESR1 : Estrogen Receptor 1 ou récepteur α aux estrogènes

ESR2 : Estrogen Receptor 2 ou récepteur β aux estrogènes

ET : Ecart-type

ETot : Effet Total

FSH : Follicule-Stimulating Hormone

GC-MS : Gas Chromatography-Mass Spectrometry

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

HDL : Lipoprotéine de haute densité

HPLC : Chromatographie liquide haute pression

HR : Hazard Ratio

IDF : International Diabetes Federation

IL-6 : Interleukine-6

IMC : Indice de Masse Corporelle

IPW : Inverse Probability Weight

LC-MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LH : Hormone lutéinisante

MMSE : Mini Mental State Examination

NCEP-ATPIII : National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III

PCR : Réaction de polymérisation en chaine

RIA : RadioImmunoAssay

SHBG : Sex Hormone Binding Globulin

SNP : single nucleotide polymorphism

Liste des tableaux

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des méthodes de dosage d'hormones.	62
Tableau 2 : Caractéristiques générales à l'inclusion des hommes de la cohorte 3C et comparaison de ces caractéristiques en fonction de l'appartenance à la sous-cohorte.	86
Tableau 3 : Mortalité toutes causes associée aux facteurs de risque cardiométaboliques et aux antécédents d'AVC et maladie coronaire dans la cohorte totale des hommes et dans la sous-cohorte, avec ou sans la pondération par l'inverse de la probabilité. ...	88
Tableau 4 : Caractéristiques générales à l'inclusion des hommes de l'échantillon d'étude.	90
Tableau 5 : Coefficients de corrélation entre les hormones sexuelles	93
Tableau 6 : Caractéristiques des hommes en fonction des tertiles de distribution de la testostérone totale.	94
Tableau 7 : Déterminants de la testostérone totale chez les hommes de l'échantillon (n = 473).	95
Tableau 8 : Caractéristiques des hommes en fonction des tertiles de la distribution de l'estradiol.	96
Tableau 9 : Déterminants de l'estradiol chez les hommes de l'échantillon (n = 473).	97
Tableau 10 : Caractéristiques des hommes selon le statut vital après 12 ans de suivi.	99
Tableau 11 : Caractéristiques à l'inclusion des hommes selon le statut vital par cause après 12 ans de suivi.	100
Tableau 12 : Caractéristiques générales à l'inclusion des hommes selon le statut syndrome métabolique.	104
Tableau 13 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi [¥]	105
Tableau 14 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi selon le statut syndrome métabolique [¥]	107
Tableau 15 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi chez les hommes présentant un syndrome métabolique en fonction de la présence des différents composants du syndrome métabolique [¥]	108
Tableau 16 : Effets direct, indirect, et total de la testostérone totale sur la mortalité toutes causes et la proportion de l'effet total médiée par le syndrome métabolique.	109

Tableau 17 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique, après suppression des décès survenus les 4 premières années de suivi [¥]	111
Tableau 18 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique défini par le NCEP: ATPIII et l'EGSIR [¥]	112
Tableau 19 : Testostérone totale et mortalité par causes spécifiques après 12 ans de suivi chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique [¥]	114
Tableau 20 : Distribution des polymorphismes génétiques dans l'échantillon total et en fonction du statut vital et de la concentration en estradiol.	116
Tableau 21: Association marginale entre les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes et la mortalité toutes causes après 12 ans de suivi [¥]	117
Tableau 22 : Estradiol et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi [¥]	118
Tableau 23 : Estradiol et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi en fonction des polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes [¥]	120
Tableau 24 : Comparaison entre les niveaux d'estradiol et les polymorphismes des récepteurs aux estrogènes selon le statut vital après 12 ans [¥]	122
Tableau 25 : Estradiol et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi, après suppression des décès survenus les 4 premières années de suivi [¥]	123
Tableau 26 : Estradiol et mortalité par causes spécifique après 12 ans de suivi [¥]	124
Tableau 27 : Caractéristiques des hommes en fonction des tertiles de distribution de la testostérone biodisponible.	169
Tableau 28 : Déterminants de la testostérone biodisponible chez les hommes de l'échantillon (n = 473).	170
Tableau 29 : Testostérone biodisponible et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi [¥]	171
Tableau 30 : Testostérone biodisponible et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique [¥]	172
Tableau 31 : Testostérone biodisponible et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi chez les hommes présentant un syndrome métabolique en fonction de la présence des différents composants du syndrome métabolique [¥]	173
Tableau 32 : Effets direct, indirect, et total de la testostérone biodisponible sur la mortalité toutes causes et la proportion de l'effet total médiée par le syndrome métabolique.	173
Tableau 33 : Testostérone biodisponible et mortalité par causes spécifiques après 12 ans de suivi chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique [¥]	174

Tableau 34 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique et ajustements additionnels sur les composants du syndrome métabolique [¥]	175
Tableau 35 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique et ajustements additionnels sur l'état de dépression et le déclin cognitif [¥]	176
Tableau 36 : Estradiol et décès d'origine cardiovasculaire après 12 ans de suivi et ajustements additionnels sur l'hypercholestérolémie et l'IMC [¥]	177

Liste des figures

Figure 1 : Biosynthèse de la testostérone à partir du cholestérol d'après Naessen [4].	30
Figure 2 : Schéma de régulation de la testostérone.	32
Figure 3 : Fractions de la testostérone circulante.	33
Figure 4 : Biosynthèse de l'estradiol à partir de la testostérone d'après Naessen [4].	35
Figure 5 : Schéma illustratif de la relation entre l'estradiol et la testostérone.	36
Figure 6 : Gène encodant le récepteur ER α : <i>ESR1</i> d'après Herrington [18].	37
Figure 7 : Gène encodant le récepteur ER β : <i>ESR2</i> d'après Zhao [19].	38
Figure 8 : Evolution de la testostérone sérique avec l'âge chez les hommes d'après Feldman [36].	40
Figure 9 : Taux de mortalité (pour 1 000) en France métropolitaine (1999-2013), d'après les données Insee et CépiDC.	43
Figure 10 : Flow-chart de l'échantillon d'étude.	59
Figure 11 : Modèle de médiation d'après Baron et Kenny [129].	78
Figure 12 : Distributions des poids avant et après stabilisation.	87
Figure 13 : Histogrammes de la distribution des hormones de l'échantillon à l'inclusion. .	92
Figure 14: Relation entre les niveaux d'estradiol et le risque de mortalité toutes causes avec les splines cubiques (3 nœuds placés au 10 ^{ème} , 50 ^{ème} , et 90 ^{ème} percentile).	119
Figure 15 : Relation entre les niveaux d'estradiol et le risque de mortalité cardiovasculaire avec les splines cubiques (3 nœuds placés au 10 ^{ème} , 50 ^{ème} , et 90 ^{ème} percentile).	125

1. Introduction

Notre compréhension du rôle des hormones stéroïdiennes dans la physiologie humaine et l'état de santé des individus a considérablement progressé sur ces dernières décennies. Durant de nombreuses années, la testostérone et l'estradiol ont été respectivement étudiés chez les hommes et chez les femmes de façon quasi-exclusive, et étaient considérées uniquement responsables du développement et du maintien des caractères sexuels primaires et secondaires ainsi que des fonctions qui en découlaient. Pourtant, les connaissances actuelles ont permis d'établir un rôle de chacune de ces hormones dans les deux sexes et de mettre en évidence leurs influences sur un ensemble de fonctions biologiques.

A tout âge, et notamment au cours du vieillissement, le taux de mortalité des hommes est supérieur à celui des femmes. Une part non négligeable de cette différence a pu être expliquée par des comportements de santé plus favorables chez les femmes qui présentent donc des profils moins à risque que les hommes. Néanmoins, cette disparité reste largement inexpliquée. Si le rôle des hormones sexuelles dans la mortalité est évoqué depuis de nombreuses années, les résultats demeurent encore aujourd'hui très contradictoires.

Ce chapitre introductif a pour but de présenter l'enjeu global de la thématique concernant le rôle étiologique des hormones sexuelles sur la mortalité chez les hommes au cours du vieillissement. Après une description des grandes lignes de la synthèse des hormones sexuelles, de leurs effets physiologiques et des pathologies liées à leur évolution au cours du vieillissement, nous présenterons une synthèse des études épidémiologiques des quinze dernières années sur le lien entre les hormones sexuelles et la mortalité dans l'optique de situer et de justifier l'intérêt de la problématique soulevée. Enfin, nous présenterons les objectifs de la thèse.

1.1 Testostérone

1.1.1 Synthèse et régulation

La testostérone est la principale hormone sexuelle chez les hommes ; elle appartient à la famille des androgènes appelés aussi hormones stéroïdiennes anabolisantes. Elle est synthétisée à partir du cholestérol extrait des lipoprotéines plasmatiques, notamment de la fraction de faible densité (LDL), mais également à partir de celui des membranes cellulaires. La testostérone est produite et sécrétée majoritairement (environ 95 %) au niveau des cellules interstitielles de Leydig du testicule [1] et en faible quantité à partir des glandes surrénales. La fonction principale des cellules de Leydig est la production d'androgènes, mais elles sont également responsables de la synthèse de facteurs de croissance tel que l'IGF1 qui intervient dans la régulation autocrine et paracrine du testicule [2]. Les cellules de Leydig se situent dans le tissu conjonctif occupant l'espace entre les tubes séminifères, siège 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, Δ^4 -androstènedione, androstènediol) et des métabolites biologiquement actifs tels que la 5α -dihydrotestostérone (DHT) [3].

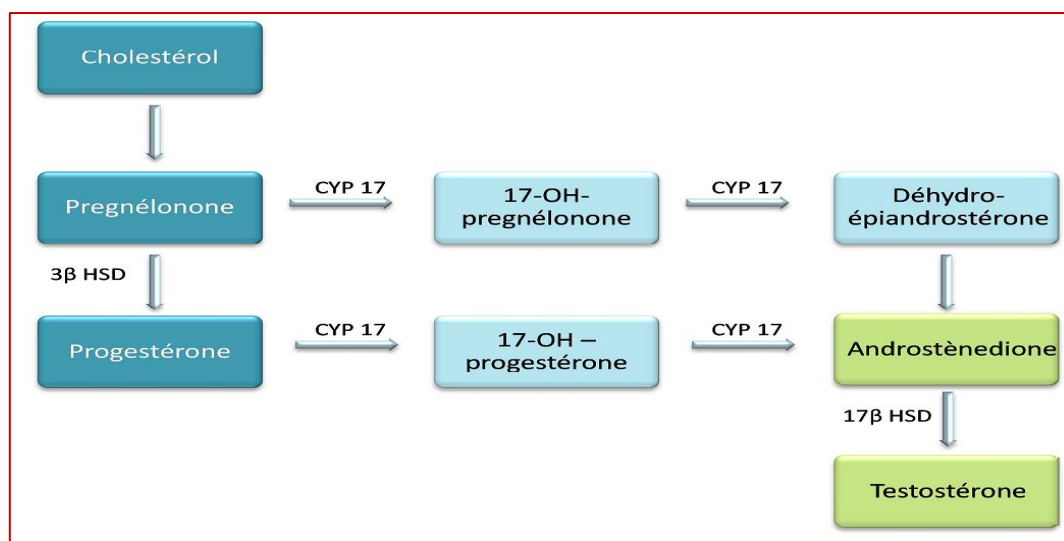


Figure 1 : Biosynthèse de la testostérone à partir du cholestérol d'après Naessen [4].

Dans les cellules de Leydig, la synthèse de la testostérone est sous le contrôle strict de l'hormone lutéinisante (LH) produite par les cellules gonadotropes du lobe antérieur de l'hypophyse. La synthèse est également influencée par des facteurs locaux provenant d'autres cellules testiculaires ou de facteurs externes tels que les médicaments et les produits chimiques de l'environnement. La quantité de testostérone utilisable par les tissus est principalement régulée au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire par l'intermédiaire de 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 la 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 peut enfin être transformée et éliminée. De cet équilibre complexe entre les systèmes de synthèse et ceux de transformation et de dégradation dépend la stabilité des taux de testostérone.

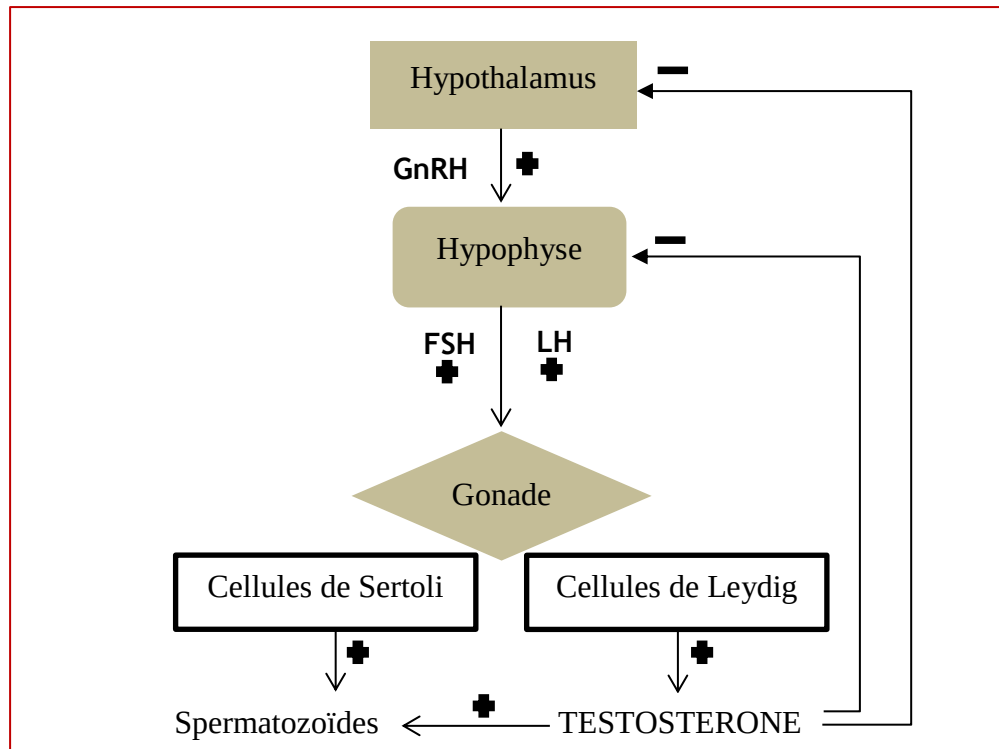
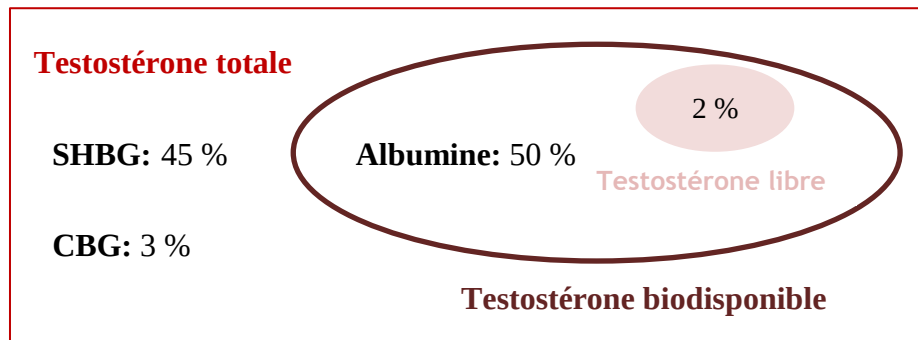


Figure 2 : Schéma de régulation de la testostérone.

La testostérone circule en grande majorité dans le sang via des liaisons à des protéines de transport. La testostérone dite « totale » est composée de plusieurs fractions. Une partie minoritaire de l'hormone, environ 2 %, circule sous forme libre. Une seconde partie, représentant 30 à 55 % est faiblement liée à l'albumine. Enfin, 45-75 % sont liés aux protéines de transport des stéroïdes sexuels appelées SHBG (sex hormone binding globulin) et CBG (Corticosteroid-Binding globulin) [5, 6], dont les liaisons fortes rendent cette fraction non utilisable. La testostérone biodisponible représente la somme de la testostérone libre et de la testostérone liée, soit 40 à 50 % de la testostérone totale (Figure 3). C'est la partie qui est biologiquement active sur les tissus. 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 5 α -réductase qui convertit la testostérone en DHT. La DHT est un puissant androgène qui se lie dès son entrée dans la cellule-cible au récepteur cytoplasmique des androgènes qui va permettre d'assurer une partie des effets androgéniques.

Par ailleurs, une faible quantité de testostérone est convertie en estradiol (17β -estradiol). Ce mécanisme de conversion, appelé aromatisation, a lieu principalement dans le tissu adipeux et est responsable, chez les hommes, de la production de près de 80 % des estrogènes circulants, le reste provenant des cellules de Sertoli au niveau testiculaire.



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

Figure 3 : Fractions de la testostérone circulante.

1.1.2 Effets physiologiques

De façon générale, les androgènes sont des hormones à effets anabolisants qui agissent sur les tissus via leur récepteur. Ce récepteur aux androgènes est unique et se distribue largement dans de nombreux tissus cibles. Sa concentration est maximale dans les organes sexuels mais il est également présent au niveau du cœur, du foie, des muscles ou des os [7]. Il est bien connu depuis de nombreuses années que la testostérone possède un rôle central dans la croissance et l'embryogenèse des organes reproducteurs mâles durant la vie intra-utérine. Elle est aussi responsable du développement et du maintien des caractères sexuels secondaires à la puberté telles que, par exemple, l'approfondissement de la voix, l'augmentation de la taille du pénis et des testicules et la pilosité masculine. La testostérone joue également un rôle après la puberté et tout au long de la vie dans le maintien de la libido ainsi que dans l'initiation et la poursuite de la spermatogénèse [8].

A côté de son rôle bien connu sur le développement des organes génitaux et la sexualité, il est maintenant admis que la testostérone possède également une influence sur l'hématopoïèse en favorisant la production de globules rouges. Elle joue par ailleurs un rôle dans le maintien de la force et de la masse musculaire et elle est responsable de la masse et de la densité osseuse.

Enfin, la testostérone est impliquée dans le maintien d'un ensemble de fonctions métaboliques. Des études transversales ont montré qu'elle contribuait à réguler l'équilibre de la composition corporelle entre masse musculaire et masse grasse ainsi que la répartition de cette masse grasse [9, 10]. D'autres travaux ont suggéré que la testostérone jouait également un rôle dans le métabolisme glucido-lipidique, en favorisant le maintien d'une glycémie et d'une cholestérolémie optimales [10].

1.2 Estradiol

1.2.1 Synthèse et régulation

L'estradiol (17 β -estradiol) est la principale hormone sexuelle chez les femmes ; elle appartient à la classe des estrogènes. Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes existant sous deux formes physiologiques principales, incluant l'estrone dont le pouvoir estrogénique est faible, et surtout l'estradiol correspondant à la forme la plus active de l'hormone. Chez l'homme, près de 80 % de la production d'estradiol provient de la conversion périphérique de la testostérone par une enzyme appelée aromatase, appartenant à la superfamille des cytochromes P450, et qui est également responsable de la transformation de l'androstènedione en estrone (Figure 4). Cette aromatisation a lieu principalement dans les tissus adipeux, mais aussi en quantité moins importante dans la peau, le rein, l'os et le cerveau [11]. Enfin, les estrogènes proviennent en faible proportion (20 % environ) d'une production testiculaire.

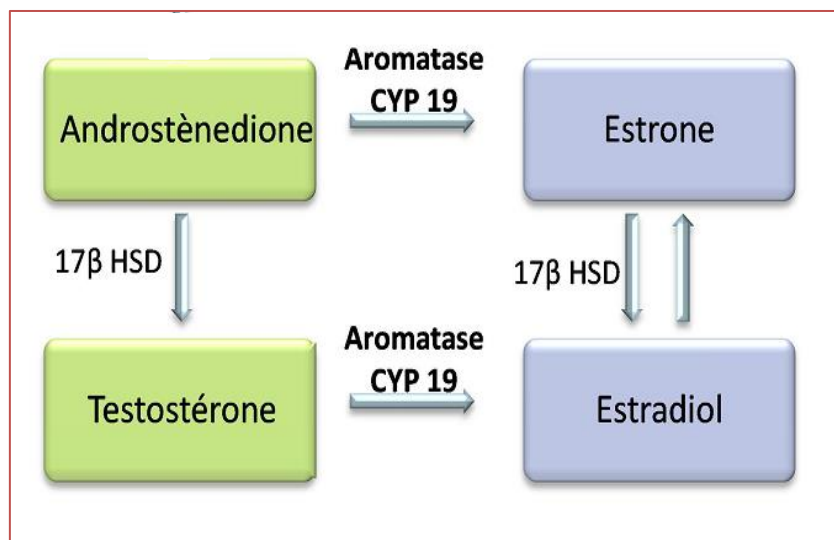


Figure 4 : Biosynthèse de l'estradiol à partir de la testostérone d'après Naessen [4].

Quelle que soit son origine, le transport de l'estradiol est soumis aux mêmes règles que celles décrites pour la testostérone. L'estradiol circule dans le plasma essentiellement lié à des protéines porteuses, notamment la SHBG avec une forte affinité (51 %) et l'albumine lié plus faiblement (47 %) [12]. Comme pour la testostérone, seules les fractions libres (2 %) et liées à l'albumine peuvent atteindre les tissus cibles. Elles constituent ainsi la forme biologiquement active de l'estradiol appelée biodisponible.

Chez les hommes, la production d'estradiol est étroitement liée à celle de la testostérone en tant que précurseur. Elle est donc soumise en grande partie aux régulations que l'axe hypothalamo-hypophysaire exerce sur la synthèse et la dégradation des androgènes. Les concentrations de ces deux hormones sont d'ailleurs relativement corrélées. L'estradiol joue également un rôle direct au niveau du rétrocontrôle des gonadotrophines. Dans des conditions physiologiques normales, cet effet est limité en raison d'une balance testostérone/estradiol très majoritairement en faveur des androgènes. Si l'aromatisation des androgènes augmente, par exemple en raison d'un gain de poids, des niveaux plus élevés d'estradiol entraîneront des taux de testostérone plus bas, diminuant ainsi la quantité de précurseur pour la synthèse de l'estradiol. Il est d'ailleurs maintenant bien établi que l'obésité est associée à des niveaux plus bas de testostérone [13], et que cela pourrait être lié, au moins en partie, à l'augmentation des taux d'estrogènes associés à l'obésité [14]. La régulation des niveaux d'estrogènes est donc fortement soumise à l'équilibre de la composition corporelle et au pourcentage de masse grasse comme illustré sur le schéma ci-dessous (Figure 5).

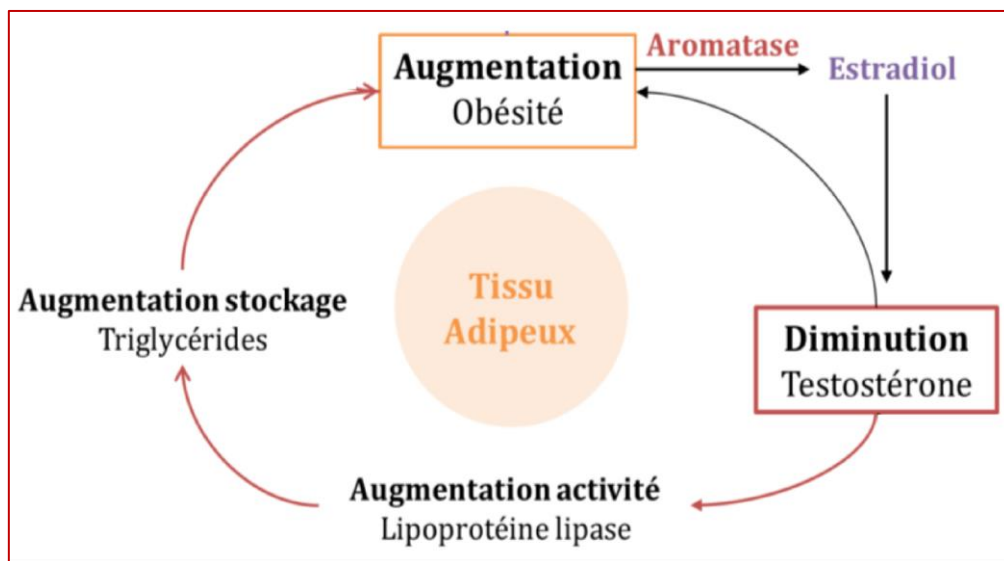


Figure 5 : Schéma illustratif de la relation entre l'estradiol et la testostérone.

1.2.2 Effets physiologiques

Les estrogènes agissent sur différents tissus cibles en se fixant sur leurs récepteurs ER α (ou ESR1) et ER β (ou ESR2) dont l'équilibre intracellulaire sera responsable de l'effet des hormones [15]. Les récepteurs des estrogènes sont respectivement codés par les gènes *ESR1* et *ESR2* (Figures 6 et 7 respectivement) situés sur les chromosomes 6 et 14 [16, 17]. Fortement homologues, ER α et ER β s'expriment de façon variable et spécifiquement dans différents tissus, notamment le système cardiovasculaire et la prostate.

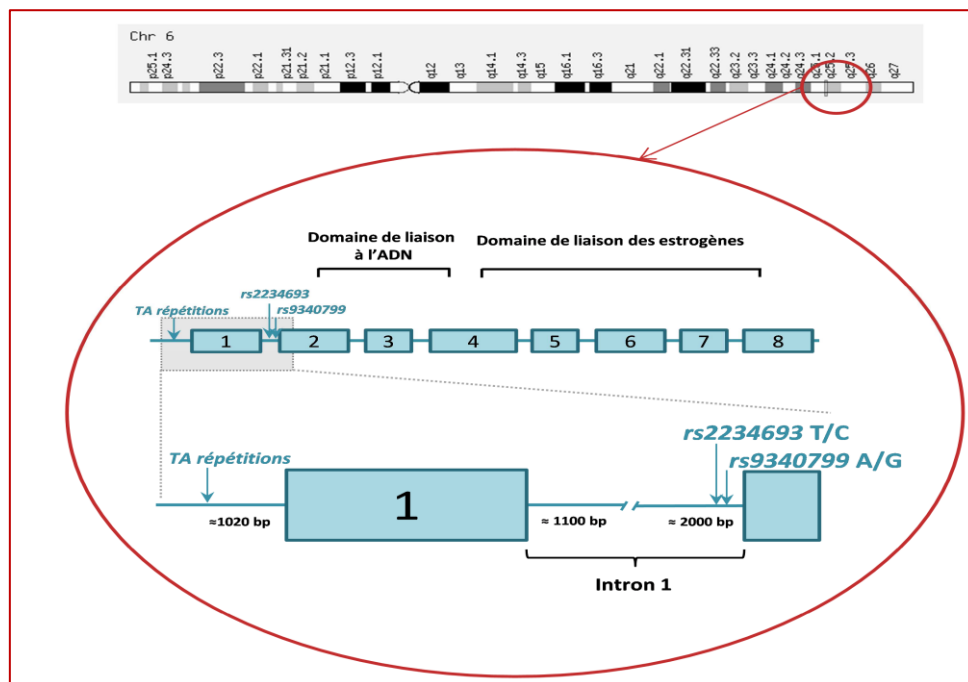


Figure 6 : Gène encodant le récepteur ER α : *ESR1* d'après Herrington [18].

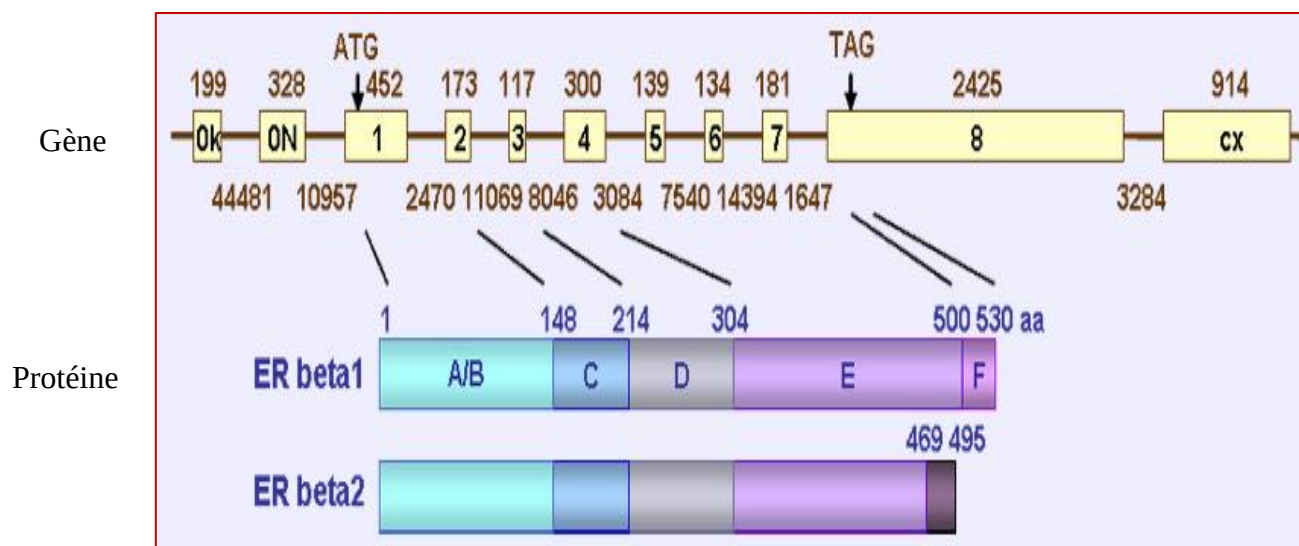


Figure 7 : Gène encodant le récepteur ER β : *ESR2* d'après Zhao [19].

La discussion des effets des estrogènes chez les hommes pourrait sembler inutile, puisque les estrogènes ont longtemps été exclusivement étudiés dans le sexe opposé et circulent, chez les hommes, en quantité bien plus limitée que les androgènes. Pourtant, avec l'amélioration des techniques des dosages hormonaux, des faibles concentrations ont pu être dosées et il a été montré que les taux circulants d'estradiol chez les hommes étaient plus élevés que ceux détectés chez les femmes ménopausées. Il est maintenant admis que les estrogènes et les androgènes sont communs aux deux sexes, la différence résidant dans leur cible, leur concentration respective et par conséquent dans leur ratio. Comme indiqué précédemment, l'estradiol intervient de façon importante dans le rétrocontrôle de la sécrétion des gonadotrophines, notamment de la LH, mais aussi de la FSH. Elle exerce en effet une inhibition tonique de la sécrétion des gonadotrophines au niveau hypophysaire et hypothalamique [20-22]. Ce phénomène pourrait expliquer, qu'en dépit d'une concentration plasmatique de testostérone normale ou élevée, il a été observé des taux élevés de gonadotrophines chez des hommes déficients en aromatasase, des hommes traités avec un inhibiteur de l'aromatasase, ou ceux présentant une résistance aux estrogènes [23-26].

Les estrogènes jouent aussi un rôle essentiel dans le métabolisme osseux, notamment dans les processus de maturation du squelette et de fusion des cartilages de croissance [27, 28]. Des analyses multifactorielles ont indiqué de façon claire que l'estradiol prédisait mieux que la testostérone la densité minérale osseuse chez les hommes âgés et les estrogènes étaient plus systématiquement associés aux valeurs des marqueurs sériques de la résorption osseuse [3, 29]. Les taux d'estradiol endogène ont également été associés à ceux de l'ostéoprotégérine, un

régulateur important du métabolisme osseux, dont l'action est de limiter la résorption ostéoclastique [30].

Enfin, les estrogènes jouent un rôle dans les mécanismes de l'inflammation. Des études épidémiologiques chez des hommes adultes ont montré que des taux élevés d'estrogènes étaient positivement associés à la protéine C réactive (CRP) [31] et à l'interleukine-6 (IL-6) [32]. D'ailleurs, il a été suggéré que l'effet de l'estradiol sur l'inflammation pourrait moduler la relation de l'hormone sur la morbidité cardiovasculaire [31]. Cependant, les estrogènes sont également connus pour avoir une action neuro-protectrice par des mécanismes anti-inflammatoires, [33], notamment suggérés dans des pathologies telles que la sclérose en plaque, la maladie d'Alzheimer ou les lésions cérébrales ischémiques [34].

1.3 Déficit hormonal lié à l'âge

1.3.1 Andropause

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. Chez un adulte sain, la concentration physiologique moyenne de testostérone est de l'ordre de 12 nmol/L [35]. La sénescence s'accompagne de changements progressifs dans l'activité gonadotrope et/ou leydigienne, semblables à ceux observés dans certaines pathologies ou avec des prises médicamenteuses qui peuvent modifier l'équilibre androgénique. Au cours du vieillissement, la production de la testostérone baisse de 0,8 à 1,3 % chaque année conjointement à une augmentation des taux plasmatiques de SHBG, entraînant une diminution globale de la testostérone biodisponible atteignant 30 à 50 % vers 50-70 ans [11]. La figure 8 résume cette évolution des concentrations sériques de la testostérone chez les hommes selon les différents stades du développement [36].

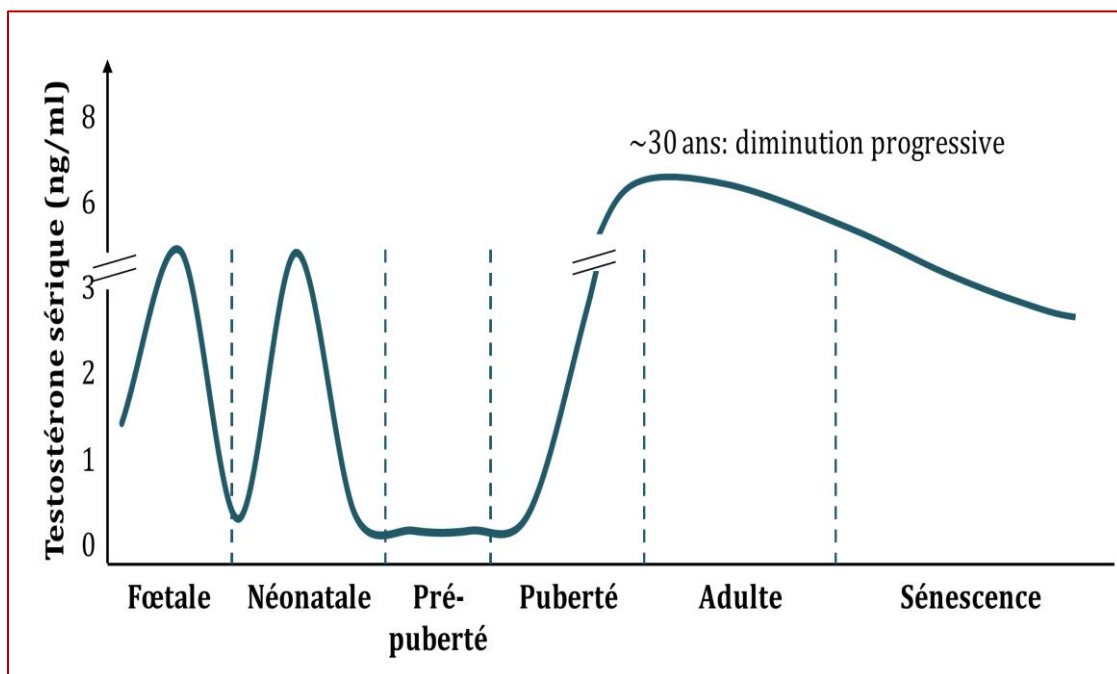


Figure 8 : Evolution de la testostérone sérique avec l'âge chez les hommes d'après Feldman [36].

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 en partie 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. On préfère donc souvent le terme de « déficit androgénique lié à l'âge » qui associe une diminution des taux de testostérone et un syndrome clinique d'hypoandrogénie. De nombreuses études transversales [13], puis des études longitudinales [36-38], ont mis en évidence cette diminution progressive de la testostérone tout en montrant une grande variabilité interindividuelle de ce déclin. Pourtant très dépendants des concentrations de testostérone, les taux d'estradiol semblent quant à eux rester assez stables, ce qui peut être rapproché de l'augmentation de la masse grasse et de l'aromatisation adipocytaire des androgènes au cours du vieillissement.

Les mécanismes à l'origine des changements observés chez l'homme au niveau hormonal ne sont pas encore totalement connus. Deux phénomènes simultanés pourraient être à l'origine de la chute de la testostérone circulante observée au cours du vieillissement. Il s'agirait de la fonction testiculaire à proprement parler mais également de la régulation hypothalamique par la GnRH. Le vieillissement normal s'accompagne d'une réduction du nombre de cellules de Leydig avec la chute progressive de la production de base en testostérone. Cette diminution des réserves cellulaires est associée à une altération des rythmes sécrétoires de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique. 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, comme énoncé précédemment, 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 des fractions libre et biodisponible de la testostérone.

1.3.2 Conséquence du déficit androgénique lié à l'âge

Durant ces dernières années, plusieurs études se sont intéressées à l'impact du déficit androgénique lié à l'âge sur la santé des hommes. Les premières conséquences en sont, bien évidemment, la dysfonction sexuelle dont la prévalence augmente conjointement avec la diminution des taux de testostérone circulants [39]. D'ailleurs, la fonction érectile se trouve rétablie chez les individus hypogonadiques supplémentés en hormone [40, 41].

En outre, il a été montré de façon cohérente que la déficience en androgène pouvait entraîner une altération de l'équilibre glucido-lipidique. Les taux bas de testostérone, observés notamment au cours du vieillissement, seraient associés à un moins bon métabolisme du glucose et à des taux plus élevés de triglycérides et de cholestérol concomitants avec une réduction du HDL (Lipoprotéine de haute densité) cholestérol [42-46]. De même, il a été mis en évidence une augmentation de l'obésité centrale, du tour de taille et de l'hypertension artérielle en relation avec la réduction des niveaux de testostérone [47]. Globalement, ces paramètres peuvent être réunis dans un phénotype clinique plus large appelé le syndrome métabolique dont il est maintenant reconnu que la prévalence est plus importante chez les hommes présentant les niveaux les plus bas de testostérone [48-54]. Certaines études avaient d'ailleurs montré que la restauration des niveaux de testostérone à des seuils physiologiques améliorait les composants du syndrome métabolique. Néanmoins, les essais randomisés à ce sujet restent contradictoires [55]. La relation entre le syndrome métabolique et la testostérone sera largement discutée dans la fin de cette introduction, notamment car elle fait l'objet, en lien avec la mortalité, du premier travail de cette thèse.

Il a été démontré que les estrogènes jouaient un rôle central dans le métabolisme squelettique chez l'homme et que la réduction des taux d'estradiol liée à l'âge était principalement associée à un risque accru de fractures [56, 57]. De plus, des cas rapportés d'ostéoporose sévère chez des hommes présentant une résistance aux estrogènes ou une carence en aromatase suggéraient un rôle clé de l'estradiol dans la régulation de la croissance et du maintien des os [58]. Enfin, les hommes présentant une résistance aux estrogènes, en raison d'une mutation du gène *ESR1* ou du gène *CYP19A1* (gène codant l'aromatase), étaient plus à risque d'ostéopénie sévère associée à des marqueurs élevés de remodelage osseux [59].

1.4 Association entre les hormones sexuelles et la mortalité

Globalement, le taux de mortalité des hommes est supérieur à celui des femmes. Comme en témoigne la figure ci-après (Figure 9), cette différence est observée à tous les âges de la vie et persiste au cours du vieillissement. Des profils similaires d'associations spécifiques avec différentes pathologies en fonction du sexe ont également été mis en évidence. C'est notamment le cas du risque de maladie cardiovasculaire, de maladie rénale ou de maladie neurodégénérative telle que la maladie de Parkinson. Si une part non négligeable de cette différence de mortalité a pu être expliquée par des profils de risque plus favorables chez les femmes, cette disparité reste largement inexpliquée. Le rôle des hormones sexuelles est alors évoqué depuis de nombreuses années, mais les résultats demeurent très contradictoires concernant la testostérone. Par ailleurs, l'influence de l'estradiol a été très peu évaluée.

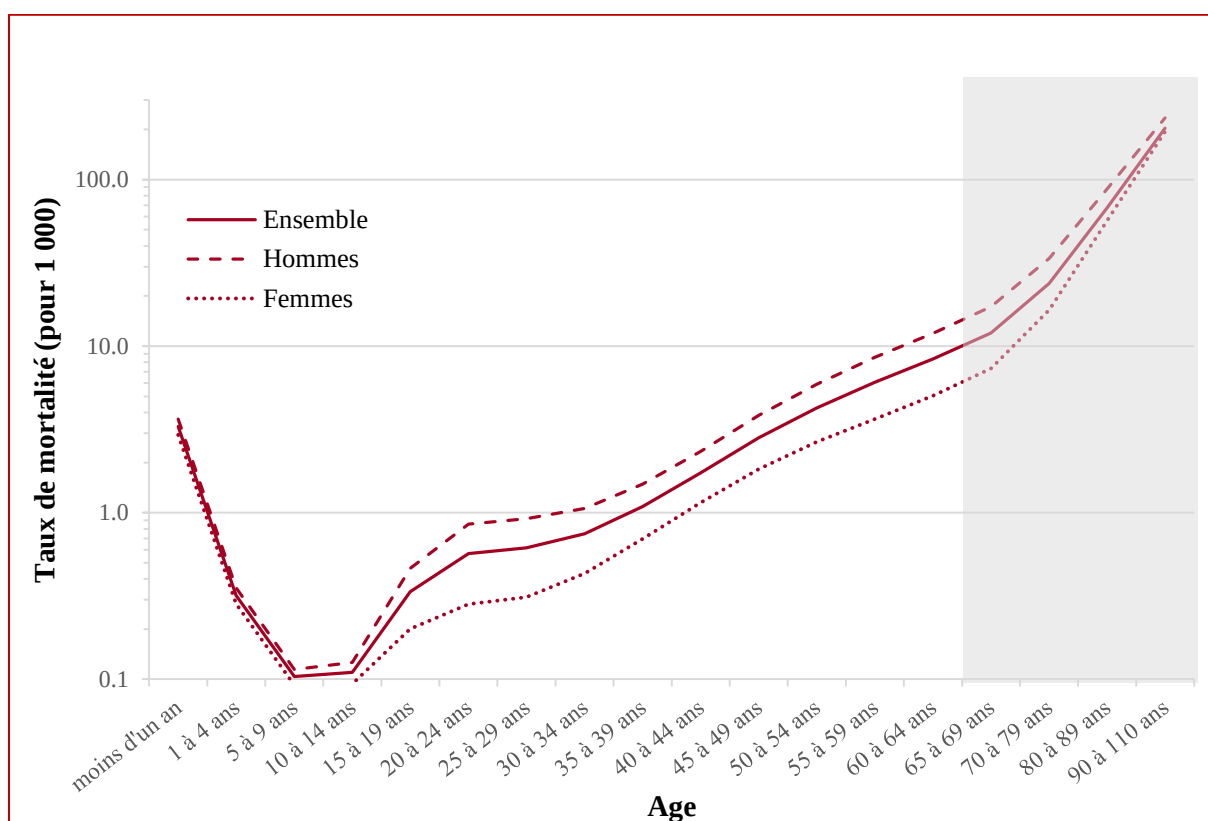


Figure 9 : Taux de mortalité (pour 1 000) en France métropolitaine (1999-2013), d'après les données Insee et CépiDC.

1.4.1 Testostérone et mortalité

Depuis plusieurs décennies, différentes études épidémiologiques ont examiné l'association entre les niveaux de testostérone totale et le risque de mortalité chez les hommes âgés. Cependant, les résultats demeurent contradictoires. Alors que certaines études montraient un risque accru de décès chez les hommes ayant les niveaux de testostérone les plus bas [60-64], d'autres n'ont trouvé aucune association [65-68]. L'ensemble de ces résultats, examinés par Araujo dans une méta-analyse, confirmait cette inconsistance [69] qui persistait également dans les études les plus récentes où l'hypothèse d'une relation quadratique pourrait se dessiner [69-72]. L'analyse des caractéristiques des sujets ainsi que des causes de mortalité pourrait permettre d'expliquer, au moins en partie, ces divergences.

1.4.1.1 Influence des caractéristiques cliniques des sujets

Une lecture plus fine de la littérature existante nous a permis de faire le constat que les études rapportant une association significative entre les niveaux de testostérone bas et la mortalité ont été le plus souvent réalisées chez des hommes âgés qui présentaient de faibles taux de HDL-cholestérol et une forte prévalence de dyslipidémie, d'obésité abdominale ou de diabète qui constituent individuellement les composants du syndrome métabolique [60-62, 64, 73, 74]. De plus, deux études antérieures ont suggéré que l'association des niveaux bas de la testostérone plasmatique et la mortalité toutes causes pourrait être limitée aux hommes avec un syndrome métabolique [75] et une obésité [76]. Inversement, ce sont les investigations réalisées chez des hommes jeunes ou présentant une faible prévalence de ces facteurs de risque dans lesquelles les associations entre la testostérone et la mortalité restaient non conclusives.

Il est vrai que les taux bas de testostérone sont eux-mêmes associés aux différents composants du syndrome métabolique et au phénotype clinique lui-même et ces associations sont maintenant connues pour être bidirectionnelles. Plusieurs études ont montré une relation entre l'insulino-résistance, le diabète, le syndrome métabolique et des faibles niveaux de testostérone [77, 78]. Un bas taux de testostérone a également été relié à des niveaux délétères de HDL-cholestérol chez les hommes [79]. Enfin, de faibles concentrations de testostérone endogène ont été associées à l'hypertension [80], et cette relation semble indépendante d'autres facteurs liés au syndrome métabolique [81]. Néanmoins, si une relation entre la

testostérone et la mortalité pouvait être expliquée par la présence d'un syndrome métabolique ou de ses composants chez les hommes présentant les niveaux les plus bas d'hormones, les taux d'androgènes variaient globalement assez peu en moyenne entre les études qui rapportaient des associations et celles qui ne montraient rien, suggérant qu'un autre phénomène que la médiation pourrait relier la testostérone, le syndrome métabolique et la mortalité.

Sur la base de ces observations, nous avons émis l'hypothèse qu'en plus d'être en partie médiée par le syndrome métabolique, l'association de la testostérone avec la mortalité toutes causes chez les hommes âgés pourrait être modulée par la présence de ce phénotype clinique. Par conséquent, les analyses comparant l'association entre la testostérone et le risque de décès chez les hommes avec et sans syndrome métabolique représenteraient un bon moyen de mettre en évidence les différents impacts de la testostérone sur la mortalité toutes causes. De plus, un modèle de médiation permettant la prise en compte d'une interaction permettrait de faire la part de l'effet médiateur et de l'effet modificateur du syndrome métabolique sur la relation entre la testostérone et la mortalité toutes causes chez les hommes. Une telle analyse pourrait permettre d'apporter un premier niveau d'explication sur les inconsistances de la littérature à ce sujet.

1.4.1.2 Mortalité par causes spécifiques

Un second niveau d'explication pourrait porter sur des différences dans les causes de mortalité et la possibilité que la testostérone présente une association différentielle avec le risque de décès en fonction de son origine. Plusieurs études épidémiologiques ont examiné l'association entre les niveaux de testostérone et la mortalité par causes spécifiques notamment par maladie cardiovasculaire et cancers.

De très nombreuses études ont évalué le lien entre les niveaux de testostérone et les différents facteurs de risque cardiovasculaire et la plupart d'entre elles ont montré que les bas niveaux de testostérone étaient en faveur d'un profil cardiovasculaire défavorable [82, 83]. Ce lien potentiel entre les niveaux faibles de testostérone et les facteurs de risque d'événements cardiovasculaires pousse à croire qu'il existe une possible relation entre la testostérone et la mortalité cardiovasculaire. Pourtant, les données concernant le risque de mortalité

cardiovasculaire en lien avec les niveaux de testostérone, bien que très nombreuses, demeurent très contradictoires. Khaw et al. dans une analyse cas-témoins nichée dans une cohorte ont trouvé que des taux élevés de testostérone étaient associés à un faible risque de mortalité cardiovasculaire [61]. Menke et al. [68] et Hyde et al. [84] ont également rapporté que des taux bas de testostérone libre calculée étaient associés à une mortalité accrue par maladie artérielle. Enfin, deux études de cohortes prospectives ont trouvé que des taux bas de testostérone augmentaient la mortalité cardiovasculaire [62, 85]. En revanche, Araujo et al. ont rapporté une association entre des taux élevés de testostérone libre calculée et la mortalité due à une cardiopathie ischémique [86]. À l'inverse des études montrant une association, ni Smith et al. [65] ni Vikan et al. [67] n'ont trouvé de lien entre les niveaux de testostérone et la mortalité cardiovasculaire. Une méta-analyse des études longitudinales a globalement montré une association entre les niveaux bas de testostérone endogène et la mortalité toutes causes et d'origine cardiovasculaire mais une hétérogénéité marquée entre les études a limité une conclusion ferme et cette question reste donc encore très débattue [87].

Cette inconsistance de résultats concernant la relation entre la testostérone et la mortalité se retrouve également pour les décès par cancers. Alors que certaines études longitudinales avaient montré une association entre des taux bas de testostérone et la mortalité par cancers, [61, 85] y compris avec des données récentes [88], d'autres n'ont trouvé aucune association [62, 72, 86]. Par ailleurs, les mécanismes éventuels restent assez peu établis. Une hypothèse reposerait sur la causalité inverse, à savoir que les niveaux bas de testostérone serait dus à la maladie sous-jacente ou au traitement [89]. Une seconde hypothèse serait l'emballlement des mécanismes d'inflammation liés à la libération de cytokines pro-inflammatoires par les tumeurs malignes et qui seraient responsables à la fois de la diminution des concentrations de testostérone et de l'augmentation du risque de décès [90].

Par conséquent, si les niveaux de testostérone, particulièrement chez les hommes âgés, pouvaient être un déterminant du risque de mortalité, des effets différentiels, le cas échéant, par rapport aux causes spécifiques de mortalité pourraient expliquer en partie l'hétérogénéité des résultats.

1.4.2 Estradiol et mortalité

Pendant des années, les taux circulants d'estradiol chez les hommes, comme chez les femmes ménopausées, étaient bien trop faibles pour pouvoir être dosés. Avec l'amélioration des techniques de dosages et l'abaissement des seuils de détection, ils sont maintenant réalisables et ont permis de montrer que les taux plasmatiques des hommes étaient similaires, voire supérieurs à ceux des femmes après la ménopause. Pourtant, l'influence des estrogènes sur la santé a été quasiment exclusivement évaluée chez les femmes chez lesquelles il a été mis en évidence une association entre des niveaux élevés d'estradiol endogène et une augmentation de la mortalité [91, 92] et de plusieurs pathologies estrogéno-dépendantes [93-95]. Chez les hommes, cette association a été très peu étudiée et les quelques résultats sont controversés. Alors que certaines études ont conduit à des résultats nuls [67, 68, 71, 96], d'autres études ont trouvé des associations significatives, mais dans des directions opposées [64, 66, 72].

1.4.2.1 Influence du contexte génétique

Plusieurs polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes (ER α et ER β) ont été identifiés depuis ces quinze dernières années et ont été mis en lien direct avec différentes pathologies, notamment les maladies artérielles ischémiques, la maladie d'Alzheimer et le cancer, aussi bien chez les femmes que chez les hommes [97-100].

S'il est admis que les estrogènes agissent sur leur tissu cible via une liaison avec leurs récepteurs dont l'activité dépend de ces polymorphismes, leur influence sur le lien entre les niveaux d'estrogènes et les pathologies a été peu étudiée et les seuls résultats disponibles le sont chez les femmes et concernent les maladies artérielles ischémiques et les cancers du sein [98, 100]. Chez les hommes, aucune donnée de ce type n'est actuellement disponible, en particulier concernant la mortalité.

1.4.2.2 Mortalité par causes spécifiques

Comme décrit précédemment, le rôle des estrogènes a été peu évalué sur la mortalité toutes causes et donc à fortiori sur les différentes causes de décès.

Les connaissances actuelles sur la relation entre l'estradiol endogène et le risque de mortalité cardiovasculaire chez les hommes sont limitées et controversées. Certaines études n'avaient rapporté aucune association entre les niveaux d'estradiol endogène et la mortalité par maladie cardiovasculaire [67, 68, 72]. Cependant, une diminution progressive des taux d'estradiol a été récemment associée à une augmentation de la mortalité d'origine cardiovasculaire [88].

Concernant l'association entre l'estradiol et la mortalité par cancer, les données sont également très parcellaires et les quelques études publiées semblaient conclure à une absence d'association [68, 101, 102]. Néanmoins, certaines études qui avaient évalué l'association par type de cancers ont mis en évidence une association positive entre les niveaux d'estradiol et le risque de cancer de la prostate [103] et du sein chez l'homme [104].

La prise en compte de l'origine du décès pourrait donc permettre de mieux comprendre le rôle étiologique de l'estradiol dans la mortalité et d'expliquer les incohérences des données antérieures.

2. Objectifs

2.1 Objectif général

L'objectif général de cette thèse était d'évaluer, à partir des données de l'étude des trois citées (3C), l'association entre les hormones sexuelles et le risque de mortalité chez les hommes au cours du vieillissement. Ce travail s'est attaché à explorer les facteurs cliniques et génétiques des sujets pouvant influencer ces relations ainsi que les différentes causes de mortalité, afin d'approfondir les connaissances du rôle étiologique des hormones au cours du vieillissement et d'améliorer la stratification du risque permettant ainsi d'expliquer, au moins en partie, l'inconsistance des résultats de la littérature.

2.2 Objectifs détaillés

Pour atteindre cet objectif, deux axes principaux ont été développés :

L'étude du lien entre les niveaux plasmatiques de testostérone et le risque de mortalité en tenant compte du contexte clinique et des causes de décès.

D'une part, nous avons évalué le rôle modulateur du syndrome métabolique et de ses composants dans la relation entre les concentrations plasmatiques de testostérone et la mortalité toutes causes. D'autre part, nous avons évalué la relation entre les concentrations plasmatiques de testostérone et le risque de mortalité d'origine cardiovasculaire, par cancers et par autres causes (non cardiovasculaire et non cancers).

L'étude du lien entre les niveaux plasmatiques d'estradiol et le risque de mortalité en tenant compte du contexte génétique et des causes de décès.

D'une part, nous avons évalué le rôle modulateur des polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes ESR1 et ESR2 dans la relation entre les concentrations plasmatiques d'estradiol et la mortalité toutes causes. D'autre part, nous avons évalué la relation entre les concentrations plasmatiques d'estradiol et le risque de mortalité d'origine cardiovasculaire, par cancers et par autres causes (non cardiovasculaire et non cancers).

3. Population et méthodes

3.1 Etude des Trois cités

3.1.1 Protocole de l'étude

L'étude des 3C est une cohorte française prospective en population générale dont l'objectif principal était d'évaluer le risque de démence et de déclin cognitif lié aux facteurs de risque vasculaire chez les hommes et les femmes âgés de plus de 65 ans [105]. C'est une étude multicentrique menée dans trois villes françaises : Bordeaux, Dijon et Montpellier. Le recrutement s'est effectué entre mars 1999 et mars 2001, par tirage au sort, à partir des listes électorales. Le nombre de participants par ville a été déterminé de façon proportionnelle à la taille de la population de chacune d'entre elles. Pour être éligible, les personnes devaient être non institutionnalisées, âgées de plus de 65 ans et vivant dans l'une de ces trois villes ou leur banlieue. Toutes les personnes éligibles et leur conjoint ont reçu une lettre explicative de l'étude avec une invitation à y participer. En cas de non-réponse à cette première lettre, les personnes étaient contactées par téléphone. Par cette méthode, 9 693 sujets ont été inclus, soit 37 % de la population éligible. Parmi eux, 7 étaient âgés de moins de 65 ans et 392 ont finalement refusé le questionnaire au moment de l'inclusion.

Au total, cette cohorte a inclus 9 294 individus âgés de 65 ans ou plus, dont 3 650 hommes et 5 644 femmes. Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique du Centre Hospitalo-Universitaire de Bicêtre et un consentement a été signé par chaque participant.

3.1.2 Recueil des données

Les données pour chaque participant ont été recueillies à l'inclusion à l'aide d'un questionnaire standardisé pour les trois centres. Le questionnaire était administré au cours d'un entretien en face à face avec des infirmières ou des psychologues spécialisés. Les données collectées à l'inclusion concernaient les caractéristiques sociodémographiques, le mode de vie (consommation de tabac et d'alcool, habitudes alimentaires, ...), et la consommation de médicaments.

Les prises de médicament du mois précédent l'entretien ont été vérifiées à l'aide des ordonnances. Le nom de chaque médicament a été codé selon la classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique (ATC) [106].

Les informations sur les antécédents personnels et familiaux de maladies cardiovasculaires et de démences ont également été recueillies. Les données concernant les antécédents cardiovasculaires ont été validées par deux panels d'experts indépendants, l'un pour les maladies coronaires et l'autre pour les AVC. Elles ont été complétées si nécessaire auprès du médecin traitant ou à partir des compte-rendus hospitaliers.

A l'inclusion, tous les individus ont été soumis à un examen médical permettant les mesures anthropométriques suivantes : poids, taille, tour de taille et tour de hanche. Les pressions artérielles systoliques et diastoliques ont également été mesurées avec un tensiomètre électronique (OMRON M4). Les moyennes de deux mesures systoliques ou diastoliques ont été considérées.

Des prélèvements sanguins lors du recrutement ont pu être obtenus pour 90 % des sujets. Ils ont permis de constituer une DNA-thèque et une plasma-thèque ayant notamment servi aux dosages de plusieurs paramètres biologiques dont la glycémie à jeun, le cholestérol total, le HDL-cholestérol, le LDL-cholestérol, les triglycérides et les dosages hormonaux.

3.1.3 Suivi, validation des cas et définition des causes de mortalité

Initialement, la durée de suivi de la cohorte était fixée à 4 ans, mais à ce jour les sujets sont encore suivis dans le cadre d'investigations supplémentaires. Les visites de suivi ont été réalisées jusqu'à 12 ans à intervalle réguliers de 2 à 3 ans, à partir de la date d'inclusion. Elles consistaient en l'administration d'un nouveau questionnaire allégé par rapport au questionnaire initial et d'une ré-examination des participants.

Au cours des 12 ans de suivi, l'ensemble des cas de mortalité a été recueilli grâce aux données issues de la base nationale des causes de décès produites par le Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDC) et à partir des certificats de décès et/ou des dossiers médicaux recueillis au sein de l'étude. Un comité d'experts a examiné les dossiers pour déterminer les causes immédiates et secondaires de décès, selon la Classification Internationale des Maladies 10^{ème} édition (CIM 10) [107].

Les causes immédiates de décès étaient regroupées selon trois groupes : Les pathologies cardiovasculaires, les cancers (tous types) et les autres causes. La mortalité par maladies cardiovasculaires était définie par les codes CIM 10 suivants : I00 à I99, R09.2 et

K55.0, et incluait notamment les décès par cardiopathie ischémique, accident vasculaire cérébral (AVC) et insuffisance cardiaque. La mortalité par cancers était définie par les codes C00-C97, et incluait tous les types de cancers. Les causes indéterminées de décès et celles non cardiovasculaire ni cancer ont été regroupées dans un troisième groupe appelés « autres causes ». Ce groupe était notamment constitué par les décès liés aux maladies infectieuses, aux troubles digestives, aux traumatismes, et aux suicides.

3.2 La sous-cohorte

3.2.1 L'étude cas-cohorte

Dans le cadre de l'étude des 3C, un schéma d'étude cas-cohorte a été mis en place après 4 ans de suivi afin d'étudier le lien entre des variables biologiques spécifiques et l'incidence des maladies cardiovasculaires et de démence, tout en limitant le coût des dosages à réaliser. Il s'agit du tirage au sort d'un sous-échantillon représentatif de la cohorte initiale appelé sous-cohorte auquel est rajouté l'ensemble des cas incidents des événements d'intérêt non inclus dans le sous-échantillon. La mortalité n'ayant pas fait partie des événements inclus dans le schéma cas/cohorte, nous avons donc dû travailler ici uniquement sur la sous-cohorte, représentative de l'échantillon initial.

Parmi les 9 294 sujets 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 événements étudiés (événement coronaire, AVC et démence). La sous-cohorte aléatoire a été tirée selon une fraction de 1/7 des sujets de la cohorte restante (n = 8 414) après stratification sur l'âge (par tranches de 5 ans), le centre de recrutement et le sexe. La sous-cohorte comprenait 1 254 sujets dont 495 hommes.

3.2.2 Echantillon de l'étude

Le schéma cas-cohorte n'ayant pas été construit en tenant compte du statut vital des sujets, la sous-cohorte des hommes après 12 ans de suivi a été utilisée dans toutes les analyses. De cette sous-cohorte composée de 495 hommes, ont été exclus ceux ayant déclaré prendre des médicaments pouvant modifier les niveaux endogènes des hormones sexuelles (n = 10), ainsi que les hommes déclarants une maladie prostatique dont les modalités thérapeutiques comportaient des traitements antiandrogéniques (n = 12) [108]. Un sujet avait une donnée manquante pour le taux d'estradiol. La population d'analyse était donc constituée de 473 hommes pour les analyses portant sur la testostérone et de 472 hommes pour celles concernant l'estradiol (Figure 10).

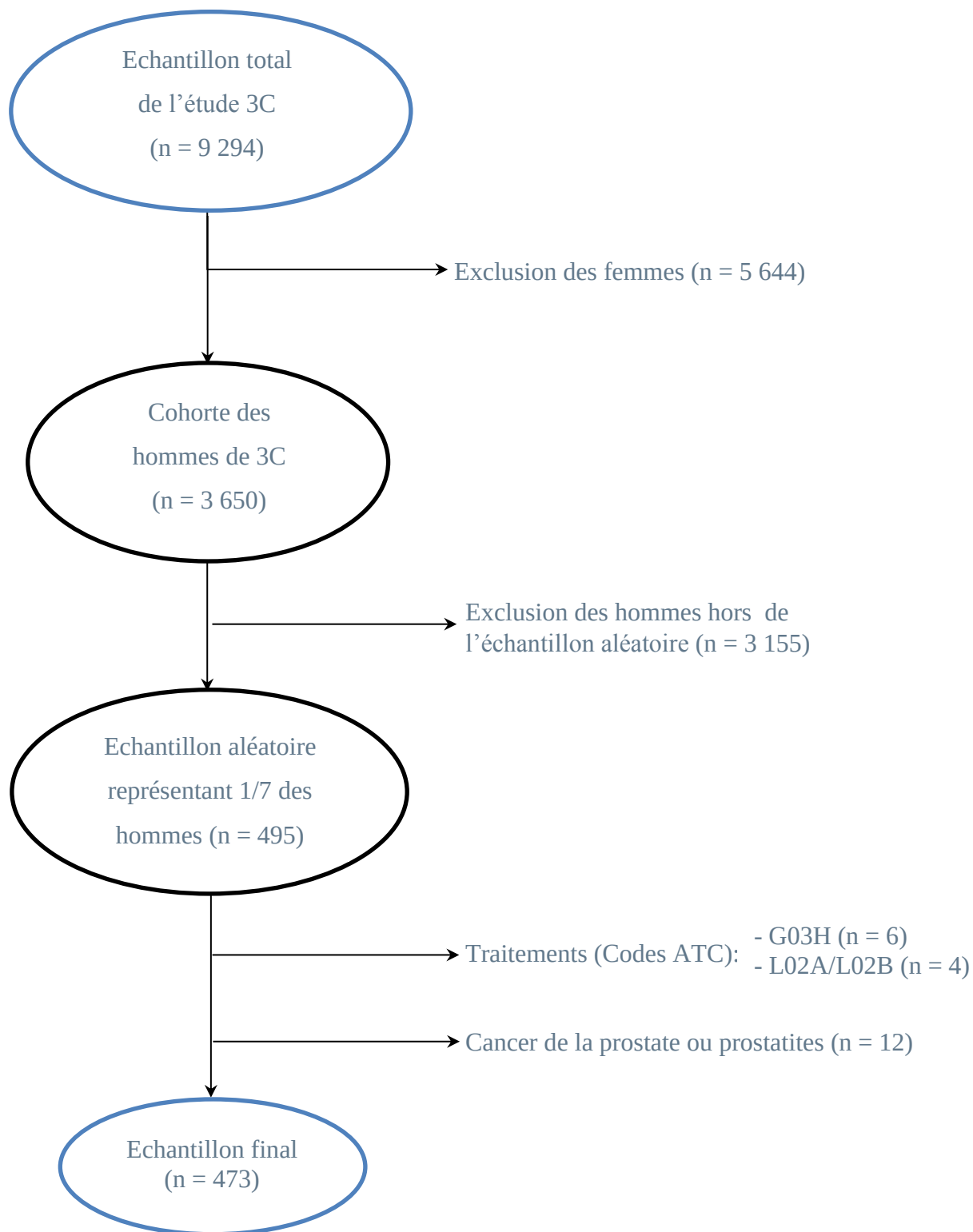


Figure 10 : Flow-chart de l'échantillon d'étude.

3.3 Mesure des paramètres biologiques et génétiques

A l'inclusion, un prélèvement sanguin a été réalisé chez plus de 90 % des sujets de toute la cohorte. Cette prise de sang a été réalisée le matin, au repos et 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.

3.3.1 Les hormones sexuelles endogènes

Pour le dosage de la testostérone et de l'estradiol, des échantillons de plasma prélevés dans des tubes contenant de l'EDTA (acide Ethylène Diamine Tétracétique) étaient disponibles pour tous les sujets de la sous-cohorte. Ils ont été obtenus par centrifugation (1 500 g à 4°C pendant 15 min) et immédiatement congelés à -80°C dans des tubes en plastique de 1mL.

3.3.1.1 Méthodes de dosage des hormones

Deux grandes familles de méthodes de dosage existent pour mesurer les taux plasmatiques d'hormones : les méthodes immunologiques et la spectrométrie de masse couplée ou non à la chromatographie gazeuse (abréviée GC-MS pour le terme anglais Gas Chromatography-Mass Spectrometry) ou à la chromatographie en phase liquide (abréviée LC-MS pour le terme anglais Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).

La GC-MS est considérée comme le gold standard pour le dosage des hormones sexuelles ; elle permet de séparer les stéroïdes liquides dans une colonne par une technique de vaporisation. Ces stéroïdes (maintenant gazeux) voyagent à travers la colonne chauffée et arrivent dans le spectromètre de masse à différents moments en raison de différentes interactions de la phase liquide dans la colonne. Puis, le spectromètre de masse détecte et détermine la structure des composants après ionisation. L'association de ces deux techniques permet d'obtenir une meilleure identification des molécules et d'augmenter la sensibilité et spécificité du dosage des hormones stéroïdiennes. La GC-MS a été développée pour le dosage des hormones stéroïdiennes dans les années 1960 par l'équipe de Sjöval [109].

Ces dernières années, la GC-MS a été largement remplacée par la LC-MS en raison de l'amélioration des systèmes HPLC (chromatographie liquide haute pression) et de la conception des colonnes. Elle permet la séparation du mélange d'analytes liquides en fractions d'analytes séparés. Ceci est réalisé en utilisant une colonne garnie d'une phase stationnaire qui retient les différents composants. Les stéroïdes sont retenus sur la phase stationnaire de la colonne à des degrés variés en fonction de leur polarité ; l'augmentation de la polarité de la phase mobile élue les stéroïdes séquentiellement. Cette méthode permet l'identification sans équivoque, permettant ainsi une quantification précise. Dans le cas de la GC-MS, ceci est réalisé en utilisant une colonne de chromatographie très longue, typiquement supérieure à 10 m, pour séparer les substances interférentes. Dans le cas de LC-MS, une colonne de chromatographie plus courte, de l'ordre de 20 cm, est utilisée, mais la spécificité est augmentée par l'utilisation de deux analyseurs de masse quadripolaire.

Néanmoins, ces méthodes sont très complexes et coûteuses ; elles nécessitent du temps rendant leur utilisation courante difficile, surtout dans le cadre d'études épidémiologiques avec plusieurs centaines de sujets. D'autres procédés pour mesurer les hormones stéroïdiennes ont alors été développés, notamment les techniques radio-immunologiques. Ces méthodes consistent à fixer par compétition un anticorps radioactif à l'antigène d'intérêt puis à détecter les complexes antigènes-anticorps. La première méthode décrite par Abraham en 1969 [110] appelée RIA (Radioimmunoassay) conventionnelle ou indirecte consiste en une extraction par un solvant organique, une purification par chromatographie suivie d'une méthode de quantification par RIA. Puis, une autre technique plus rapide appelée RIA directe s'est développée sans étape préalable d'extraction ou de purification par chromatographie. Cette dernière méthode a l'avantage d'être simple, rapide, automatisable, relativement peu coûteuse et requiert un faible volume de plasma (0,1 mL). Cependant, elle peut surestimer la mesure des hormones par manque de spécificité de l'anticorps utilisé. De plus, l'absence d'étape de purification pourrait conduire à une séparation insuffisante des hormones avec leur protéine de transport comme la SHBG, avec qui elles ont une forte affinité. Un manque de sensibilité a également été décrit pour mesurer les faibles taux d'estradiol [111].

Le choix technologique entre LC-MS, technique de référence, et les immunodosages pour les dosages de routine des stéroïdes fait débat dans la littérature [112, 113]. Un nombre croissant de chercheurs sont aujourd'hui convaincus que l'avenir du dosage des hormones stéroïdiennes réside dans les applications de la spectrométrie de masse. Cependant, dans les études qui comparent la performance des méthodes immunodosages versus spectrométries de masse, on

trouve souvent la conclusion que les deux méthodes sont tout aussi bonnes dans les diagnostics cliniques lorsqu'elles sont évaluées à la lumière de l'utilisation prévue. Les principaux avantages et inconvénients des méthodes indiquées précédemment sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des méthodes de dosage d'hormones.

Méthodes de dosage	Avantages	Inconvénients
RIA direct	Rapide et facile à mettre en œuvre Faible quantité de plasma (~50µL) Peu coûteuse Automatisation	Manque de spécificité Manque de reproductibilité Absence de standardisation
RIA indirect	Bonne reproductibilité Spécificité élevée	Mise en œuvre laborieuse Coût élevé Importante quantité de plasma
GC-MS ou LC-MS	«Méthode de référence» (gold standard) Spécificité élevée	Mise en œuvre laborieuse Coût élevé Importante quantité de plasma

RIA : dosage radio-immunologique (Radio-ImmunoAssay)

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

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

3.3.1.2 Dosage de la testostérone totale

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

La limite de détection de ces kits, c'est à dire la valeur minimale de testostérone pour laquelle le coefficient de variation est inférieur à 20 % 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).

Le dosage de la testostérone totale a été validé par comparaison au dosage par chromatographie gazeuse sur un échantillon de 44 hommes par la méthode de Bland et Altman [114]. Les deux méthodes de dosage étaient concordantes et extrêmement corrélées, ce qui plaidait pour une bonne validité du RIA utilisé ($r = 0,98$ et $p < 0,0001$). Les niveaux de testostérone mesurés par RIA étaient néanmoins sous-estimés de 7 % par rapport à la référence [115].

3.3.1.3 Dosage de la testostérone biodisponible

La testostérone 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 sont effectués dans le surnageant du plasma, après équilibrage et une mise en présence d'une dose de testostérone marquée au tritium [3H]-testostérone [116]. Les coefficients de variation intra et inter-essai étaient respectivement de 7,0 % et 8,5 % pour une concentration de 1,4 ng/mL.

3.3.1.4 Dosage de l'estradiol total

L'estradiol total a également été mesuré par dosage RIA direct à l'aide des mêmes kits que ceux utilisés pour le dosage de la testostérone (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 17,6 % et 18,1 % pour des concentrations de 3,2 pg/mL (12 pmol/L) et de 2,8 % et 5,8 % respectivement pour des concentrations de 24 pg/mL (88 pmol/L).

Le dosage de l'estradiol total par RIA chez les hommes et les femmes ménopausées est souvent critiqué car les taux sériques d'estradiol peuvent se retrouver inférieurs à la limite de

sensibilité de la RIA directe, mais dans notre échantillon toutes les valeurs étaient supérieures à cette limite de détection.

3.3.2 Autres paramètres biologiques

Les mesures de la glycémie, les différentes fractions du cholestérol (le cholestérol total, le LDL-cholestérol et le HDL-cholestérol), et les 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 [117]. La formule est applicable uniquement aux sujets dont la concentration de triglycérides est inférieure à 4,5 g/L (5,08 mmol/L). Dans le cas de notre échantillon, toutes les valeurs de LDL-cholestérol ont été estimées.

3.3.3 Génotypage des récepteurs aux estrogènes

L'ADN a été extrait à partir des noyaux de globules blancs (Puregene Kit, Qiagen, France), puis congelé à -80°C. Le génotypage des polymorphismes des récepteurs aux estrogènes a été effectué selon une méthode automatisée (KASPar) développée par la société Kbiosciences (Hoddesdon Herts, Royaume-Uni), utilisant une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) compétitive et allèle-spécifique. Ce procédé consiste en une dénaturation de l'ADN, puis une amplification de la région d'ADN contenant le polymorphisme nucléotidique (SNP « single nucleotide polymorphisms ») et enfin une hybridation des fragments d'ADN amplifiés à l'aide d'une sonde marquée par fluorescence. Les résultats ont été interprétés grâce au logiciel KlusterCaller 1.1. L'erreur de mesure du système KASPar était inférieure à 0,3 %.

Les deux principaux polymorphismes d'ESR1 ont été recherchés : rs2234693 et rs9340799, situés respectivement aux positions 397 et 351 de l'intron 1 du gène *ESR1*. Trois polymorphismes d'ESR2 ont également été recherchés : rs1256049, rs4986938 et rs1271572, situés respectivement aux positions 1082 de l'exon 5, 1730 de la région non traduite 3'UTR («Untranslated») de l'exon 8 et dans le promoteur du gène *ESR2*.

3.4 Covariables

3.4.1 Syndrome métabolique

Le statut syndrome métabolique (présence/absence) à l'inclusion a été défini selon les critères de l'*International Diabetes Federation* (IDF) qui requiert la présence d'une obésité centrale (définie par un tour de taille ≥ 94 cm ou un IMC (indice de masse corporelle) > 30 kg/m²) combinée à au moins deux des quatre caractéristiques suivantes : 1) Des niveaux de triglycérides élevés ($> 1,7$ mmol/L) ou un traitement, 2) des niveaux bas de HDL-cholestérol ($< 1,03$ mmol/L) ou un traitement, 3) une pression artérielle élevée (systolique ≥ 130 mm Hg ; diastolique ≥ 85 mm Hg) ou un traitement pour une hypertension précédemment diagnostiquée, 4) une glycémie élevée ($\geq 5,6$ mmol/L) ou un traitement pour un diabète de type 2 précédemment diagnostiqué [118].

Nous avons également considéré deux autres définitions du syndrome métabolique **i)** Critères du *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP: ATPIII) selon lequel le syndrome métabolique est défini par la présence de 3 des 5 caractéristiques suivantes : 1) obésité centrale (définie comme un tour de taille ≥ 102 cm), 2) des niveaux de triglycérides élevés: $\geq 1,69$ mmol/L, 3) un HDL-cholestérol bas: $< 1,03$ mmol/L, 4) une pression artérielle systolique (≥ 130 mm Hg) ou diastolique (≥ 85 mm Hg) élevée, 5) une glycémie à jeun élevée $\geq 6,11$ mmol/L, ou un diabète diagnostiqué [119]; **ii)** Critères du *European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGSIR) qui exige la présence de l'insulino-résistance (définie par des taux d'insuline $>$ au 75ème percentile des patients non diabétiques) plus deux des caractéristiques suivantes : 1) un tour de taille ≥ 94 cm, 2) des niveaux élevés de triglycérides: $\geq 2,0$ mmol/L et/ou un HDL-cholestérol bas: $< 1,01$ mmol/L, ou un traitement spécifique des anomalies lipidiques, 3) une pression artérielle élevée : pression systolique (≥ 140 mm Hg) ou diastolique (≥ 90 mm Hg) ou un traitement de l'hypertension déjà diagnostiquée, 4) une glycémie à jeun élevée $\geq 6,11$ mmol/L [120].

3.4.2 Autres covariables

Les caractéristiques sociodémographiques, comme l'âge, le sexe, le niveau d'éducation (aucune étude ou niveau certificat d'études primaires, niveau CAP/BEP/BEPC et niveau

baccalauréat ou études supérieures), et le statut marital (marié, divorcé ou séparé ou veuf, célibataire) ont été auto-rapportées à l'inclusion.

Concernant les autres données :

Le poids a été mesuré durant l'examen clinique

La taille a été mesurée durant l'examen clinique

L'IMC a été calculé selon la formule Poids (kg) / Taille² (m)

La consommation d'alcool a été mesurée à partir de questions sur le nombre de verres consommés par semaine et par jour. Il est également demandé si le participant avait toujours été non-buveurs, ex-buveurs, buveurs modérés (de un à vingt-et-un verres par semaines pour les hommes) ou gros buveurs (plus de vingt-et-un)

Le statut tabagique a été défini à partir de questions sur la consommation de tabac au cours de différentes périodes de la vie et sur les âges auxquels les participants avaient commencé et arrêté de fumer.

L'activité physique a été évaluée grâce à deux questions portant sur le temps passé par jour (moins d'une heure, une à deux heures, plus de deux heures) à faire une promenade ou à pratiquer une ou plusieurs activités physiques.

Le fonctionnement cognitif a été évalué grâce à différents tests dont un test de fonctionnement cognitif global, le *Mini Mental State Examination (MMSE)* ; des scores plus élevés correspondant à une meilleure fonction.

Le diabète était défini comme une glycémie à jeun supérieure à 7 mmol/L ou la prise d'antidiabétiques.

L'hypercholestérolémie était définie comme un cholestérol total supérieur à 6.2 mmol/L ou d'un traitement contre l'hypercholestérolémie.

L'hypertension était présente si la pression artérielle systolique était supérieure à 140 mm Hg ou la pression artérielle diastolique était supérieure à 90 mm Hg ou les sujets étaient traités par antihypertenseurs.

Les maladies cardiovasculaires étaient définies par la présence d'antécédents personnels de maladie coronaire et/ou d'AVC.

3.5 Analyses statistiques

L'échantillon de l'étude a tout d'abord été validé par comparaison des caractéristiques générales à l'inclusion à des sujets inclus à ceux du reste de la cohorte des hommes. Puis ces caractéristiques ainsi que les fréquences génotypiques des récepteurs aux estrogènes ont été décrites ; ensuite, les déterminants des hormones sexuelles et les facteurs de risques de mortalité ont été recherchés. Enfin la relation entre les hormones sexuelles et le risque de mortalité toutes causes et par causes après le suivi de 12 ans a été étudié.

Toutes les analyses sont réalisées avec des tests bilatéraux et, sauf dans le cas où il est précisé dans le texte, les valeurs de $p < 0,05$ ont été prises comme seuil de significativité statistique. Les analyses ont été réalisées au moyen des procédures courantes du logiciel SAS 9.4 (Statistical Analysis System 9.4 Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.5.1 Validation de la sous-cohorte

Les caractéristiques générales des hommes appartenant à la sous-cohorte ont été comparées à celles de la cohorte restante, afin de vérifier la bonne représentativité de l'échantillon. Les tests du Chi² et de Student ont été utilisés respectivement pour les variables catégorielles et continues, après normalisation si nécessaire. Les résultats sont présentés par la fréquence et le pourcentage pour les variables catégorielles et par la moyenne arithmétique et l'écart-type pour les variables continues présentant une distribution normale. Une transformation logarithmique a été nécessaire pour normaliser certaines variables continues, et pour celles-ci, la médiane et l'intervalle interquartile ont été présentés.

3.5.2 Utilisation de la pondération inverse

L'échantillon de notre étude est issu de la sous-cohorte qui est elle-même un échantillon aléatoire (donc théoriquement représentatif) des hommes de 3C. Néanmoins, afin de tenir compte de l'échantillonnage, tous les modèles statistiques ont été pondérés par l'inverse de la probabilité d'appartenir à la sous-cohorte (IPW : en anglais Inverse Probability Weight). Cette méthode de pondération consiste à pondérer la contribution de chaque individu de l'échantillon par un poids inversement proportionnel à la probabilité qu'a l'individu d'appartenir à la sous-cohorte conditionnellement aux covariables observées. Les individus

ayant un profil sous-représenté dans notre échantillon d'étude (la sous-cohorte) par rapport aux hommes de l'étude 3C non inclus dans la sous-cohorte vont se voir attribuer un poids élevé. Inversement, les individus ayant un profil surreprésenté vont se voir attribuer un poids faible. L'objectif de la méthode est de créer un pseudo-échantillon dans lequel la distribution des covariables observées est la même dans les deux groupes (sous-cohorte et non-sous-cohorte). Ainsi, une situation de quasi-randomisation est créée artificiellement. La différence majeure avec un essai randomisé contrôlé est que ce dernier assure, sous réserve d'une taille d'échantillon suffisante, l'équilibre de toutes les covariables alors que la méthode IPW ne garantit l'équilibre que pour les covariables observées. La pondération de la probabilité inverse a été développée pour les enquêtes de sondage dans les années 1950 [121]. Elle pondère la contribution de chaque individu par un poids w_i égal à l'inverse de la probabilité qu'a l'individu i d'appartenir à son groupe d'exposition sachant les covariables observées :

$$w_i = X_i/p_i + (1 - X_i)/(1 - p_i)$$

Ces poids présentent deux inconvénients. Le premier est que la somme des poids des individus est égale au double de la taille de l'échantillon initial. Xu et al. indiquent que cette augmentation de la taille de l'échantillon peut conduire à une sous-estimation de la variance et donc produire des intervalles de confiance trop restrictifs et une augmentation des rejets à tort des hypothèses nulles [122]. Le second inconvénient concerne la possible obtention de poids très importants pour quelques individus ayant un profil très rare, ces individus ont alors des contributions trop importantes dans l'estimation du modèle. Pour contrer ces écueils, des auteurs ont proposé des poids dits stabilisés ou normalisés (en anglais, stabilized weights) [122, 123]. L'utilisation des poids stabilisés permet d'obtenir un pseudo-échantillon de taille similaire à celle de l'échantillon initial, et une estimation correcte de la variance de l'effet étudié [122]. Nous avons donc utilisé des poids normalisés dans nos modèles.

La capacité de la procédure de pondération à éliminer le biais dû à l'échantillonnage dépend aussi de la richesse des données utilisées pour construire les poids. Les poids ont été estimés pour chaque participant en utilisant des données sur tous les hommes de la cohorte 3C ($n = 3\ 650$). La probabilité d'être dans la sous-cohorte a été estimée par régression logistique à partir des covariables suivantes : les caractéristiques sociodémographiques de base (âge, niveau de scolarité, taille, situation professionnelle, statut marital), les comportements de santé (tabagisme, consommation d'alcool, la consommation de fruits et de légumes), les facteurs de risque cardio-métaboliques (IMC, hypertension, diabète, cholestérol), les maladies chroniques

(coronaropathie, AVC), la fonction cognitive (évaluée à partir du score MMSE) et le statut vital à 12 ans.

3.5.3 Description des caractéristiques de l'échantillon d'étude

L'échantillon d'étude correspond à celui des hommes de la sous-cohorte après les exclusions concernant les traitements hormonaux, les maladies de la prostate et les valeurs manquantes.

3.5.3.1 Caractéristiques générales

Les données catégorielles ont été exprimées par leur effectif et leur pourcentage et les variables continues présentant une distribution normale selon leur moyenne arithmétique et leur écart type. Pour les variables nécessitant une normalisation par log-transformation, les résultats ont été donnés par les médianes accompagnées des interquartiles.

3.5.3.2 Polymorphismes génétiques

Pour chaque polymorphisme, l'équilibre de Hardy-Weinberg a été vérifié. Il s'agit d'un modèle génétique dérivant des lois de Mendel et stipulant la stabilité des fréquences génotypiques au fil des générations dans une très grande population, sans migration, ni mutation, ni sélection naturelle et où les unions entre les sujets se font au hasard. Connaissant les fréquences alléliques des polymorphismes, on s'attend à observer certaines fréquences génotypiques dans la population. Pour tester cette hypothèse, les fréquences génotypiques observées dans l'échantillon d'étude ont été comparées aux fréquences théoriques par des tests du Chi². Pour chaque polymorphisme des récepteurs aux estrogènes, un tableau présente ainsi les fréquences alléliques et génotypiques observées, associées aux résultats du test de l'équilibre de Hardy Weinberg.

3.5.3.3 Hormones sexuelles

a) Distribution des hormones sexuelles

La distribution des hormones sexuelles des sujets de l'échantillon d'étude a été présentée sous forme d'un histogramme afin de détecter les valeurs aberrantes mais aussi de vérifier l'allure de la distribution. Le test de Shapiro-Wilk dont l'hypothèse nulle teste une distribution normale a été mis en œuvre pour vérifier la normalité de la distribution des hormones. Dans notre cas, toutes les hormones présentaient une distribution normale.

b) Corrélation et déterminants des hormones sexuelles

La relation entre les différentes hormones sexuelles a été évaluée par le coefficient de corrélation de Pearson.

Il a également été recherché les caractéristiques des sujets associées aux concentrations hormonales. Pour cela, les moyennes ou fréquences des caractéristiques à l'inclusion ont été représentées selon la distribution de testostérone et d'estradiol et un test de tendance a été réalisé pour observer l'évolution des caractéristiques en fonction des distributions d'hormones.

Par ailleurs, les déterminants des hormones ont été recherchés par la mise en œuvre de modèles de régression linéaire permettant d'évaluer les associations entre les hormones et les caractéristiques des sujets. Chacune des caractéristiques a été étudiée de façon uni-variée et incluse dans le modèle multivarié si l'association brute était significative à moins de 10 % ($p \leq 0,10$). Pour permettre une comparabilité de nos résultats, nous avons présenté les coefficients de régression standardisés, correspondant à la variation de la variable d'intérêt pour un écart-type de la variable explicative, et ajustés sur toutes les autres variables. Le pourcentage de variance des hormones expliquée par chacun des déterminants indépendants ainsi que le pourcentage total de variance expliquée par le modèle ont également été évalués.

3.5.4 Facteurs de risque de mortalité

Les facteurs de risque de mortalité ont été recherchés en comparant les caractéristiques à l'inclusion des sujets en fonction de leur statut vital après 12 ans de suivi. Pour les variables catégorielles, les comparaisons ont été réalisées grâce à des tests du Chi² ou des tests exacts de Fisher (pour les petits effectifs). Des tests de Student de comparaisons de moyennes ont été mis en œuvre pour les variables continues présentant de bonne condition de normalité et sur les variables log-transformées si nécessaire. Ces comparaisons ont également été ajustées sur l'âge à l'aide du test de Cochran-Mantel-Haenszel pour les variables catégorielles et de l'analyse de variance pour les variables continues. Des valeurs de $p \leq 0,10$ ont été prises comme seuil de significativité statistique.

La distribution des polymorphismes des récepteurs aux estrogènes ont été également comparés chez les hommes de l'échantillon en fonction du statut vital après 12 ans de suivi par des tests du Chi².

3.5.5 Hormones et risque de mortalité toutes causes et par causes spécifiques

Nous avons mis en œuvre des méthodes utilisées pour l'analyse des données de survie. Ces méthodes permettent d'étudier le délai de survenue d'un événement particulier pour un ou plusieurs groupes d'individus. La variable aléatoire étudiée est le délai de survenue de l'événement d'intérêt à partir d'une date d'origine. Dans notre analyse, nous avons utilisé le modèle à risques proportionnels semi-paramétrique de Cox. Il permet d'exprimer le risque instantané associé à la survenue de l'évènement à l'instant t en prenant en compte simultanément l'effet de plusieurs covariables. Pour la mortalité toutes causes, les participants ont été suivis jusqu'au décès toutes causes confondues ou la date de censure (date des dernières nouvelles en vie) ; pour la mortalité par causes spécifiques, les participants ont été suivis jusqu'au décès suite à la cause spécifiquement étudiée ou la date de censure (mort d'une autre cause que celle étudiée ou date des dernières nouvelles en vie).

Des interactions multiplicatives ont également été testées dans nos modèles :

- entre les caractéristiques cliniques (définies par le syndrome métabolique et ses composants) et la testostérone sur la mortalité toutes causes.
- entre les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes et l'estradiol sur la mortalité toutes causes.

Nous n'avons pas testé ces interactions sur les causes spécifiques de mortalité car le nombre d'événement était trop faible.

3.5.5.1 Analyse de survie

Proposé par Cox (1972), le modèle semi-paramétrique à risques proportionnels permet d'établir une relation entre les facteurs de risque de la survenue de l'événement et la distribution des durées de survie, sans définir une forme paramétrique particulière à cette dernière. C'est le modèle le plus utilisé en analyse de cohortes pour étudier l'effet de variables explicatives sur le risque de survenue d'un événement.

Soit $Z_i = (Z_{1i}, \dots, Z_{pi})$ le vecteur des p covariables potentielles facteurs de confusion caractérisant l'individu i et $\beta = (\beta_1, \dots, \beta_p)$ le vecteur des coefficients de régression associés.

Le modèle de Cox s'écrit : $\lambda(t|x,z) = \lambda_0(t) \exp^{(\alpha x + \beta'z)}$

où α est le coefficient de régression associé à l'exposition et $\lambda_0(t)$ est la fonction de risque (instantané) de base. La particularité du modèle semi-paramétrique est qu'il ne nécessite pas l'estimation de la fonction de risque de base. En effet, la vraisemblance partielle, notée VP, correspond au produit des probabilités conditionnelles calculées à chaque temps d'événement et sa maximisation permet d'estimer les coefficients de régression. Plus précisément, en considérant qu'il n'y a qu'un seul événement en chaque temps t_j , elle s'écrit :

$$\log VP = \sum_{i=1}^n \delta_i \{ \alpha x_i + \beta'z_i - \log(\sum_{l:t_l \geq t_i} \exp(\alpha x_l + \beta'z_l)) \}$$

où l indique les individus encore à risque au temps t_j .

La fonction exponentielle a été choisie pour obtenir une fonction de risque positive sans contrainte sur les valeurs des coefficients. L'exponentiation de ces coefficients donne le Hazard Ratio (HR) qui est le rapport des incidences de l'évènement étudié dans les deux groupes. Étant donné que la fonction de risque a une correspondance biunivoque avec l'incidence cumulée, le HR reflète également le risque (incidence cumulée) de la population étudiée. Cependant, cette relation n'existe pas en présence de risques concurrents.

Un événement est dit compétitif ou concurrent lorsqu'il empêche d'observer la survenue de l'évènement d'intérêt. Dans notre étude par exemple, en étudiant le lien entre les hormones et les causes spécifiques de mortalité ; la mortalité par cancer peut être l'évènement d'intérêt, mais la mortalité cardiovasculaire peut prévenir son apparition. Dans les situations où des risques concurrents sont présents, deux modèles de risque différents sont disponibles : la fonction de risque cause spécifique et la fonction de risque de sous-distribution. Les deux modèles tiennent compte des risques concurrents, mais ils le font différemment. Le premier considère les événements concurrents comme une censure non informative, tandis que le second prend en compte la nature informative de la censure des événements concurrents [124]. Lau et al suggèrent que les modèles de risque causes spécifiques sont plus appropriés aux études épidémiologiques (biens souvent une visées étiologique), tandis que les modèles de risque de sous-distribution sont plus adaptés aux études cliniques qui bien souvent s'intéressent à la prédiction du risque individuel [125]. Nous avons donc choisi d'utiliser le modèle « causes spécifiques » dans l'estimation des risques liés à la mortalité d'origine cardiovasculaire, par cancers et autres. Ce modèle, contrairement au modèle de sous-distribution, est estimé à partir du modèle de Cox décrit plus haut.

c) Echelle de temps du modèle de Cox : Age

Habituellement, l'échelle de temps utilisée dans le modèle de Cox est le délai de suivi des sujets, correspondant à la période entre l'inclusion et la date de l'évènement ou de censure. Cependant, dans les études épidémiologiques où l'évènement d'intérêt est fortement lié à l'âge, il est fortement recommandé d'utiliser l'âge comme échelle de temps au lieu du délai de suivi [126-128]. Cette procédure permet de s'affranchir de la nature du lien entre l'âge et la survenue d'un évènement. Ainsi, on suppose que les sujets sont suivis depuis leur naissance et chaque cas est comparé à un individu à risque du même âge. L'utilisation de cette méthode implique une entrée retardée avec une troncature à gauche survenant à l'âge de l'inclusion (en

l'absence de données avant la date du recrutement). Elle n'est applicable que si l'âge de survenue de l'événement est indépendant de l'âge à l'inclusion, c'est-à-dire si le risque de la maladie d'intérêt d'un sujet n'est pas modifié par son entrée dans la cohorte. L'expression de ce modèle est similaire au modèle de Cox habituel, avec une censure à droite qui est commune aux deux types d'échelles de temps. De plus, ce type de modèle nous permet d'interpréter directement la fonction de risque comme une fonction d'incidence âge spécifique. La mortalité étant connue pour être fortement associé à l'âge, nous avons donc utilisé l'âge comme échelle de temps. Il faut noter qu'avec l'âge comme échelle de temps, un ajustement sur l'âge est intrinsèquement pris en compte dans le modèle le moins ajusté et qu'aucun modèle n'est donc totalement brut.

d) Condition de validité du modèle de Cox

Le modèle de Cox est basé sur deux hypothèses : la proportionnalité des risques et la log-linéarité.

La validité de l'effet estimé repose sur l'hypothèse que les fonctions de risque pour les différentes modalités de X sont proportionnelles et leur rapport est constant au cours du temps, $HR = \exp(\alpha)$. Pour vérifier cette hypothèse, de nombreuses méthodes graphiques et analytiques existent, chacune avec ses avantages et inconvénients. Parmi les méthodes graphiques, on peut par exemple tracer pour chaque groupe les courbes $\log[-\log(\hat{S}(t))]$ en fonction du temps et vérifier que les courbes présentent un écart constant au cours du temps t . Les méthodes graphiques permettent une première approche visuelle mais ont pour défauts leur subjectivité car dépendantes de l'interprétation qu'en fait l'analyste et le fait que l'on peut difficilement prendre en compte les autres variables d'ajustement. La méthode graphique peut donc être complétée par une approche analytique, telle que l'analyse des résidus de Schoenfeld [129]. Nous avons choisi ces deux méthodes pour vérifier la proportionnalité des risques de chaque variable inclus dans les modèles. Aucune violation majeure n'a été observée dans les modèles.

Dans le modèle de Cox (comme dans un modèle logistique), la relation entre les variables explicatives et la fonction de risque est log-linéaire. Cela signifie que pour une variable explicative continue introduite dans le modèle, une augmentation d'une unité de cette variable

est associée à un HR égal à $\exp(\beta)$, quel que soit sa valeur initiale. Pour vérifier cette hypothèse une solution consiste à transformer la variable quantitative en variable catégorielle à plusieurs classes (déterminées habituellement selon les quantiles) puis à représenter graphiquement les logit du modèle incluant la variable transformée en fonction des niveaux de la variable. L'hypothèse de log-linéarité sera acceptable si la relation entre ces points est linéaire. Pour chaque variable continue, nous avons vérifié cette hypothèse par comparaison d'un modèle contenant la variable en continue avec un modèle contenant la variable catégorielle ordonnée. Ces tests se sont révélés non significatifs et les variables concernées ont donc pu être incluses en continue dans le modèle.

3.5.5.2 Prise en compte des variables d'exposition

Les hormones ont été incluses dans les modèles soit comme des variables continues soit comme des variables en classes (tertiles). Nous avons testé l'écart à la linéarité pour chacune des variables. Si le test était significatif, nous nous sommes intéressés à des modèles multivariés quadratiques. Nous avons testé les associations en forme de U entre les hormones sexuelles et le risque de mortalité toutes causes et par causes spécifiques. Ces tests étaient réalisés avec les variables d'intérêts en classe par la méthode des contrastes. Si une relation quadratique était détectée, les risques étaient présentés généralement par les tertiles de la distribution des hormones avec le deuxième tertile en référence. Nous avons testé s'il existait une différence significative entre les HR des tertiles inférieurs et supérieurs de la distribution des hormones et les risques par cause de décès. Nous avons également transformé la variable d'intérêt en une variable Spline pour représenter graphiquement les associations non linéaires entre les niveaux d'hormones sexuelles et la mortalité. Si le test d'écart à la linéarité était non significatif, nous avons vérifié s'il y'avait une tendance linéaire significative entre les niveaux d'hormones et le risque de mortalité en utilisant la médiane des tertiles d'hormone comme variable ordonnée dans les modèles.

Le syndrome métabolique (et ses composants) ainsi que les polymorphismes des récepteurs aux estrogènes ont été inclus dans les modèles pour tester des potentielles interactions selon des modèles multiplicatifs avec respectivement la testostérone et l'estradiol sur le risque de mortalité toutes causes. Les risques de mortalité toutes causes associés aux deux hormones étaient estimés globalement et dans chacune des strates du facteur d'interaction.

Pour estimer l'impact de chaque composant du syndrome métabolique comme potentiels modificateurs de l'association entre la testostérone et la mortalité toutes causes, nous avons effectué des analyses séparées chez les hommes avec syndrome métabolique en définissant des sous-groupes d'hommes avec chaque composant. Nous avons ensuite comparé les HR associés à une diminution d'un écart-type des taux de testostérone chez les hommes avec chaque composant aux HR chez les hommes sans syndrome métabolique. Avec cette approche, pour chaque composant, les hommes avec syndrome métabolique et sans ce composant spécifique ont été exclus de l'analyse. L'obésité centrale, qui représente un critère obligatoire pour notre définition du syndrome métabolique, n'a donc pas été étudiée seule en tant que composant.

Ces tests d'interactions n'ont pas été réalisés sur la mortalité par causes spécifiques car le nombre d'événements était trop faible.

3.5.5.3 Variables d'ajustement

Trois ensembles de variables d'ajustement sont pris en compte dans les modèles : i) toutes les caractéristiques à l'inclusion associées à 10 % (p de significativité $\leq 0,10$) à la fois à la variation de l'hormone étudiée et à la mortalité (facteurs de confusion), ii) toutes les caractéristiques à l'inclusion associées à 10 % à la variation de l'hormone étudiée (déterminants des hormones), iii) toutes les caractéristiques à l'inclusion associées à 10 % à la mortalité (facteurs de risque de mortalité) après ajustement sur l'âge. Nous avons également inclus dans les modèles complets la consommation de tabac (en trois classes : Jamais, ancien et actuel) qui ne ressortait pas associé à 10 % aux concentrations d'hormones ni à la mortalité mais qui, en tant que facteur reconnu de risque de mortalité, devait être pris en compte dans des analyses portant sur cet événement.

Les variables d'ajustement dans les analyses sur le lien entre la testostérone et la mortalité toutes causes étaient, dans chacune des strates de syndrome métabolique : l'âge (pris en compte de façon intrinsèque dans les modèles statistiques comme expliqué précédemment), le centre (en 3 classes : Montpellier, Bordeaux, Dijon), les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC (en deux classes : oui/non), la consommation d'alcool et de tabac (en trois classes : Jamais, ancien et actuel) et l'activité physique (en 2 classes : basse/haute). Pour les analyses par causes spécifiques, les modèles ont été ajustés en plus sur

l'hypercholestérolémie, le diabète, l'hypertension artérielle (en deux classes : oui/non) et l'IMC (en continu).

Les variables d'ajustement dans les analyses sur le lien entre l'estradiol et la mortalité toutes causes étaient : l'âge (pris en compte de façon intrinsèque dans les modèles statistiques comme expliqué précédemment), le centre (en 3 classes : Montpellier, Bordeaux, Dijon), les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, le diabète, l'hypertension artérielle (en deux classes : oui/non), et la consommation d'alcool et de tabac (en trois classes : Jamais, ancien et actuel).

Pour ces variables, nous avons créé une classe supplémentaire qui correspond aux données manquantes afin de garder le même nombre de sujet dans les différentes analyses. Cette démarche n'a concerné que trois variables (antécédents personnel d'AVC, IMC et diabète) qui ne présentaient pas plus de 2% de données manquantes. Deux modèles étaient présentés à chaque fois, le premier ajusté sur l'âge (échelle de temps) et le centre, le second sur l'ensemble des les facteurs d'ajustement cités plus haut.

3.5.5.4 Modèle de médiation permettant une interaction

En plus de notre analyse principale décrite ci-dessus et afin de mieux comprendre la relation complexe entre la testostérone, le syndrome métabolique, et la mortalité toutes causes, nous avons utilisé des modèles contrefactuels de médiation permettant une interaction. L'analyse de médiation est une méthode statistique d'analyse causale initialement développée en psychologie et en sciences sociales. Son objectif est d'analyser l'association entre une variable d'exposition et une variable d'intérêt et de mieux comprendre comment cette association pourrait être liée à une variable intermédiaire, aussi appelée variable de médiation. Ainsi, l'analyse de médiation permet de distinguer, dans l'effet à expliquer, ce qui est directement imputable à la variable d'exposition (effet direct) et ce qui relève plutôt de l'intervention d'un facteur intermédiaire (effet indirect) via la variable de médiation. Ce type d'analyse aide à comprendre et expliquer les mécanismes biologiques et sociaux. L'article fondateur de Baron et Kenny en 1986 [130] qui a proposé une démarche traditionnellement utilisée pour étudier la médiation de manière empirique présente des limites importantes quant à leur applicabilité dans les modèles avec interactions ou non-linéaires [131, 132]. Nous avons retenu la méthode de Vanderweele et al. car elle s'adaptait le mieux aux données de survie et permettait de tenir

compte d'une interaction entre le médiateur et l'exposition sur la variable à expliquer [133, 134].

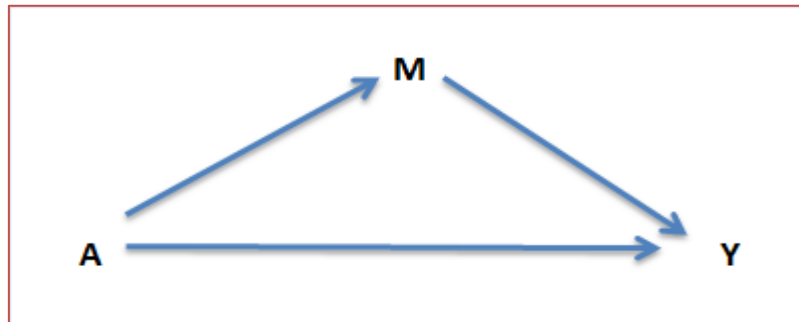


Figure 11 : Modèle de médiation d'après Baron et Kenny [130].

Pour l'analyse de médiation, nous définissons les variables suivantes :

A : Exposition correspond ici au niveau de la testostérone, codée en 2 classes (niveau élevé et bas).

M : Médiateur correspond ici au syndrome métabolique, codé en 2 classes (oui/non).

Y : Variable d'intérêt correspond ici au statut vital, codée en 2 classes (Décédé : oui/non).

La méthodologie des analyses de médiation nécessite préalablement **des hypothèses conceptuelles** qualitatives fondées avec une structure ayant une certaine plausibilité théorique auxquelles s'ajoutent des **hypothèses statistiques**. Elle nécessite de prendre en considération [134] :

- (a) les facteurs de confusion dans l'association entre A et Y
- (b) les facteurs de confusion dans l'association entre M et Y
- (c) les facteurs de confusion dans l'association entre A et M
- (d) les facteurs de confusion dans l'association entre M et Y, ceux-ci ne devant pas être affectés par A.

Dans le cas où A, Y et M sont binaires et que l'événement d'intérêt est fréquent à la fin du suivi de la cohorte, le modèle de vie accélérée est requis à la place du Cox habituellement utilisé dans les analyses de survie. Plusieurs auteurs ont démontré que dans les analyses de médiation, l'échelle de l'estimation des effets dépend de la fréquence de l'événement, et que le modèle de Cox requiert que l'événement soit rare pour être valide dans l'estimation des

effets directs et indirects [135]. L'événement n'étant pas rare dans notre étude (près de 40%), et nous avons donc déduit les effets directs et indirects de A sur Y à partir de 2 autres modèles statistiques:

Un modèle de vie accélérée qui tient compte des facteurs de confusion dans l'association entre l'exposition, le médiateur et l'événement d'intérêt.

$$\text{LOG}(T) = \theta_0 + \theta_1 A + \theta_2 M + \theta_3 A \times M + \theta'_4 C + v\epsilon$$

Où ϵ suit une loi dite de valeurs extrêmes et v est le paramètre de l'allure de la distribution, elle prend la valeur $v = 1$ si la distribution exponentielle est supposée et est autorisée à prendre des valeurs différentes si la distribution de Weibull est supposée ; C représente un ensemble de variables de confusion. Notons que ce modèle prend en compte une éventuelle interaction entre A et M. Dans le cas où il n'y pas d'interaction alors $\theta_3 = 0$.

Un modèle de régression logistique qui tient compte des facteurs de confusion dans l'association entre la variable de médiation et l'exposition.

$$\text{LOGIT } P(M=1) = \beta_0 + \beta_1 A + \beta'_2 C$$

De ces deux équations et sous les hypothèses (a) à (d) citées plus haut, on définit alors sur l'échelle du ratio de survie moyen les effets suivants:

Effet Direct Contrôlé (EDC) : qui correspond à l'amplitude moyenne de variation de l'événement si M était contrôlé et maintenu uniforme dans toute la population, mais A variait d'un niveau $a^* = 0$ à un niveau $a=1$.

$$\text{EDC} = \exp((\theta_1 + \theta_{3m})(a - a^*))$$

a : Niveau d'exposition,

a^* : Niveau d'exposition de base,

Effet Direct Naturel (EDN) : qui correspond à l'association entre A et Y si M avait sa valeur « naturelle ». Sous $A=0$, il correspond donc à l'effet directement imputable à l'exposition sur l'événement d'intérêt.

$$\text{EDN} = \frac{\exp(\theta_1 a) \{1 + \exp(\theta_2 + \theta_3 a + \beta_0 + \beta_1 a^* + \beta'_2 c)\}}{\exp(\theta_1 a^*) \{1 + \exp(\theta_2 + \theta_3 a^* + \beta_0 + \beta_1 a^* + \beta'_2 c)\}}$$

Effet Indirect Naturel (EIN) : qui correspond à l'amplitude moyenne de variation de l'événement si A était contrôlé à un niveau $a=1$, mais la valeur de M passait de celle qu'elle présente quand $a^*=0$ à celle qu'elle présente quand $a=1$.

$$EIN = \frac{\{1+\exp(\beta_0+\beta_1 a^*+\beta'_2 c)\}\{1+\exp(\theta_2+\theta_3 a+\beta_0+\beta_1 a+\beta'_2 c)\}}{\{1+\exp(\beta_0+\beta_1 a+\beta'_2 c)\}\{1+\exp(\theta_2+\theta_3 a+\beta_0+\beta_1 a^*+\beta'_2 c)\}}$$

Effet Total (ETot) : peut être défini comme la variation globale de l'association pour une variation de A du niveau $a^*=0$ à un niveau $a=1$. Il correspond au produit des effets naturels directs et indirects.

$$ETot = EDN * EIN$$

Dans notre cas particulier, les analyses étaient ajustées sur les facteurs de confusion retrouvés dans notre étude. Les effets estimés dépendaient des valeurs des variables de confusion. Ils étaient estimés en considérant la valeur moyenne de chaque variable de confusion.

Nous avons considéré la testostérone comme variable d'exposition binaire (deux groupes définis par un seuil de 11 nmol/L cliniquement pertinent) pour faciliter la définition des valeurs a^* et a dans les modèles. Les estimations étaient des ratios moyens de survie et étaient calculées pour une modification du niveau de testostérone $a^*=17,89$ nmol/L (niveau «élevé») à $a=9,15$ nmol/L (niveau «bas»). Ces valeurs étaient les médianes du niveau de testostérone dans les deux groupes. Les ratios de survie moyens inférieurs à 1 indiquaient que la baisse du niveau de testostérone était associée à une plus mauvaise survie.

Les intervalles de confiance étaient calculés en utilisant la méthode du Bootstrap (2000 échantillons).

Une macro pour le logiciel SAS permettant de calculer les différents HR et leur intervalle de confiance a été développée et est détaillée par Valeri et VanderWeele [134].

Nous avons également calculé une autre mesure populaire en analyse de médiation. La proportion de médiation qui correspond au pourcentage de la part de l'association entre A et Y qui revient au facteur M.

$$proportion\ de\ médiation = \frac{EIN}{ETot}$$

Il est à noter que cette mesure peut s'avérer instable surtout quand l'association entre A et Y est faible [134].

3.5.5.5 Modèle cas-seuls d'interaction gène-environnement

Nous avons également utilisé un modèle de cas-seuls (traduction littérale de l'anglais case-only) pour évaluer l'interaction entre les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes et l'estradiol sur la mortalité toutes causes.

La méthode d'identification des facteurs de risque à l'aide d'une série de cas a été développée par Prentice et al. [136]. Le concept de cas-seuls pour évaluer l'interaction gène-environnement ($G \times E$) est dérivé d'une étude cas-témoins traditionnelle, dans laquelle les témoins sont prélevés sur les non-malades à la fin de la période d'étude. Les malades non exposés au facteur environnemental sont considérés comme des pseudo-témoins et ceux exposés au facteur environnemental comme des pseudo-malades. Les distributions génotypiques (ou alléliques) des deux groupes sont ensuite comparées. Sous l'hypothèse que le gène (G) et l'exposition environnementale (E) sont indépendants parmi les témoins, l'analyse de cas-seuls donne une estimation de l'interaction qui est basée sur les odds ratio de l'incidence cumulée [137]. Le modèle logistique consiste à considérer que l'exposition est la variable dépendante et le génotype la variable explicative. En supposant une maladie rare et l'absence de corrélation gène-environnement chez les témoins, le coefficient de régression associé à la variable G correspond à l'estimateur de l'interaction $G \times E$. Si l'odds ratio obtenu est significativement supérieur à 1, on conclut à l'existence d'une interaction $G \times E$. Les auteurs ont noté que cette estimation est une alternative plus puissante pour tester l'interaction $G \times E$ en n'utilisant que l'échantillon des cas [138]. L'estimateur cas-seuls gagne en efficacité par rapport à son homologue cas-témoins en réduisant la variance associée à l'estimation du rapport de cotes entre G et E parmi les témoins. Le modèle logistique et le χ^2 correspondant s'écrivent :

$$\text{logit } P(E = 1 | G) = \beta_0 + \beta_1 G$$

Un test du rapport de vraisemblances qui suit, sous l'hypothèse nulle ($\beta = 0$), un χ^2 à 1 ddl permet de tester l'interaction $G \times E$:

$$T = -2 \ln [L(\beta_0 ; \beta_1 = 0) / L(\beta_0 ; \beta_1)]$$

Nous avons examiné les associations entre les polymorphismes des récepteurs aux estrogènes et les tertiles d'estradiol chez les cas (les hommes qui sont décédés au cours du suivi de 12 ans) et les témoins (ceux qui sont restés en vie) en utilisant le test du χ^2 .

3.5.6 Analyses de sensibilité

3.5.6.1 Testostérone et mortalité toutes causes

Nous avons effectué plusieurs analyses de sensibilité. Tout d'abord, nous avons exclu les hommes qui sont décédés au cours des quatre premières années du suivi afin d'examiner si une causalité inverse pouvait expliquer en partie nos résultats. Par ailleurs, nous avons effectué d'autres ajustements pour considérer l'association des niveaux de testostérone avec les différents composants du syndrome métabolique (obésité centrale, hypertension, hypercholestérolémie et diabète). Enfin, nous avons mené des analyses similaires en utilisant les deux autres définitions du syndrome métabolique décrites précédemment.

3.5.6.2 Estradiol et mortalité toutes causes

Des analyses de sensibilité ont été réalisées après exclusion des hommes décédés au cours des quatre premières années pour la même raison que celle décrite précédemment.

Aucune analyse de sensibilité n'a été menée dans les analyses par causes spécifiques en raison du trop faible nombre de sujets présents dans chaque groupe. De même, nous n'avons pas fait d'analyses stratifiées sur l'âge médian à l'inclusion car la plupart des décès avait lieu dans le groupe de hommes les plus âgés à l'inclusion.

4. Résultats

4.1 Validation de l'échantillonnage de la sous-cohorte

La cohorte entière est constituée d'un échantillon de 3 650 hommes dont 495 appartiennent à la sous-cohorte. Le tableau 2 représente les caractéristiques générales à l'inclusion des hommes dans la cohorte 3C et une comparaison de ces caractéristiques en fonction de l'appartenance à la sous-cohorte. Compte tenu du caractère aléatoire du tirage de la sous-cohorte, la très grande majorité de ces caractéristiques ne différait pas entre les hommes inclus dans la sous-cohorte et les autres, assurant ainsi une bonne représentativité de ce sous-échantillon.

Globalement, les hommes étaient en moyenne âgés de 74,2 (5,6) ans et légèrement en surpoids avec un IMC moyen de 26,2 (3,4) kg/m². Ils étaient largement hypertendus (83,3 %) mais peu diabétiques (14,0 %). Une minorité avait des antécédents personnels de maladies cardiovasculaires (17,0 % et 5,9 % pour les maladies coronaires et les AVC, respectivement). La très grande majorité était non-fumeurs (91,9 %) et non buveurs (97,2 %).

Seule la prévalence des antécédents personnels de maladie coronaire et le niveau des triglycérides étaient moins élevés chez les hommes de la sous-cohorte que chez les autres, ce qui pourrait être dû à une fluctuation d'échantillonnage.

Tableau 2 : Caractéristiques générales à l'inclusion des hommes de la cohorte 3C et comparaison de ces caractéristiques en fonction de l'appartenance à la sous-cohorte.

Caractéristiques	Cohorte 3C (n = 3650)	Sous-cohorte (n = 495)	Cohorte restante (n = 3155)	p
Sociodémographique				
Age (années)	74.2 (5.6)	73.9 (5.4)	74.2 (5.6)	0.38
Centre				0.74
Bordeaux	816 (22.4)	107 (21.6)	709 (22.5)	
Dijon	1888 (51.7)	253 (51.1)	1635 (51.8)	
Montpellier	946 (25.9)	135 (27.3)	811 (25.7)	
Niveau d'éducation ^a				0.39
Pas d'étude ou primaire	1066 (29.2)	135 (27.3)	931 (29.5)	
Secondaire	958 (26.3)	141 (28.5)	817 (26.0)	
Bac ou université	1622 (44.5)	218 (44.2)	1404 (44.5)	
Mesure anthropométrique				
IMC ^b (kg/m ²)	26.2 (3.4)	26.1 (3.2)	26.2 (3.4)	0.69
Tour de taille ^c (cm)	96.1 (10.2)	96.0 (9.8)	96.1 (10.2)	0.77
Comportements de santé				
Statut tabagique ^d				0.73
Jamais	1110 (30.4)	149 (30.1)	961 (30.5)	
Ancien	2243 (61.5)	310 (62.6)	1933 (61.3)	
Actuel	295 (8.1)	36 (7.3)	259 (8.2)	
Consommation d'alcool ^a				0.05
Jamais	3334 (91.5)	464 (93.7)	2870 (91.1)	
Ancien	212 (5.8)	17 (3.5)	195 (6.2)	
Actuel	100 (2.7)	14 (2.8)	86 (2.7)	
Activité physique ^e				0.50
Rarement/Jamais	1642 (62.2)	226 (63.8)	1416 (62.0)	
Occasionnellement/Régulièrement	997 (37.8)	128 (36.2)	869 (38.0)	
Antécédents personnels				
Hypertension	3041 (83.3)	398 (80.4)	2643 (83.8)	0.06
Hypercholestérolémie ^f	1640 (46.7)	215 (43.4)	1425 (47.2)	0.12
Diabète ^g	486 (14.0)	59 (11.9)	427 (14.4)	0.15
Maladie coronaire ^d	619 (17.0)	64 (12.9)	555 (17.6)	0.01
AVC ^h	213 (5.9)	27 (5.5)	186 (5.9)	0.71
Santé mentale				
Score MMSE ⁱ				0.49
Bas (0-17)	307 (8.5)	35 (7.1)	272 (8.7)	
Moyen (18-23)	345 (9.5)	49 (10.0)	296 (9.5)	
Normal (24-30)	2985 (82.0)	408 (82.9)	2577 (81.8)	
Paramètres biologiques				
Cholestérol total ^j (mmol/L)	5.5 (0.9)	5.6 (0.9)	5.5 (0.9)	0.38
LDL-C ^k (mmol/L)	3.5 (0.8)	3.6 (0.8)	3.5 (0.8)	0.16
HDL-C ^k (mmol/L)	1.4 (0.4)	1.4 (0.3)	1.4 (0.4)	0.09
Triglycérides (mmol/L)	1.2 (0.9-1.6)	1.1 (0.9-1.5)	1.2 (0.9-1.6)	0.03
Glucose ^l (g/L)	5.1 (4.7-5.6)	4.9 (4.7-5.5)	5.1 (4.7-5.6)	0.20
Statut vital (12 ans de suivi)	1451 (39.8)	195 (39.4)	1256 (39.8)	0.86

Les données sont exprimées en n (%) ou moyenne (ET) excepté pour les triglycérides et le glucose pour lesquels elles sont exprimées en médiane (IQR). % : pourcentage; ET= Ecart type; IQR : interquartile range; MMSE : Mini Mental State Examination. p : pour le t-test ou le Chi². Données manquantes: ^a n = 4, ^b n = 21, ^c n = 378, ^d n = 2, ^e n = 1011

^f n = 135, ^g n = 185, ^h n = 48, ⁱ n = 33, ^j n = 206, ^k n = 209, ^l n = 211.

4.2 Distribution et définition des poids pour l'IPW

La figure 12 montre les distributions des poids attribués aux hommes de la sous-cohorte avant et après stabilisation par la moyenne. Avant stabilisation, la distribution des poids est concentrée sur la gauche avec une queue de distribution étalée sur la droite. Après stabilisation, la distribution des poids est normale avec une moyenne de 1,06 (0,24), un minimum et maximum de 0,37 et 1,87 respectivement.

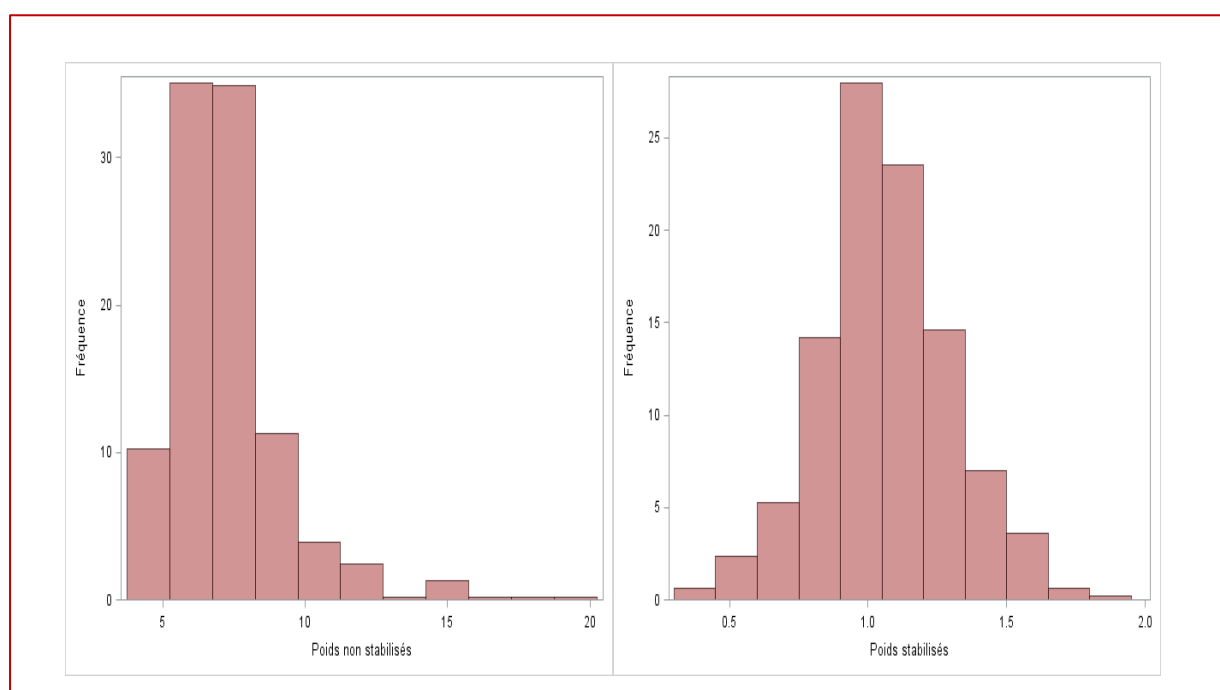


Figure 12 : Distributions des poids avant et après stabilisation.

Pour valider l'échantillonnage aléatoire et l'adéquation de la procédure IPW, nous avons comparé le risque de mortalité toutes causes associé à des facteurs de risque cardiométaboliques établis et des antécédents personnels de maladie cardiovasculaire dans la cohorte totale et dans la sous-cohorte des hommes avec et sans la pondération IPW (tableau 3). Les résultats montraient des estimations de risques de mortalité associés aux différents facteurs de risques très similaires à partir des trois échantillons et une adéquation particulière des risques estimés dans la cohorte totale et ceux obtenus à partir de la sous-cohorte après pondération.

Tableau 3 : Mortalité toutes causes associée aux facteurs de risque cardiométaboliques et aux antécédents d'AVC et maladie coronaire dans la cohorte totale des hommes et dans la sous-cohorte, avec ou sans la pondération par l'inverse de la probabilité.

Facteurs de risque cardio-métaboliques et antécédents cliniques	Cohorte totale (n = 3650)			Sous-cohorte (n = 495)				
	Nombre d'évènements	HR (95% IC)	p	Nombre d'évènements	HR (95% IC)	p	HR (95% IC) [‡]	p
Diabète	1445	1.52 (1.32-1.75)	< 0.01	195	1.54 (1.04-2.29)	0.03	1.52 (1.02-2.26)	0.04
Hypertension	1445	1.43 (1.22-1.66)	< 0.01	195	1.56 (1.05-2.31)	0.03	1.56 (1.09-2.24)	0.02
Antécédents personnels d'AVC	1445	2.27 (1.90-2.71)	< 0.01	195	2.19 (1.35-3.56)	< 0.01	2.27 (1.43-3.61)	< 0.01
Antécédents personnels de maladie coronaire	1445	1.63 (1.44-1.84)	< 0.01	195	1.60 (1.13-2.39)	< 0.01	1.64 (1.06-2.41)	0.03

Analyses non ajustées.

[‡]: Modèle de Cox pondéré par l'inverse de la probabilité d'être dans la sous-cohorte.

4.3 Description des caractéristiques de l'échantillon d'étude

L'échantillon d'étude correspond à celui de la sous-cohorte après l'exclusion des sujets prenant des traitements ou des pathologies pouvant moduler les concentrations des hormones sexuelles endogènes (n = 22). Les analyses ont donc été réalisées à partir d'un échantillon de 473 hommes pour la testostérone et 472 hommes pour l'estradiol (comme indiqué dans les méthodes, un homme n'avait pas de données sur les niveaux d'estradiol).

4.3.1 Caractéristiques générales des sujets

Le tableau 4 représente les caractéristiques générales à l'inclusion des hommes de l'échantillon d'étude au moment de leur entrée dans l'étude. Cette population était tout à fait similaire en termes d'âge et d'autres caractéristiques générales à la sous-cohorte totale des hommes. Les valeurs manquantes concernaient l'MC (n = 2), le niveau d'éducation (n = 1), l'activité physique (n = 118), les antécédents d'AVC (n = 8), le diabète (n = 1), le syndrome métabolique (n = 29), le LDL-cholestérol (n = 3), le glucose (n = 1) et l'estradiol (n = 1).

Tableau 4 : Caractéristiques générales à l'inclusion des hommes de l'échantillon d'étude.

Caractéristiques	Echantillon total (n = 473)
Sociodémographique	
Age (années)	73.6 (5.1)
Centre	
Bordeaux	95 (21.2)
Dijon	233 (52.6)
Montpellier	116 (26.2)
Niveau d'éducation ^a	
Pas d'étude ou primaire	121 (27.0)
Secondaire	130 (29.4)
Bac ou université	193 (43.6)
Mesure anthropométrique	
IMC ^b (kg/m ²)	26.2 (3.2)
Comportements de santé	
Statut tabagique	
Jamais	137 (30.7)
Ancien	274 (61.9)
Actuel	33 (7.4)
Consommation d'alcool	
Jamais	416 (93.7)
Ancien	15 (3.4)
Actuel	13 (2.9)
Activité physique ^c	
Rarement/Jamais	227 (63.8)
Occasionnellement/Régulièrement	128 (36.2)
Antécédents personnels	
Hypertension	352 (79.5)
Hypercholestérolémie	199 (44.9)
Diabète ^a	53 (11.9)
SM-IDF ^d	106 (23.9)
Maladie coronaire	56 (12.6)
AVC ^e	19 (4.4)
Paramètres biologiques	
Cholestérol total (mmol/L)	5.6 (0.9)
LDL-C ^f (mmol/L)	3.6 (0.8)
HDL-C (mmol/L)	1.5 (0.3)
Triglycérides (mmol/L)	1.1 (0.8-1.5)
Glucose ^a (g/L)	5.0 (4.7-5.5)
Testostérone totale (nmol/L)	17.4 (6.2)
Testostérone biodisponible (nmol/L)	10.1 (3.5)
Estradiol ^a (pg/mL)	19.8 (9.2)

Les données sont exprimées en n (%) ou moyenne (ET) excepté pour les triglycérides et le glucose pour lesquels elles sont exprimées en médiane (IQR). % : pourcentage ; ET : Ecart type; IQR : interquartile range.

Données manquantes: ^a n = 1, ^b n = 2, ^c n = 118, ^d n = 29, ^e n = 8, ^f n = 3.

4.3.2 Hormones sexuelles

4.3.2.1 Distribution des hormones sexuelles

Les niveaux des hormones sexuelles endogènes sont disponibles pour tous les hommes sauf pour un sujet où sa valeur d'estradiol n'était pas connue. Aucun des dosages n'était en dessous du seuil de détection. Les concentrations plasmatiques de testostérone totale et biodisponible étaient de 17,4 (6,2) nmol/L et de 10,1 (3,5) nmol/L, respectivement et celles de l'estradiol totale était de 19,8 (9,2) pg/mL. La figure 12 montre les distributions des hormones sexuelles endogènes. La normalité de chacune des distributions a été vérifiée graphiquement et grâce au test de Shapiro-Wilk qui n'était pas significatif ($p = 0,46$; $p = 0,39$ et $p = 0,36$ pour la testostérone totale, la testostérone biodisponible et l'estradiol, respectivement).

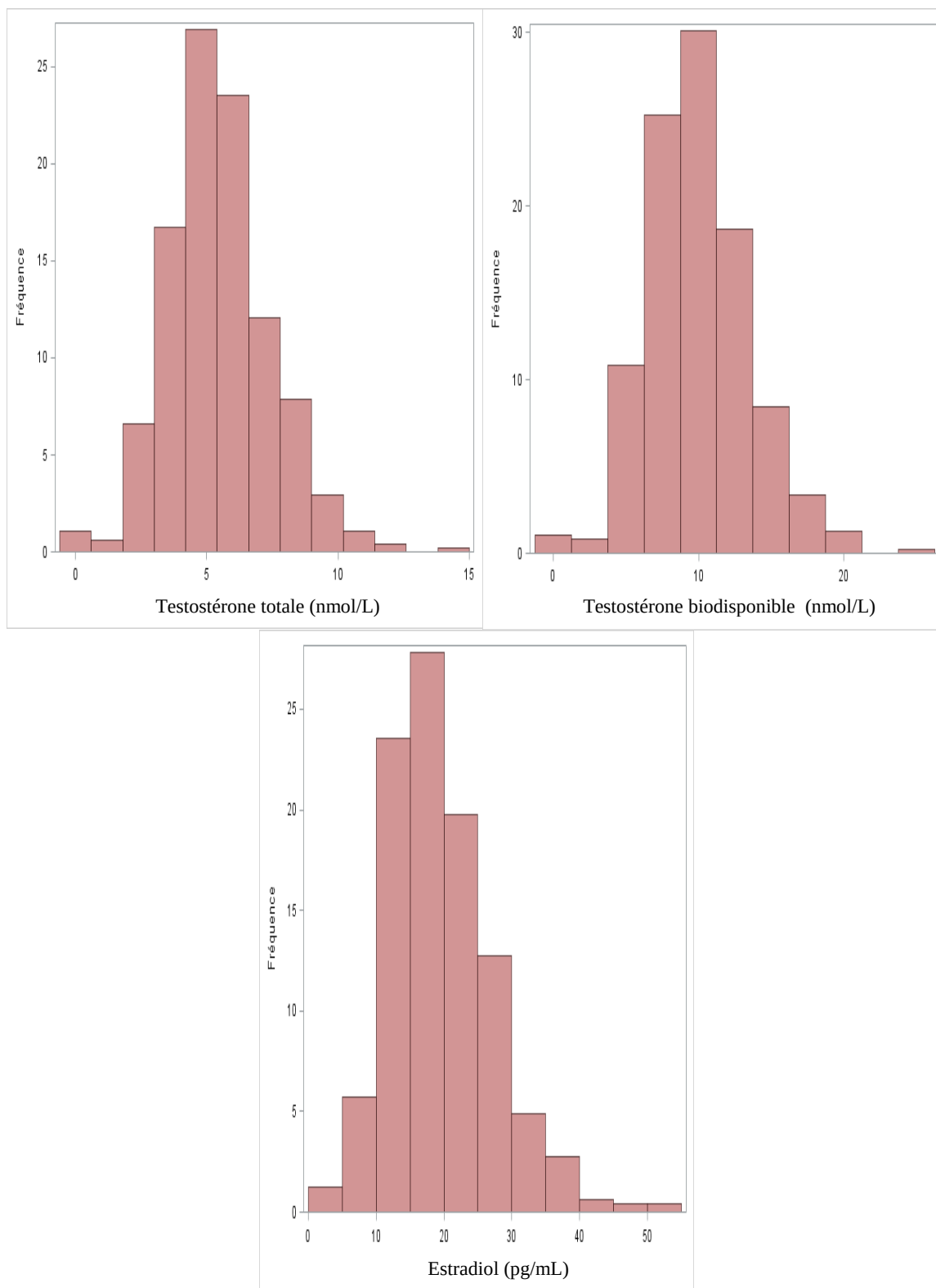


Figure 13 : Histogrammes de la distribution des hormones de l'échantillon à l'inclusion.

4.3.2.2 Corrélation et déterminants des hormones

Le tableau 5 représente les corrélations entre les différentes hormones sexuelles endogènes. Comme attendu, les formes totales et biodisponible de la testostérone étaient très corrélées ($r = 0,90$; $p < 0,01$). Pour cette raison, le reste des analyses sera présenté ici pour la testostérone totale et les résultats concernant la testostérone biodisponible sont disponibles en annexe A (Tableaux 27 et 28). Par ailleurs, la testostérone totale et l'estradiol total sont également significativement corrélés ($r = 0,35$; $p < 0,01$), en grande partie expliqué par l'adiposité responsable de la conversion périphérique des androgènes en estrogènes.

Tableau 5 : Coefficients de corrélation entre les hormones sexuelles

Hormones	Testostérone totale (nmol/L) (n = 473)	Testostérone biodisponible (nmol/L) (n = 473)	Estradiol (pg/L) (n = 472)
Testostérone totale (nmol/L)	1.00	-	-
Testostérone biodisponible (nmol/L)	0.90**	1.00	-
Estradiol (pg/L)	0.35**	0.31**	1.00

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Les tableaux 6 et 7 montrent les caractéristiques à l'inclusion associées aux concentrations de testostérone. Les proportions d'hommes présentant un diabète, un syndrome métabolique et un antécédent d'AVC diminuaient significativement avec l'augmentation des niveaux d'hormone (p de tendance linéaire = 0,01). De même, l'IMC, les niveaux de triglycérides et de glucose étaient en moyenne plus faibles chez les hommes avec les niveaux les plus hauts de testostérone (p de tendance linéaire < 0,01), alors qu'une relation positive était observée avec la pratique d'activité physique (p de tendance linéaire = 0,05), et les niveaux de HDL-cholestérol (p de tendance linéaire < 0,01). Les concentrations de testostérone variaient également selon les centres de l'étude 3C (p de tendance linéaire < 0,10), en raison de la différence de l'âge moyen à l'inclusion dans les différents centres. Aucune variation significative n'a été retrouvée entre les niveaux de testostérone et les autres paramètres sociodémographiques, cliniques et biologiques. Les résultats des régressions linéaires univariées et multivariées de la testostérone montraient des résultats similaires. L'ensemble de ces facteurs expliquaient moins de 10 % de la variance de la testostérone.

Tableau 6 : Caractéristiques des hommes en fonction des tertiles de distribution de la testostérone totale.

Caractéristiques	T1 (< 14.33) (n = 158)	T2 (14.33-19.45) (n = 158)	T3 (≥ 19.46) (n = 157)	p de tendance linéaire
Sociodémographique				
Age (années)	74.4 (6.0)	73.8 (5.3)	73.4 (5.0)	0.10
Centre				0.07
Bordeaux	40 (25.3)	33 (21.0)	23 (14.7)	
Dijon	75 (47.5)	85 (54.1)	86 (54.8)	
Montpellier	43 (27.2)	39 (24.8)	48 (30.6)	
Niveau d'éducation ^a				0.41
Pas d'étude ou primaire	44 (28.0)	32 (20.4)	53 (33.8)	
Secondaire	51 (32.5)	42 (26.8)	45 (28.7)	
Bac ou université	62 (39.5)	83 (52.9)	59 (37.6)	
Mesure anthropométrique				
IMC ^b (kg/m ²)	26.7 (3.7)	26.2 (3.0)	25.5 (2.9)	< 0.01
Comportements de santé				
Statut tabagique				0.57
Jamais	44 (27.9)	54 (34.4)	48 (30.6)	
Ancien	105 (66.5)	96 (61.2)	90 (57.3)	
Actuel	9 (5.7)	7 (4.5)	19 (12.1)	
Consommation d'alcool				0.37
Jamais	149 (94.3)	148 (94.3)	145 (92.4)	
Ancien	5 (3.2)	6 (3.8)	5 (3.2)	
Actuel	4 (2.5)	3 (1.9)	7 (4.5)	
Activité physique ^c				0.05
Rarement/Jamais	77 (70.0)	76 (65.0)	74 (57.5)	
Occasionnellement/Régulièrement	33 (30.0)	41 (35.0)	54 (42.5)	
Antécédents personnels				
Hypertension	120 (76.0)	125 (79.6)	124 (79.0)	0.52
Hypercholestérolémie	65 (41.1)	71 (45.2)	68 (43.3)	0.70
Diabète ^a	27 (17.2)	23 (14.7)	4 (2.6)	< 0.01
SM-IDF ^d	50 (31.7)	35 (22.3)	21 (13.4)	< 0.01
Maladie coronaire	20 (12.7)	16 (10.2)	24 (15.3)	0.49
AVC ^e	14 (9.0)	8 (5.2)	4 (2.3)	0.01
Paramètres biologiques				
Cholestérol total (mmol/L)	5.5 (0.9)	5.7 (0.9)	5.6 (0.9)	0.36
LDL-C ^f (mmol/L)	3.5 (0.8)	3.7 (0.8)	3.5 (0.8)	0.75
HDL-C (mmol/L)	1.3 (0.3)	1.4 (0.3)	1.5 (0.3)	< 0.01
Triglycérides (mmol/L)	1.2 (0.9-1.6)	1.2 (0.9-1.5)	1.0 (0.8-1.4)	< 0.01
Glucose ^f (g/L)	5.1 (4.7-5.7)	5.0 (4.7-5.5)	4.8 (4.5-5.2)	< 0.01

Les données sont exprimées en n (%) ou moyenne (ET) excepté pour les triglycérides et le glucose pour lesquels elles sont exprimées en médiane (IQR). T: Tertile de testostérone (seuils en nmol/L) ; % : pourcentage ; ET : Ecart type; IQR : interquartile range.

p de tendance linéaire basé sur le test Cochran-Armitage ou l'analyse de variance.

Données manquantes: ^a n = 1, ^b n = 2, ^c n = 118. ^d n = 29, ^e n = 8, ^f n = 3.

Tableau 7 : Déterminants de la testostérone totale chez les hommes de l'échantillon (n = 473).

Testostérone totale (nmol/L)	Modèle univarié			Modèle multivarié			R² (%)
	β^b	ET	p	β^b	ET	p	
Age ^a (années)	-0.10	0.05	0.03	-0.03	0.05	0.05	0.74
IMC ^a (kg/m ²)	-0.19	0.05	< 0.01	-0.06	0.08	< 0.01	3.58
Cholestérol total ^a (mmol/L)	0.02	0.05	0.68				
Glucose ^a (g/L)	-0.18	0.05	< 0.01	-0.07	0.06	0.16	
Diabète (%)	-0.57	0.14	< 0.01	-0.33	0.19	0.05	3.12
Hypertension (%)	-0.04	0.11	0.73				
Hypercholestérolémie (%)	-0.04	0.09	0.67				
Activité physique (%)	0.14	0.05	< 0.01	0.08	0.05	0.13	
AVC (%)	-0.48	0.20	0.02	-0.49	0.23	0.04	1.00
Maladie coronaire (%)	0.07	0.14	0.59				
R² total ajusté (%)							8.44

^a Résultats obtenus pour une augmentation d'un écart-type (ET).

^b Variation d'un écart-type de la variable s'accompagne d'une variation de β écart-type de l'hormone.

R²= pourcentage de variance expliquée.

Les tableaux 8 et 9 montrent les caractéristiques à l'inclusion associées aux concentrations d'estradiol. La proportion d'hommes présentant une hypertension augmentait significativement avec les niveaux d'estradiol (p de tendance linéaire = 0,01) mais celle avec un diabète et un antécédent d'AVC diminuait avec les niveaux d'hormone (p de tendance linéaire < 0,01). Aucune autre variation n'a été retrouvée entre les tertiles d'estradiol et les caractéristiques des hommes à l'inclusion. De plus, l'analyse par régression linéaire laissait apparaître une association inverse entre l'hypercholestérolémie et l'estradiol et l'ensemble des paramètres associés expliquaient uniquement 2,4 % de la variance totale de l'estradiol.

Tableau 8 : Caractéristiques des hommes en fonction des tertiles de la distribution de l'estradiol.

Caractéristiques	T1 (< 15.36) (n = 157)	T2 (15.36- 21.66) (n = 158)	T3 (≥ 21.67) (n = 157)	p de tendance linéaire
Sociodémographique				
Age (années)	73.6 (5.6)	74.0 (5.3)	74.0 (5.4)	0.46
Centre				0.34
Bordeaux	26 (16.5)	38 (24.1)	32 (20.4)	
Dijon	86 (54.8)	74 (46.8)	86 (54.8)	
Montpellier	45 (28.7)	46 (29.1)	39 (24.8)	
Niveau d'éducation ^a				0.67
Pas d'étude ou primaire	39 (24.8)	48 (30.6)	42 (26.8)	
Secondaire	54 (34.4)	41 (26.1)	43 (27.3)	
Bac ou université	64 (40.8)	68 (33.3)	72 (45.9)	
Mesure anthropométrique				
IMC ^b (kg/m ²)	25.8 (3.1)	26.3 (3.2)	26.2 (3.4)	0.20
Comportements de santé				
Statut tabagique				0.44
Jamais	49 (31.2)	50 (31.7)	47 (30.0)	
Ancien	98 (62.4)	100 (63.3)	93 (59.2)	
Actuel	10 (6.4)	8 (5.0)	17 (10.8)	
Consommation d'alcool				0.34
Jamais	148 (94.3)	150 (94.9)	144 (91.7)	
Ancien	5 (3.2)	6 (3.8)	5 (3.2)	
Actuel	4 (2.5)	2 (1.3)	8 (5.1)	
Activité physique ^c				0.31
Rarement/Jamais	75 (60.2)	73 (65.2)	79 (66.4)	
Occasionnellement/Régulièrement	49 (39.8)	39 (34.8)	40 (33.6)	
Antécédents personnels				
Hypertension	117 (31.0)	125 (33.2)	135 (35.8)	0.01
Hypercholestérolémie	72 (35.3)	72 (35.3)	60 (29.4)	0.17
Diabète ^a	25 (46.3)	14 (25.9)	15 (27.8)	0.08
SM-IDF ^d	36 (22.9)	34 (21.5)	36 (22.9)	0.94
Maladie coronaire	21 (35.0)	20 (33.3)	19 (31.7)	0.74
AVC ^e	10 (38.5)	13 (50.0)	3 (11.5)	0.09
Paramètres biologiques				
Cholestérol total (mmol/L)	5.5 (0.8)	5.5 (0.9)	5.6 (0.9)	0.35
LDL-C ^f (mmol/L)	3.5 (0.7)	3.5 (0.8)	3.6 (0.8)	0.33
HDL-C (mmol/L)	1.5 (0.3)	1.4 (0.3)	1.4 (0.3)	0.33
Triglycérides (mmol/L)	1.1 (0.8-1.5)	1.1 (0.9-1.5)	1.2 (0.9-1.5)	0.49
Glucose ^a (g/L)	5.1 (4.7-5.6)	4.9 (4.7-5.4)	4.9 (4.6-5.3)	0.10

Les données sont exprimées en n (%) ou moyenne (ET) excepté pour les triglycérides et le glucose pour lesquels elles sont exprimées en médiane (IQR). T: Tertile d'estradiol (seuils en pg/mL) ; % : pourcentage ; ET : Ecart type; IQR : interquartile range.

p de tendance linéaire basé sur le test Cochran-Armitage ou l'analyse de variance.

Données manquantes: ^a n = 1, ^b n = 2, ^c n = 118, ^d n = 29, ^e n = 8, ^f n = 3.

Tableau 9 : Déterminants de l'estradiol chez les hommes de l'échantillon (n = 473).

Estradiol (pg/mL)	Modèle univarié			Modèle multivarié			R ² (%)
	β^b	ET	p	β^b	ET	p	
Age ^a (années)	0.02	0.05	0.69				
IMC ^a (kg/m ²)	0.04	0.05	0.43				
Cholestérol total ^a (mmol/L)	-0.02	0.05	0.74				
Glucose ^a (g/L)	-0.08	0.04	0.08	-0.05	0.06	0.38	
Diabète (%)	-0.28	0.14	0.05	-0.19	0.19	0.30	
Hypertension (%)	0.24	0.11	0.03	0.28	0.12	0.01	0.80
Hypercholestérolémie (%)	-0.20	0.09	0.03	-0.22	0.13	0.08	0.80
Activité physique (%)	1.62	1.80	0.37				
AVC (%)	-0.44	0.20	0.03	-0.46	0.20	0.02	0.80
Maladie coronaire (%)	-0.02	0.14	0.88				
R ² total ajusté (%)							2.40

^a Résultats obtenus pour une augmentation d'un écart-type (ET).

^b Variation d'un écart-type de la variable s'accompagne d'une variation de β écart-type de l'hormone.

R²= pourcentage de variance expliquée.

4.3.3 Facteurs de risque de mortalité

4.3.3.1 Mortalité toutes causes

Le tableau 10 fournit une comparaison des caractéristiques à l'inclusion des hommes de l'échantillon en fonction de leur statut vital après 12 ans de suivi. Au cours des 12 années de suivi, 183 hommes étaient décédés, ce qui correspond à une incidence annuelle de 4,1 %. Comme attendu, les hommes qui décédaient durant le suivi étaient en moyenne plus âgés que les non décédés à l'inclusion (77,1 vs 71,8 ans respectivement, $p < 0,01$). Ils présentaient également des niveaux d'estradiol en moyenne plus élevés (20,8 vs 18,9 pg/mL respectivement, $p = 0,06$). Ils étaient également plus souvent buveurs (5,5 % vs 1,4 % ; $p = 0,02$), pratiquaient moins d'activité physique (30,3 % vs 39,6 % ; $p = 0,08$) et présentaient une proportion plus importante d'hypertension (82,5 % vs 75,4 % ; $p < 0,01$), de diabète (14,8 % vs 9,4 % ; $p = 0,03$) et d'antécédents de maladie coronaire (16,9 % vs 10,0 % ; $p = 0,03$) et d'AVC (10,1 % vs 2,8 % ; $p = 0,04$). En revanche, ces sujets souffraient plus rarement d'une hypercholestérolémie à l'inclusion (36,6 % vs 47,4 % ; $p = 0,02$), comme souvent chez les sujets âgés et ils avaient en moyenne des niveaux de testostérone biodisponible plus bas (9,7 vs 10,4 nmol/L respectivement, $p = 0,05$). Après ajustement sur l'âge, seule la consommation d'alcool, le statut diabétique, la présence d'antécédent d'AVC et les niveaux d'estradiol restaient significativement différents selon le statut vital. Aucune association n'a été retrouvée entre le statut vital et les paramètres biologiques à l'inclusion.

4.3.3.2 Mortalité par causes spécifiques

Le tableau 11 fournit une comparaison des caractéristiques à l'inclusion des hommes de l'échantillon en fonction de la cause de décès après 12 ans de suivi. Parmi les 183 décès enregistrés au cours du suivi, 44 étaient attribués à une maladie cardiovasculaire, 57 à un cancers et 82 à une autre cause. Un âge plus élevé à l'inclusion était retrouvé comme associé à la mortalité, quelle qu'en soit la cause.

Comparés aux hommes vivants à la fin du suivi, ceux qui décédaient par maladie cardiovasculaire étaient plus souvent diabétiques (9,4 % vs 18,2 % ; $p = 0,07$) et avaient en moyenne des niveaux d'estradiol plus élevés (18,9 vs 22,3 pg/mL ; $p = 0,04$). Comme attendu, ils présentaient plus souvent un antécédent de maladie coronaire (10,0 % vs 22,7 % ; $p = 0,02$) et d'AVC (2,8 % vs 11,9 % ; $p = 0,02$). Ces résultats restaient inchangé après ajustement l'âge.

Outre l'âge, les caractéristiques associées à la mortalité par cancers étaient les niveaux moyens de testostérone biodisponible qui était plus bas (10,3 vs 9,4 nmol/L ; $p = 0,05$), la consommation en cours de tabac et d'alcool (5,5 % vs 15,8 % ; $p = 0,02$ et 1,4 % vs 8,8 % ; $p = 0,01$ respectivement). Par ailleurs, les hommes décédés par cancer présentaient plus rarement une hypercholestérolémie (47,4 % vs 29,8 % ; $p = 0,02$). Après ajustement sur l'âge, seuls la consommation d'alcool et l'hypercholestérolémie restaient significativement différents.

Enfin, les caractéristiques associées à la mortalité par autres causes étaient la consommation actuelle d'alcool, l'activité physique, l'hypertension, le diabète, les antécédents personnels de maladie coronaire et d'AVC et les niveaux de LDL-cholestérol et de testostérone biodisponible. Après ajustement sur l'âge, seules les associations concernant la consommation actuelle d'alcool, l'hypertension, le diabète et les antécédents personnels de maladie coronaire et d'AVC restaient significatives.

Tableau 10 : Caractéristiques des hommes selon le statut vital après 12 ans de suivi.

Caractéristiques	Vivants (n = 290)	Décédés (n = 183)	p ^g	p ^h ajustée sur l'âge
Sociodémographique				
Age (années)	71.8 (4.4)	77.1 (5.4)	< 0.01	-
Centre			0.44	0.59
Bordeaux	55 (18.7)	42 (23.0)		
Dijon	151 (52.3)	95 (51.9)		
Montpellier	84 (29.0)	46 (25.1)		
Niveau d'éducation ^a			0.16	0.34
Pas d'étude ou primaire	77 (26.3)	53 (29.1)		
Secondaire	78 (27.0)	60 (33.0)		
Bac ou université	135 (46.7)	69 (37.9)		
Mesure anthropométrique				
IMC ^b (kg/m ²)	26.2 (3.1)	26.4 (3.4)	0.67	0.72
Comportements de santé				
Statut tabagique			0.14	0.12
Jamais	94 (32.2)	53 (29.0)		
Ancien	180 (62.3)	111 (60.7)		
Actuel	16 (5.5)	19 (10.3)		
Consommation d'alcool			0.04	0.017
Jamais	277 (95.5)	166 (90.7)		
Ancien	9 (3.1)	7 (3.8)		
Actuel	4 (1.4)	10 (5.5)		
Activité physique ^c			0.08	0.41
Rarement/Jamais	135 (60.4)	93 (69.7)		
Occasionnellement/Régulièrement	88 (39.6)	40 (30.3)		
Antécédents personnels				
Hypertension	218 (75.4)	151 (82.5)	< 0.01	0.83
Hypercholestérolémie	137 (47.4)	67 (36.6)	0.02	0.29
Diabète ^a	27 (9.4)	27 (14.8)	0.07	0.03
SM-IDF ^d	70 (25.2)	36 (21.7)	0.40	0.36
Maladie coronaire	29 (10.0)	31 (16.9)	0.03	0.10
AVC ^e	8 (2.8)	18 (10.1)	< 0.01	0.04
Paramètres biologiques				
Cholestérol total (mmol/L)	5.6 (0.9)	5.5 (0.9)	0.25	0.69
LDL-C ^f (mmol/L)	3.6 (0.8)	3.5 (0.8)	0.21	0.83
HDL-C (mmol/L)	1.5 (0.3)	1.4 (0.3)	0.68	0.83
Triglycérides (mmol/L)	1.1 (0.9-1.5)	1.2 (0.9-1.5)	0.57	0.27
Glucose ^a (g/L)	5.0 (4.7-5.5)	5.0 (4.6-5.5)	0.87	0.64
Testostérone (nmol/L)	17.5 (5.7)	17.2 (6.9)	0.59	0.63
Testostérone biodisponible (nmol/L)	10.4 (3.4)	9.7 (3.7)	0.05	0.64
Estradiol ^a (pg/mL)	18.9 (9.2)	20.8 (9.0)	0.06	0.06

Les données sont exprimées en n (%) ou moyenne (ET) excepté pour les triglycérides et le glucose pour lesquels elles sont exprimées en médiane (IQR). % : pourcentage ; ET : Ecart type; IQR : interquartile range.

^g p du t-test ou du χ^2 .

^h p basé sur le test Cochran-Armitage ou l'analyse de variance.

Données manquantes: ^a n = 1, ^b n = 2, ^c n = 118, ^d n = 29, ^e n = 8, ^f n = 3.

Tableau 11 : Caractéristiques à l'inclusion des hommes selon le statut vital par cause après 12 ans de suivi.

Caractéristiques	Vivants (n = 290)	Décès par								
		CV (n = 44)	p ^g	p ^h	Cancer (n = 57)	p ^g	p ^h	Autres (n = 82)	p ^g	p ^h
Sociodémographique										
Age (années)	71.8 (4.4)	77.3 (4.8)	< 0.01	-	75.5 (5.1)	< 0.01	-	78.1 (5.7)	< 0.01	-
Centre			0.06	0.09		0.96	0.85		0.70	0.69
Bordeaux	55 (18.7)	15 (34.1)			10 (17.5)			17 (20.7)		
Dijon	151 (52.3)	19 (43.2)			31 (54.4)			45 (54.9)		
Montpellier	84 (29.0)	10 (22.7)			16 (28.1)			20 (24.4)		
Niveau d'éducation ^a			0.50	0.41		0.36	0.15		0.30	0.49
Pas d'étude ou primaire	77 (26.3)	13 (30.2)			19 (33.4)			21 (25.6)		
Secondaire	78 (27.0)	14 (32.6)			17 (29.8)			29 (35.4)		
Bac ou université	135 (46.7)	16 (37.2)			21 (36.8)			32 (39.0)		
Mesure anthropométrique										
IMC ^b (kg/m2)	26.2 (3.1)	26.7 (3.3)	0.37	0.45	25.9 (2.7)	0.54	0.56	25.8 (4.0)	0.45	0.41
Comportements de santé										
Statut tabagique			0.36	0.33		0.02	0.11		0.22	0.19
Jamais	94 (32.2)	18 (40.9)			16 (28.1)			19 (23.2)		
Ancien	180 (62.3)	23 (52.3)			32 (56.1)			56 (68.3)		
Actuel	16 (5.5)	3 (6.8)			9 (15.8)			7 (8.5)		
Consommation d'alcool			0.56	0.06		0.01	< 0.01		0.09	0.02
Jamais	277 (95.5)	41 (93.1)			51 (89.4)			74 (90.2)		
Ancien	9 (3.1)	2 (4.6)			1 (1.8)			4 (4.9)		
Actuel	4 (1.4)	1 (2.3)			5 (8.8)			4 (4.9)		
Activité physique ^c			0.13	0.31		0.95	0.74		0.05	0.18
Rarement/Jamais	135 (60.4)	19 (76.0)			28 (60.9)			46 (73.8)		
Occasionnellement/Régulièrement	88 (39.6)	6 (24.0)			18 (39.1)			16 (26.2)		
Antécédents personnels										

Caractéristiques	Vivants (n = 290)	Décès par								
		CV (n = 44)	p ^g	p ^h	Cancer (n = 57)	p ^g	p ^h	Autres (n = 82)	p ^g	p ^h
Hypertension	218 (75.4)	36 (81.8)	0.35	0.72	46 (80.7)	0.39	0.97	69 (84.2)	0.09	0.95
Hypercholestérolémie	137 (47.4)	19 (43.2)	0.60	0.96	17 (29.8)	0.02	0.05	31 (37.8)	0.12	0.38
Diabète ^a	27 (9.4)	8 (18.2)	0.07	0.08	4 (7.0)	0.80	0.80	15 (18.3)	0.03	0.01
SM-IDF ^d	70 (24.2)	11 (25.0)	0.91	0.95	9 (15.8)	0.17	0.24	15 (18.8)	0.30	0.46
Maladie coronaire	29 (10.0)	10 (22.7)	0.02	0.09	6 (10.5)	0.91	0.79	15 (18.3)	0.04	0.09
AVC ^e	8 (2.8)	5 (11.9)	0.02	0.08	2 (3.5)	0.68	0.95	11 (13.9)	< 0.01	0.01
Paramètres biologiques										
Cholestérol total (mmol/L)	5.6 (0.9)	5.6 (1.1)	0.97	0.30	5.5 (0.7)	0.57	0.88	5.4 (0.9)	0.13	0.86
LDL-C ^f (mmol/L)	3.6 (0.8)	3.6 (0.8)	0.76	0.20	3.5 (0.8)	0.44	0.96	3.4 (0.8)	0.08	0.91
HDL-C (mmol/L)	1.5 (0.3)	1.4 (0.3)	0.37	0.51	1.5 (0.3)	0.92	0.85	1.5 (0.4)	0.96	0.89
Triglycérides (mmol/L)	1.1 (0.9-1.5)	1.2 (0.9-1.4)	0.60	0.78	1.2 (0.9-1.6)	0.47	0.67	1.1 (0.9-1.4)	0.98	0.50
Glucose ^a (g/L)	5.0 (4.7-5.5)	4.9 (4.5-5.1)	0.62	0.62	5.0 (4.7-5.3)	0.49	0.57	5.1 (4.7-5.8)	0.24	0.12
Testostérone (nmol/L)	17.5 (5.7)	18.4 (7.5)	0.35	0.16	17.1 (6.3)	0.58	0.61	16.7 (7.0)	0.33	0.75
Testostérone biodisponible (nmol/L)	10.3 (3.4)	10.4 (9.2)	0.88	0.42	9.4 (3.2)	0.05	0.14	9.4 (4.0)	0.05	0.40
Total estradiol ^a (pg/mL)	18.9 (9.2)	22.3 (9.2)	0.04	0.07	20.6 (7.4)	0.27	0.43	20.1 (9.0)	0.44	0.33

Les données sont exprimées en n (%) ou moyenne (ET) excepté pour les triglycérides et le glucose pour lesquels elles sont exprimées en médiane (IQR). % : pourcentage ;

ET : Ecart type; IQR : interquartile range. CV : cardiovasculaire

^gp du t-test ou du χ^2 .

^hp basé sur le test Cochran-Armitage ou l'analyse de variance.

Données manquantes: ^a n = 1, ^b n = 2, ^c n = 118, ^d n = 29, ^e n = 8, ^f n = 3.

4.4 Testostérone et mortalité

Cette partie de la thèse présente les associations entre la testostérone totale et la mortalité. Les résultats concernant la testostérone biodisponible, très similaires à ceux sur la testostérone totale, sont disponibles en annexe B (Tableaux 29-33).

4.4.1 Mortalité toutes causes : influence du syndrome métabolique

Cette partie présente l'impact de la testostérone sur le risque de mortalité et l'influence du syndrome métabolique sur cette association. Ces résultats ainsi que ceux de la testostérone biodisponible ont fait l'objet de la publication d'un article original dans la revue *Journal of Endocrine Society* [139], Annexe E.

4.4.1.1 Caractéristiques des hommes à l'inclusion selon le syndrome métabolique

Le tableau 12 fournit une comparaison des caractéristiques à l'inclusion des hommes de l'échantillon en fonction de leur statut syndrome métabolique. Au total 29 hommes n'avaient pas de données permettant de définir leur statut par rapport au syndrome métabolique, ils ont donc été supprimés de ces analyses. Leurs caractéristiques à l'inclusion ne différaient pas des 444 hommes restants.

Sur cette population de 444 sujets, les facteurs de risque de mortalité et les caractéristiques associées à la testostérone restaient inchangés, ce qui nous a permis de garder les mêmes variables d'ajustement (identifiées avec l'échantillon total de 473 hommes) dans les modèles.

La prévalence de syndrome métabolique était de 23,9 % (n = 106). Les hommes qui présentaient un syndrome métabolique étaient moins souvent d'actuel fumeurs (2,9 % vs 8,9 % ; p < 0,01) et buveurs (0,9 % vs 3,6 % ; p = 0,02), avaient plus souvent des antécédents d'AVC (8,5 % vs 3,0 % ; p = 0,01) et pratiquaient moins régulièrement une activité physique (20,0 % vs 36,2 %, p = 0,06). Comme attendu, ils présentaient des niveaux de testostérone plus bas (15,4 vs 18,0 nmol/L, p < 0,01) et une prévalence plus importante des composants individuels du syndrome métabolique.

Dans notre échantillon, le syndrome métabolique à l'inclusion avait une prévalence similaire chez les sujets vivants à la date de point et chez ceux qui décédaient au cours du suivi (21,7 % vs 25,2 %; $p = 0,40$).

Tableau 12 : Caractéristiques générales à l'inclusion des hommes selon le statut syndrome métabolique.

Caractéristiques	Sans SM (n = 338)	Avec SM (n = 106)	p
Sociodémographique			
Age (années)	73.6 (5.1)	73.5 (5.2)	0.87
Centre			0.25
Bordeaux	69 (20.4)	25 (23.8)	
Dijon	174 (51.5)	60 (56.2)	
Montpellier	95 (28.1)	21 (20.0)	
Niveau d'éducation			0.05
Pas d'étude ou primaire	86 (25.4)	34 (32.4)	
Secondaire	94 (27.8)	37 (34.3)	
Bac ou université	158 (46.8)	35 (33.3)	
Mesure anthropométrique			
IMC ^a (kg/m ²)	25.5 (2.9)	28.5 (2.9)	< 0.01
Comportements de santé			
Statut tabagique			< 0.01
Jamais	104 (30.8)	32 (30.5)	
Ancien	204 (60.4)	70 (66.7)	
Actuel	30 (8.9)	3 (2.9)	
Consommation d'alcool			0.02
Jamais	313 (92.6)	103 (97.2)	
Ancien	13 (3.8)	2 (1.9)	
Actuel	12 (3.6)	1 (0.9)	
Activité physique ^b			0.06
Rarement/Jamais	159 (63.8)	60 (80.0)	
Occasionnellement/Régulièrement	90 (36.2)	15 (20.0)	
Antécédents personnels			
Hypertension	248 (73.4)	105 (99.0)	< 0.01
Hypercholestérolémie	138 (40.8)	61 (58.1)	< 0.01
Diabète ^a	19 (5.6)	34 (32.1)	< 0.01
Maladie coronaire	42 (12.4)	14 (13.2)	0.81
AVC ^c	10 (3.0)	9 (8.5)	0.01
Paramètres biologiques			
Cholestérol total (mmol/L)	5.6 (0.8)	5.6 (0.9)	0.47
LDL-C ^a (mmol/L)	3.6 (0.8)	3.6 (0.8)	0.70
HDL-C (mmol/L)	1.5 (0.3)	1.3 (0.3)	< 0.01
Triglycérides (mmol/L)	1.0 (0.8-1.3)	1.5 (1.2-2.0)	< 0.01
Glucose ^a (g/L)	4.9 (4.6-5.2)	5.7 (5.1-6.4)	< 0.01
Testostérone totale (nmol/L)	18.0 (6.2)	15.4 (5.9)	< 0.01
Testostérone biodisponible (nmol/L)	10.4 (3.4)	9.0 (3.6)	< 0.01
Estradiol ^a (pg/mL)	19.8 (9.5)	19.4 (8.3)	0.73

Les données sont exprimées en n (%) ou moyenne (ET) excepté pour les triglycérides et le glucose pour lesquels elles sont exprimées en médiane (IQR). SM = Syndrome Métabolique; % : pourcentage; ET : Ecart type; IQR : interquartile range.

p du t-test ou du χ^2 .

Données manquantes: ^a n = 1, ^b n = 120, ^c n = 5.

4.4.1.2 Testostérone et risque de mortalité toutes causes en fonction du syndrome métabolique

Dans un premier temps, les moyennes des niveaux de testostérone des hommes à l'inclusion ont été comparées en fonction du statut vital à 12 ans de suivi (Tableau 10). Les niveaux de testostérone n'étaient pas statistiquement différents entre les deux groupes 17,5 (5,7) vs 17,2 (6,9) nmol/L respectivement pour les hommes non décédés et les décédés, $p = 0,63$).

Ensuite, l'association entre le niveau de testostérone et la mortalité toute cause a été étudiée à l'aide d'un modèle de Cox (Tableau 13). Dans le modèle ajusté sur l'âge et le centre, le niveau de testostérone pris en continue ou en tertile n'était pas statistiquement associé à un risque de mortalité toutes causes. L'ajustement sur le syndrome métabolique ne modifiait pas ce résultat.

Tableau 13 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi[¶].

Testostérone totale (nmol/L)	Nombres de décès	Modèle 1 (n = 444)		Modèle 2 (n = 444)	
		HR (95% IC)	P	HR (95% IC)	p
Pour l'augmentation d'un ET	183	1.05 (0.90-1.22)	0.53	1.05 (0.89-1.24)	0.53
T1 (<14.33)	64	0.96 (0.68-1.36)	0.82	1.00 (0.69-1.44)	0.99
T2 (14.33-19.45)	60	0.92 (0.65-1.30)	0.63	0.92 (0.64-1.33)	0.67
T3 ($\geq$ 19.46)	59	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
p de tendance linéaire			0.86		0.95

[¶]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1 : ajusté sur l'âge, le centre ; modèle 2 : modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et tabac, le syndrome métabolique et l'activité physique.

T = Tertiles de la testostérone, ET = Ecart type.

Cependant, une interaction a été mise en évidence entre le niveau de testostérone et le syndrome métabolique sur la mortalité toutes causes (Modèle 2 : $p < 0,01$). Nous avons donc évalué le risque de mortalité en fonction le statut syndrome métabolique (Tableau 14), en ajustant, dans chacune des strates, sur la consommation d'alcool et les antécédents de maladie cardiovasculaire et d'AVC. Une diminution d'un écart type de la distribution de testostérone ne modifiait pas le risque de mortalité chez les hommes sains mais était associée à une augmentation du risque de décès chez les sujets présentant un syndrome métabolique (Modèle 2 : HR = 0,85; 95%IC : 0,72-1,01 et HR = 1,79; 95%IC : 1,14-2,79 ;

respectivement). Un résultat similaire était observé avec les niveaux de testostérone étudiés en tertile. Chez les sujets sains, les hommes avec les niveaux les plus bas de testostérone (premier tertile) ne présentaient pas de sur-risque de mortalité toutes causes comparés aux sujets avec des niveaux élevés d'hormone (troisième tertile) (p de tendance linéaire= 0,15). En revanche, dans le sous-groupe des hommes présentant un syndrome métabolique, les sujets avec des niveaux bas de testostérone avaient un risque de mortalité toutes causes significativement augmenté par rapport à ceux présentant les niveaux les plus hauts (HR tertile 1 vs tertile 3 = 5,14 ; 95%IC : 1,18-22,49 et p de tendance linéaire = 0,03).

Tableau 14 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi selon le statut syndrome métabolique[¥].

	Sans syndrome métabolique					Avec syndrome métabolique					p ^a
	Modèle 1 (n = 338)		Modèle 2 (n = 338)			Modèle 1 (n = 106)		Modèle 2 (n = 106)			
	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p	
Testostérone totale (nmol/L)											
Pour la diminution d'un ET	130	0.83 (0.70-0.98)	0.03	0.85 (0.72-1.01)	0.07	36	2.17 (1.38-3.42)	<0.01	1.79 (1.14-2.79)	0.01	<0.01
T1 (< 14.33)	34	0.69 (0.45-1.05)	0.08	0.74 (0.48-1.14)	0.17	20	5.31 (1.27-22.18)	0.02	5.14 (1.18-22.49)	0.03	
T2 (14.33-19.33)	43	0.76 (0.51-1.12)	0.16	0.79 (0.53-1.17)	0.24	13	3.69 (0.87-15.73)	0.08	3.96 (0.93-16.99)	0.06	
T3 (> 19.33)	53	1.00 (référence)	-	1.00 (référence)	-	3	1.00 (référence)	-	1.00 (référence)	-	
p de tendance linéaire			0.07		0.15			0.02		0.03	

[¥]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1 : ajusté sur l'âge, le centre ; modèle 2 : modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac et l'activité physique.

T = Tertiles de la testostérone ; ET= Ecart type ; p^a = p interaction entre les niveaux de testostérone et le syndrome métabolique sur la mortalité dans le modèle 2.

Nous avons également évalué l'influence des différents composants du syndrome métabolique sur l'association entre la testostérone et la mortalité. Le tableau 15 montre le risque de mortalité toutes causes chez les hommes présentant un syndrome métabolique en fonction de la présence des différents composants de ce syndrome métabolique. Ce tableau montre également le test d'interaction comparant le risque de mortalité chez les sujets sains (HR= 0,85 ; 95%IC : 0,72-1,01 ; Tableau 14) avec les risques de mortalité chez les hommes présentant un syndrome métabolique avec une des composants spécifiques. Quel que soit le composant du syndrome métabolique étudié, le terme d'interaction avec les niveaux de testostérone sur la mortalité toutes causes était significatif. Pour chacun des composants, on retrouve des résultats qui étaient cohérents avec ceux présentés précédemment, montrant des risques de mortalité qui augmentaient lorsque les niveaux de testostérone diminuaient. Néanmoins, certaines de ces associations n'étaient pas significatives.

Tableau 15 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi chez les hommes présentant un syndrome métabolique en fonction de la présence des différents composants du syndrome métabolique[¥].

Composants du syndrome métabolique	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	p interaction ^a
Diabète (n = 71)				
HR pour la diminution d'un ET	24	1.79 (0.99-3.24)	0.05	< 0.01
Hypertriglycémie (n = 49)				
HR pour la diminution d'un ET	16	2.79 (1.22-6.35)	0.02	< 0.01
HDL-C bas (n = 22)				
HR pour la diminution d'un ET	11	2.87 (0.70-11.85)	0.14	0.04
Hypertension (n = 105)				
HR pour la diminution d'un ET	35	1.85 (1.15-2.96)	0.01	< 0.01

[¥]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW et ajusté sur l'âge, le centre, les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, l'activité physique et les 3 autres composants du syndrome métabolique.

^a: p de l'interaction comparant les HRs associés à la diminution des niveaux de testostérone d'un ET chez les hommes avec chacun des composants au HR chez les hommes sans syndrome métabolique (i.e. 0.85 [0.72-1.01], voir le tableau 14).

ET : Ecart type (6,2 nmol/L).

4.4.1.3 Modèle de médiation permettant l'interaction testostérone-syndrome métabolique

Le tableau 16 fournit le résultat de l'analyse de médiation permettant une interaction entre les niveaux de testostérone et le statut syndrome métabolique sur la mortalité toutes causes. Comme attendu en présence d'une interaction, dans notre cas entre les niveaux de testostérone et le syndrome métabolique sur la mortalité toutes causes, l'effet direct contrôlé était différent de l'effet direct naturel (modèle 2 : 1,08 ; 95%IC : 0,93-1,28 et 0,98 ; 95%IC : 0,87-1,17 ; respectivement). Une diminution des niveaux de testostérone (de 17,89 nmol/L à 9,15 nmol/L ; valeurs médianes du niveau de testostérone dans les deux groupes d'hommes respectivement, avec des niveaux 'élevés' et 'bas' ; par rapport au seuil clinique de 11 nmol/L) était associée à un risque augmenté de mortalité toutes causes et environ la moitié de cet effet (59 %) était expliquée par l'effet indirect du syndrome métabolique (effet indirect naturel, modèle 2 : 0,97 ; 95%IC : 0,93-0,99).

Tableau 16 : Effets direct, indirect, et total de la testostérone totale sur la mortalité toutes causes et la proportion de l'effet total médiée par le syndrome métabolique.

Effets	Modèle 1 (n = 444)		Modèle 2 (n = 444)	
	Coefficients ^a	95% IC ^b	Coefficients ^a	95% IC ^b
Effet Direct Contrôlé	1.10	(0.95-1.29)	1.08	(0.93-1.28)
Effet Direct Natural	0.98	(0.86-1.14)	0.98	(0.87-1.17)
Effet Indirect Natural	0.96	(0.91-0.99)	0.97	(0.93-0.99)
Effet Total	0.94	(0.83-1.09)	0.94	(0.84-1.13)
Proportion médiée	0.69	-	0.59	-

^a : Modèle de vie accélérée. Modèle 1 : ajusté sur l'âge et le centre ; Modèle 2 : modèle 1 + la consommation d'alcool et les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC et l'activité physique. Les coefficients représentent le ratio moyen de la survie et sont estimés pour le changement d'un niveau 'élevé' de testostérone (17,89 nmol/L) à un 'bas' niveau (9.15 nmol/L); Ces valeurs représentent les médianes du niveau de testostérone dans deux groupes d'hommes respectivement, avec des niveaux 'élevés' et 'bas'; définit par rapport au seuil clinique de 11 nmol/L. Un ratio moyen de survie inférieur à 1 indique que la diminution du niveau de testostérone est associée à une mauvaise survie.

^b : Les intervalles de confiance à 95% (95%IC) des coefficients sont estimés avec un bootstrap (2000 échantillons).

4.4.1.4 Analyses de sensibilité

Les tableaux 17 et 18 montrent les analyses de sensibilité de l'association entre la testostérone totale et la mortalité toute cause en fonction du statut syndrome métabolique. Nous avons dans un premier temps exclu les hommes décédés les quatre premières années de suivi ($n = 33$). Puis, nous avons testé l'interaction entre les niveaux de testostérone et le syndrome métabolique défini selon deux autres critères sur la mortalité toutes. Aucun de ces résultats n'était discordant avec ceux retrouvés précédemment.

Tableau 17 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique, après suppression des décès survenus les 4 premières années de suivi[‡].

	Sans syndrome métabolique					Avec syndrome métabolique					
	Modèle 1 (n = 313)			Modèle 2 (n = 313)		Modèle 1 (n = 96)			Modèle 2 (n = 96)		
	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	P	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p	p ^a
Testostérone totale (nmol/L)											
Pour la diminution d'un ET	106	0.84 (0.69-1.01)	0.06	0.85 (0.70-1.03)	0.10	27	1.96 (1.13-3.41)	0.02	1.85 (1.08-3.15)	0.02	0.04
T1 (< 14.33)	30	0.71 (0.45-1.11)	0.13	0.74 (0.47-1.19)	0.21	12	4.26 (0.97-18.71)	0.06	4.83 (1.02-22.93)	0.03	
T2 (14.33-19.33)	33	0.67 (0.43-1.05)	0.08	0.67 (0.43-1.06)	0.09	12	3.37 (0.78-14.49)	0.10	3.73 (0.85-16.35)	0.08	
T3 (> 19.33)	43	1.00 (référence)	-	1.00 (référence)	-	3	1.00 (référence)	-	1.00 (référence)	-	
p de tendance linéaire			0.10		0.17			0.05		0.04	

[‡]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1: ajusté sur l'âge et le centre; modèle 2: modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac et l'activité physique.

p^a = p d'interaction du modèle 2.

ET : Ecart type (6,2 nmol/L) ; T: tertile de testostérone (seuil en nmol/L).

Tableau 18 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique défini par le NCEP: ATPIII et l'EGSIR[‡].

	Sans syndrome métabolique			Avec Syndrome métabolique			p ^a
		Modèle 1	Modèle 2		Modèle 1	Modèle 2	
Définitions du syndrome métabolique	Nombres de décès/total	HR (95% IC)	HR (95% IC)	Nombres de décès/total	HR (95% IC)	HR (95% IC)	
NCEP: ATPIII							
Pour la diminution d'un ET	146/397	0.87 (0.74-1.02)	0.90 (0.76-1.06)	20/47	3.07 (1.45-6.49)	2.99 (1.20-7.48)	< 0.01
EGSIR							
Pour la diminution d'un ET	137/385	0.85 (0.72-1.00)	0.89 (0.75-1.06)	29/59	1.79 (1.10-2.92)	1.47 (0.81-2.68)	< 0.01

[‡]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1: ajusté sur l'âge et le centre; modèle 2: modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac et l'activité physique.

p^a = p d'interaction du modèle 2.

ET : Ecart type (6,2 nmol/L).

4.4.2 Mortalité par causes spécifiques

L'étude du lien entre la testostérone endogène et le risque de mortalité par causes spécifiques a été conduite uniquement chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique. En effet, les résultats précédents ne nous permettaient pas, *a priori*, d'étudier les hommes dans leur ensemble. De plus, au vu du nombre faible de décès selon les causes chez les hommes présentant un syndrome métabolique ($n = 11$; $n = 9$ et $n = 16$ respectivement pour la mortalité d'origine cardiovasculaire, par cancers et par autres causes), nous n'avons pas pu tester formellement les interactions. En conséquence, nous avons fait le choix d'étudier la mortalité par causes spécifiques chez les hommes sains. Le tableau 19 présente donc les résultats des associations entre les niveaux de testostérone et le risque de mortalité cardiovasculaire, par cancers et par autres causes chez les hommes ne présentant pas un syndrome métabolique.

Chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique, 130 décès étaient survenus au total et aucun lien global entre la testostérone et la mortalité toutes causes n'a été retrouvé (modèle 2 : $HR = 0,85$; $95\%IC : 0,72-1,01$; Tableau 14). Parmi ces décès, 30 étaient d'origine cardiovasculaire, 45 par cancer et 55 par une autre cause. L'analyse en cause-spécifique n'a pas permis de mettre en évidence une association significative entre les niveaux de testostérone et le risque de mortalité par cancers et par autres causes et l'ajustement sur l'ensemble des facteurs de risque de mortalité ne modifiait pas ces résultats (Tableau 19). En revanche, l'analyse montrait une association linéaire et positive entre la testostérone endogène et la mortalité cardiovasculaire, indépendante de l'ensemble des facteurs d'ajustement (modèle 2 : $HR = 1,86$; $95\%IC : 1,28-2,72$). Cette association était également retrouvée lorsque la testostérone était prise en compte en tertile. Comparés aux hommes présentant les plus bas niveaux d'hormones, ceux appartenant au tertile supérieur étaient significativement à risque de mortalité cardiovasculaire (modèle 2 : $HR = 2,94$; $95\%IC : 1,16-7,43$, p de tendance linéaire $p = 0,04$).

Ces résultats font l'objet d'un article actuellement en cours de finalisation.

Tableau 19 : Testostérone totale et mortalité par causes spécifiques après 12 ans de suivi chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique[¶].

Testostérone totale (nmol/L)	Nombre de décès	Modèle 1 (n = 338)		Modèle 2 (n = 338)	
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Mortalité cardiovasculaire					
Pour l’augmentation d’un ET	30	1.61 (1.16-2.23)	< 0.01	1.86 (1.28-2.72)	< 0.01
T1 (< 14.95)	8	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T2 (14.95-19.98)	5	0.66 (0.23-1.85)	0.42	0.64 (0.22-1.90)	0.42
T3 (≥ 20.00)	17	2.29 (1.02-5.11)	0.04	2.94 (1.16-7.43)	0.02
p de tendance linéaire			0.02		0.04
Mortalité par cancers					
Pour l’augmentation d’un ET	45	1.05 (0.79-1.40)	0.74	1.00 (0.73-1.35)	0.98
T1 (< 14.95)	15	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T2 (14.95-19.98)	16	1.20 (0.62-2.33)	0.59	1.22 (0.61-2.43)	0.57
T3 (≥ 20.00)	14	1.00 (0.50-2.33)	0.99	0.79 (0.37-1.68)	0.54
p de tendance linéaire			0.96		0.55
Mortalité par autres causes					
Pour l’augmentation d’un ET	55	1.14 (0.87-1.49)	0.35	1.08 (0.80-1.46)	0.60
T1 (< 14.95)	20	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T2 (14.95-19.98)	18	0.77 (0.40-1.47)	0.43	0.73 (0.37-1.44)	0.36
T3 (≥ 20.00)	17	1.04 (0.55-1.96)	0.90	0.93 (0.46-1.85)	0.83
p de tendance linéaire			0.87		0.99

[¶]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1: ajusté sur l'âge et le centre; modèle 2: modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'IMC et l'activité physique.

ET : Ecart type ; T: tertile de testostérone (seuil en nmol/L).

4.5 Estradiol et mortalité

Dans cette partie, sont présentés les résultats des associations entre l'estradiol et la mortalité toutes causes en prenant en compte le statut génétique des récepteurs aux estrogènes ainsi que les liens entre l'estradiol et la mortalité par causes spécifiques. Ces résultats ont fait l'objet d'un article original accepté pour publication dans le Journal of Clinical Endocrinology.

4.5.1 Mortalité toutes causes : influence des caractéristiques génétiques

4.5.1.1 Distribution des polymorphismes génétiques

Le tableau 20 présente la distribution des polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes dans l'échantillon total et en fonction du statut vital et des concentrations d'estradiol. La distribution des fréquences génotypiques de chacun des polymorphismes des récepteurs aux estrogènes correspondait à celle attendue dans une population majoritairement caucasienne. De plus, pour chaque polymorphisme génétique, les fréquences génotypiques respectaient l'équilibre de Hardy Weinberg, puisque tous les tests comparant les fréquences alléliques théoriques à celles observées étaient non significatifs. Aucune association n'a été retrouvée entre les fréquences génotypiques et le statut vital après 12 ans de suivi. Enfin, aucun des polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes que nous avons étudiés n'était associé au niveau d'estradiol.

4.5.1.2 Polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes et risque de mortalité toutes causes

Le tableau 21 représente les associations marginales entre les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes et le risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi. Après correction de Bonferroni pour tests multiples, aucun des polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes étudié selon un modèle additif ou co-dominant n'était associé au risque de mortalité toutes causes.

Tableau 20 : Distribution des polymorphismes génétiques dans l'échantillon total et en fonction du statut vital et de la concentration en estradiol.

Récepteurs aux estrogènes	Echantillon de l'étude (n = 472)	HWE	Vivants (n = 289)	Décédés (n = 183)	p	T1 (< 15.36) (n = 157)	T2 (15.36-21.66) (n = 158)	T3 (≥ 21.67) (n = 157)	p de tendance
ESRα									
rs2234693 ^a									
CC	98 (21.9)		64 (23.4)	34 (19.5)		31 (20.8)	35 (23.2)	32 (21.6)	
CT	222 (49.6)	0.96	138 (50.4)	84 (48.3)	0.35	74 (49.7)	74 (40.0)	74 (50.0)	0.80
TT	128 (28.6)		72 (26.2)	56 (32.2)		44 (29.5)	42 (27.8)	42 (28.4)	
rs9340799 ^a									
AA	55 (12.3)		36 (13.3)	19 (10.7)		18 (12.2)	20 (13.4)	17 (11.3)	
AG	218 (48.7)	0.28	134 (49.4)	84 (47.5)	0.54	68 (46.3)	74 (49.3)	76 (50.3)	0.73
GG	175 (39.0)		101 (37.3)	74 (41.8)		61 (41.5)	56 (37.3)	58 (38.4)	
ESRβ									
rs1256049 ^b									
AA	2 (0.4)		2 (0.7)	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.7)	1 (0.7)	
AG	39 (8.5)	0.33	21 (7.6)	18 (9.9)	0.45	14 (9.3)	13 (8.4)	12 (7.9)	0.86
GG	416 (91.1)		253 (91.7)	163 (90.1)		137 (90.7)	141 (90.9)	138 (91.4)	
rs4986938 ^c									
AA	70 (15.5)		42 (15.3)	28 (15.8)		21 (14.1)	18 (11.9)	31 (20.5)	
AG	219 (48.6)	0.74	135 (49.3)	84 (47.5)	0.92	69 (46.3)	76 (50.3)	74 (49.0)	0.07
GG	162 (35.9)		97 (35.4)	65 (36.7)		59 (39.6)	57 (37.8)	46 (30.5)	
rs1271572 ^c									
GG	77 (17.0)		39 (14.2)	38 (21.5)		25 (16.6)	25 (16.3)	27 (18.4)	
GT	233 (51.7)	0.26	148 (54.0)	85 (48.0)	0.13	80 (52.9)	87 (56.9)	66 (44.9)	0.51
TT	141 (31.3)		87 (31.8)	54 (30.5)		46 (30.5)	41 (26.8)	54 (36.7)	

Données exprimées en n (%).

n = nombres; HWE: test de Hardy-Weinberg Equilibrium; T: tertile d'estradiol (seuil en pg/mL).

p du test de χ^2 .

Données manquantes: ^a n =24; ^b n =15; ^c n = 21.

Tableau 21: Association marginale entre les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes et la mortalité toutes causes après 12 ans de suivi [¥].

Récepteurs aux estrogènes	Nombre de décès	Modèle 1 (n = 472)			Modèle 2 (n = 472)		
		HR (95% IC)	p ^d	p ^e	HR (95% IC)	p ^d	p ^e
ESRα							
rs2234693 ^a							
CC	34	1.00 (référence)			1.00 (référence)		
CT	84	1.19 (0.80-1.76)	0.15	0.36	1.18 (0.79-1.75)	0.31	0.57
TT	56	1.35 (0.89-2.05)			1.25 (0.82-1.91)		
rs9340799 ^a							
AA	19	1.00 (référence)			1.00 (référence)		
AG	84	1.41 (0.86-2.32)	0.07	0.18	1.41 (0.85-2.34)	0.14	0.27
GG	74	1.60 (0.97-2.64)			1.52 (0.91-2.52)		
ESRβ							
rs1256049 ^b							
AA	0	-			-		
AA/AG	18	1.00 (référence)	-	-	1.00 (référence)	-	-
GG	163	0.78 (0.48-1.26)			1.12 (0.82-1.53)		
rs4986938 ^c							
AA	28	1.00 (référence)			1.00 (référence)		
AG	84	1.07 (0.71-1.63)	0.67	0.75	1.09 (0.72-1.66)	0.61	0.64
GG	65	0.95 (0.61-1.47)			0.94 (0.60-1.46)		
rs1271572 ^c							
GG	38	1.00 (référence)			1.00 (référence)		
GT	85	0.75 (0.52-1.10)	0.98	0.22	0.76 (0.52-1.12)	0.86	0.22
TT	54	0.95 (0.63-1.43)			0.99 (0.65-1.48)		

[¥]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1: ajusté sur l'âge et le centre; modèle 2: modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne, la consommation d'alcool et de tabac, l'hypertension et le diabète.

T = Tertile d'estradiol (seuils en pg/mL)

^d p du modèle additif; ^e p du modèle co-dominant. Les tests étaient considérés significatifs à $p \leq 0.005$ après correction de Bonferroni pour tenir compte des tests multiples: (0.05 divisé par 5×2 , correspondant au nombre de SNPs et de modèles génétiques testés).

Données manquantes: ^a n = 24; ^b n = 15; ^c n = 21.

4.5.1.3 Estradiol et risque de mortalité toutes causes

Dans un premier temps, les moyennes des niveaux d'estradiol des hommes à l'inclusion ont été comparées en fonction du statut vital à 12 ans de suivi (Tableau 10). Les niveaux d'estradiol étaient à la limite de la signification (au seuil $\alpha = 0,05$) entre les hommes non décédés et les décédés (18,9 (9,2) vs 20,8 (9,0) pg/mL respectivement, $p = 0,06$).

Ensuite, l'association entre le niveau d'estradiol et la mortalité toutes causes a été étudiée à l'aide d'un modèle de Cox (Tableau 22) qui a permis de mettre en évidence une relation quadratique significative entre l'estradiol et la mortalité toute cause (modèle 1 : p de la relation en U, $p = 0,02$). Comparé aux hommes avec des niveaux d'hormone intermédiaires (tertile 2), les sujets présentant des niveaux bas et élevés étaient plus à risque de mortalité toutes causes. L'ajustement sur les facteurs de confusion ne modifiait pas ce résultat (modèle 2, p de la relation en U, $p = 0,04$). Les analyses réalisées en utilisant la variable estradiol transformée en spline confirmaient l'écart significatif à la linéarité (modèle 2 : p de non linéarité $< 0,01$) et la représentation graphique de la relation était cohérente avec une relation quadratique (figure 14). L'association entre l'estradiol et la mortalité toutes causes était significative pour le tertile supérieur (modèle 2 : HR = 1.47; 95%IC : 1,02-2,10) ; elle ne l'était pas pour le tertile inférieur (modèle 2, HR = 1.32; 95%IC : 0,91-1,90), mais il n'existait pas de différence significative entre les risques de mortalité associés aux tertiles supérieur et inférieur (modèle 2, $p = 0,43$).

Tableau 22 : Estradiol et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi[¶].

Estradiol totale (pg/mL)	Modèle 1 (n = 472)			Modèle 2 (n = 472)	
	Nombre de décès	HR (95% IC)	p-value	HR (95% IC)	p
Mortalité toutes causes	183				
T1 (< 15.35)	57	1.34 (0.93-1.92)	0.11	1.32 (0.91-1.90)	0.14
T2 (15.35-21.66)	55	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T3 ($\geq$ 21.67)	71	1.53 (1.08-2.16)	0.02	1.47 (1.02-2.10)	0.04
p de la relation en U			0.02		0.04

[¶]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1: ajusté sur l'âge et le centre; modèle 2: modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, l'hypertension et le diabète.

T = Tertile d'estradiol (seuils en pg/mL).

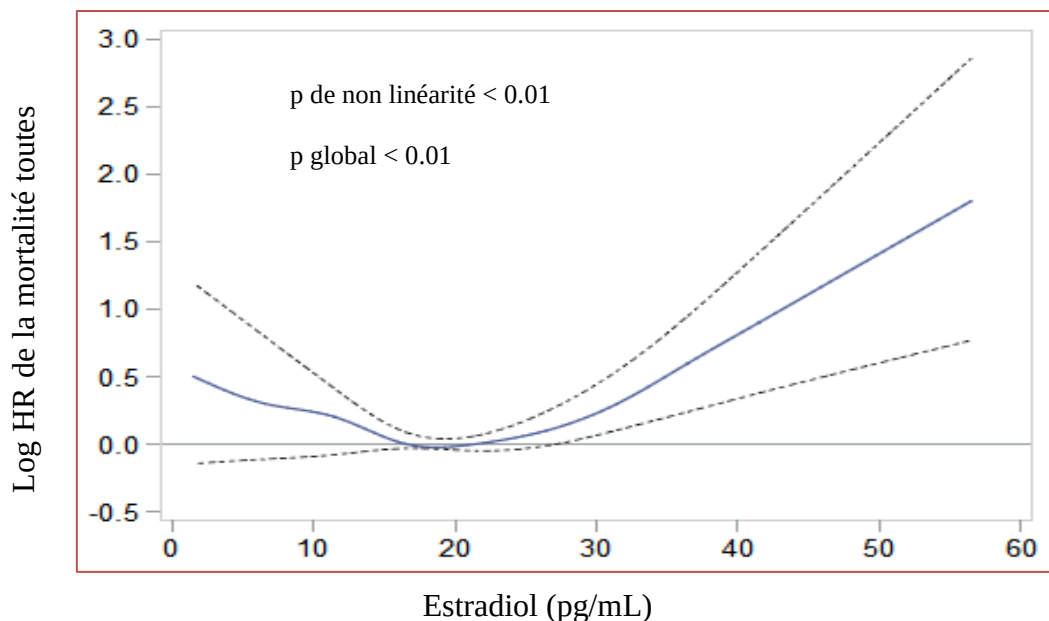


Figure 14: Relation entre les niveaux d'estradiol et le risque de mortalité toutes causes avec les splines cubiques (3 nœuds placés au 10^{ème}, 50^{ème}, et 90^{ème} percentile).

Remarque: Les risques estimés sont ajustés sur l'âge, le centre, les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, l'hypertension et le diabète.

La valeur de référence pour les logs du HR est la médiane d'estradiol (18,69 pg / mL); la ligne bleue continue correspond aux logs HR et les lignes en pointillés correspondent aux intervalles de confiance inférieur et supérieur à 95%.

4.5.1.4 Estradiol et mortalité toutes causes en fonction des polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes

Le tableau 23 montre l'association entre les tertiles d'estradiol et la mortalité toutes causes selon les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes ESR α et ESR β . Il n'y avait pas d'interactions significatives entre les niveaux d'estradiol et les polymorphismes génétiques sur la mortalité toutes causes quel que soit le modèle considéré (additif ou co-dominant). Le statut génétique des récepteurs aux estrogènes ne semblait donc pas modifier la relation entre les niveaux d'estradiol et la mortalité toutes causes.

Tableau 23 : Estradiol et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi en fonction des polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes[¥].

	Nombre de décès	HR (95% IC)	Nombre de décès	HR (95% IC)	Nombre de décès	HR (95% IC)	p ^d	p ^e
ESRα rs2234693^a		CC (n = 98)		CT (n = 222)		TT (n = 128)		
T1 (<15.35)	10	0.89 (0.32-2.48)	26	1.28 (0.74-2.22)	19	1.70 (0.86-3.36)	0.56	0.88
T2 (15.35-21.67)	12	1.00 (référence)	26	1.00 (référence)	15	1.00 (référence)		
T3 (≥21.66)	12	1.76 (0.67-4.66)	32	1.45 (0.84-2.50)	22	1.45 (0.73-2.87)		
p de la relation en U		0.60		0.21		0.14		
rs9340799^a		AA (n = 175)		AG (n = 218)		GG (n = 55)		
T1 (<15.35)	25	0.61 (0.34-1.12)	22	0.95 (0.53-1.72)	8	0.79 (0.17-3.60)	0.75	0.55
T2 (15.35-21.66)	21	1.00 (référence)	26	1.00 (référence)	6	1.00 (référence)		
T3 (≥21.67)	28	0.94 (0.53-1.65)	36	1.42 (0.83-2.43)	5	0.95 (0.19-4.67)		
p de la relation en U		0.08		0.32		0.75		
ESRβ rs1256049^b		AA (n = 2)		AG (n = 39)		GG (n = 416)		
T1 (<15.35)	0	NA	5	1.10 (0.22-5.48)	51	1.30 (0.88-1.92)	0.95	0.92
T2 (15.35-21.66)	0	NA	6	1.00 (référence)	49	1.00 (référence)		
T3 (≥21.67)	0	NA	7	1.52 (0.44-5.26)	63	1.35 (0.91-2.00)		
p de la relation en U		NA		0.68		0.08		
rs4986938^c		AA (n = 70)		AG (n = 219)		GG (n = 162)		
T1 (<15.35)	10	5.83 (0.97-35.06)	26	1.73 (1.00-3.01)	19	0.94 (0.50-1.76)	0.35	0.39
T2 (15.35-21.66)	3	1.00 (référence)	26	1.00 (référence)	23	1.00 (référence)		
T3 (≥21.67)	15	6.27 (1.20-32.82)	32	1.37 (0.77-2.42)	23	1.78 (0.98-3.22)		
p de la relation en U		0.03		0.04		0.31		
rs1271572^c		GG (n = 141)		GT (n = 233)		TT (n = 77)		
T1 (<15.35)	17	1.46 (0.63-3.39)	28	1.35 (0.80-2.29)	11	1.55 (0.58-4.13)	0.79	0.85
T2 (15.35-21.66)	10	1.00 (référence)	32	1.00 (référence)	11	1.00 (référence)		
T3 (≥21.67)	27	1.86 (0.83-4.16)	25	1.24 (0.69-2.23)	16	1.96 (0.83-4.61)		
p de la relation en U		0.15		0.31		0.18		

[¥]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1: ajusté sur l'âge et le centre; modèle 2: modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, l'hypertension et le diabète.

T = Tertile d'estradiol (seuils en pg/mL); ^d = interaction pour le modèle additif model; ^e = interaction le modèle co-dominant. Données manquantes: ^a n =24; ^b n =15; ^c n = 21.

4.5.1.5 Modèle cas-seuls d'interaction gènes-estradiol

Les analyses du modèle d'interaction cas-seuls (Tableau 24) n'avait pas permis non plus de conclure à la possibilité d'un effet modificateur du statut génétique des récepteurs aux estrogènes sur la relation entre l'estradiol et la mortalité toutes causes chez les hommes. Chez les cas (les hommes décédés), aucune association n'a été trouvée entre les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes et les tertiles d'estradiol ($p > 0,05$ pour tous les polymorphismes génétiques). L'hypothèse d'indépendance entre le statut génétique et les niveaux d'estradiol a été vérifiée chez les témoins (les hommes vivants) et a montré qu'aucun polymorphisme n'était associé aux niveaux d'estradiol chez les témoins ($p > 0,05$ pour tous les polymorphismes génétiques).

Tableau 24 : Comparaison entre les niveaux d'estradiol et les polymorphismes des récepteurs aux estrogènes selon le statut vital après 12 ans[¥].

	Cas (n = 189)				Témoins (n = 283)			
Récepteurs aux estrogènes	T1 (n = 57) (< 15.36)	T2 (n = 55) (15.36-21.67)	T3 (n = 71) (≥ 21.67)	p	T1 (n = 94) (< 15.36)	T2 (n = 98) (15.36-21.67)	T3 (n = 82) (≥ 21.67)	p
ESRα								
rs2234693 ^a				0.94				0.98
CC	10 (18.2)	12 (22.6)	12 (18.2)		21 (22.3)	23 (23.5)	20 (24.4)	
CT	26 (47.3)	26 (49.1)	32 (48.5)		48 (51.1)	48 (49.0)	42 (51.2)	
TT	19 (34.5)	15 (28.3)	22 (33.3)		25 (26.6)	27 (27.5)	20 (24.4)	
rs9340799 ^a				0.59				0.94
AA	25 (45.5)	21 (39.6)	28 (40.6)		36 (39.1)	35 (36.1)	30 (36.6)	
AG	22 (40.0)	26 (49.0)	36 (52.2)		46 (50.0)	48 (49.5)	40 (48.8)	
GG	8 (14.5)	6 (11.4)	5 (7.3)		10 (10.9)	14 (14.4)	12 (14.6)	
ESRβ								
rs1256049 ^b				0.95				0.80
AA	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (1.0)	1 (1.2)	
AG	5 (8.9)	6 (10.9)	7 (10.0)		9 (9.5)	7 (7.0)	5 (6.2)	
GG	51 (91.1)	49 (89.1)	63 (90.0)		86 (90.5)	92 (92.0)	75 (92.6)	
rs4986938 ^c				0.19				0.32
AA	10 (18.2)	3 (5.8)	15 (21.4)		11 (11.7)	15 (15.2)	16 (19.8)	
AG	26 (47.3)	26 (50.0)	32 (45.7)		43 (45.7)	50 (50.5)	42 (51.9)	
GG	19 (34.6)	23 (44.2)	23 (32.9)		40 (42.6)	34 (34.3)	23 (28.3)	
rs1271572 ^c				0.10				0.98
GG	17 (30.4)	10 (18.9)	27 (39.7)		29 (30.5)	31 (31.0)	27 (34.2)	
GT	28 (50.0)	32 (60.4)	25 (36.8)		52 (54.7)	55 (55.0)	41 (51.9)	
TT	11 (19.6)	11 (20.7)	16 (23.5)		14 (14.8)	14 (14.0)	11 (13.9)	

T: tertile d'estradiol (seuils en pg/mL).

p pour le test de Chi².

Données manquantes: ^a n = 24; ^b n = 15; ^c n = 21.

4.5.1.6 Analyses de sensibilité

Dans les analyses de sensibilité, nous avons exclu les hommes qui sont décédés au cours des quatre premières années de suivi (n = 41) et stratifié les analyses en fonction de l'âge médian de l'échantillon d'étude. Ces analyses ont conduit à des résultats très similaires (tableau 25).

Tableau 25 : Estradiol et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi, après suppression des décès survenus les 4 premières années de suivi [¥].

Estradiol totale (pg/mL)	Nombre de décès	Modèle 1 (n = 431)		Modèle 2 (n = 431)	
		HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p
Mortalité toutes causes	144				
T1 (< 15.35)	42	1.37 (0.90-2.08)	0.14	1.35 (0.89-2.06)	0.16
T2 (15.35-21.66)	42	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T3 (≥ 21.67)	60	1.67 (1.14-2.46)	< 0.01	1.62 (1.08-2.43)	0.02
p de la relation en U			0.02		0.03

[¥]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1: ajusté sur l'âge et le centre; modèle 2: modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, l'hypertension et le diabète.

T = Tertile d'estradiol (seuils en pg/mL).

4.5.2 Mortalité par causes spécifiques

Le tableau 26 présente le lien entre les niveaux d'estradiol et le risque de mortalité par causes spécifiques. Dans l'échantillon totale, 44 décès étaient d'origine cardiovasculaire, 57 étaient dus à un cancer et 82 à une autre cause. Cette analyse a permis de mettre en évidence que le profil d'association des niveaux d'estradiol avec le risque de mortalité dépendait de la cause du décès (hétérogénéité $p < 0,05$). Il n'existait pas d'association significative des niveaux d'estradiol avec le risque de mortalité par cancer et autre cause. En revanche, une relation quadratique, plus marquée que celle observée pour la mortalité toutes causes, a été mise en évidence pour la mortalité cardiovasculaire (modèle 2 : p de la relation en U = 0,01). Il existait une forte association significative pour le tertile supérieur comparé au tertile intermédiaire (modèle 2 : HR = 3,23 ; 95%IC : 1,48-7,07); l'association n'était pas significative pour le tertile inférieur comparé au tertile intermédiaire (modèle 2 : HR = 1,96 ; 95%IC : 0,85-4.50), mais il n'y avait pas de différence significative entre les tertiles supérieur

et inférieur (modèle 2 : $p = 0,16$). La représentation graphique de la relation avec l'estradiol transformé en spline était cohérente avec une relation quadratique (figure 15).

Tableau 26 : Estradiol et mortalité par causes spécifique après 12 ans de suivi[‡].

Estradiol totale (pg/mL)	Nombre de décès	Modèle 1 (n = 472)		Modèle 2 (n = 472)	
		HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p
Mortalité cardiovasculaire	44				
T1 (< 15.35)	12	1.89 (0.83-4.29)	0.13	1.96 (0.85-4.50)	0.11
T2 (15.35-21.66)	10	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T3 ($\geq$ 21.67)	22	2.89 (1.36-6.13)	0.01	3.23 (1.48-7.07)	< 0.01
P de la relation en U			0.02		0.01
Mortalité par cancers	57				
T1 (< 15.35)	16	0.88 (0.46-1.67)	0.69	0.86 (0.45-1.63)	0.64
T2 (15.35-21.66)	18	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T3 ($\geq$ 21.67)	23	1.32 (0.74-2.35)	0.35	1.11 (0.61-2.03)	0.74
p de la relation en U			0.79		0.92
Mortalité par autres causes	82				
T1 (< 15.35)	30	1.53 (0.91-2.59)	0.11	1.57 (0.92-2.67)	0.10
T2 (15.35-21.66)	26	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T3 ($\geq$ 21.67)	26	1.20 (0.70-2.06)	0.50	1.22 (0.69-2.15)	0.50
p de la relation en U			0.20		0.19

[‡]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimés par un modèle de Cox pondéré par IPW. Modèle 1: ajusté sur l'âge et le centre; modèle 2: modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, l'hypertension et le diabète.

T = Tertile d'estradiol (seuils en pg/mL).

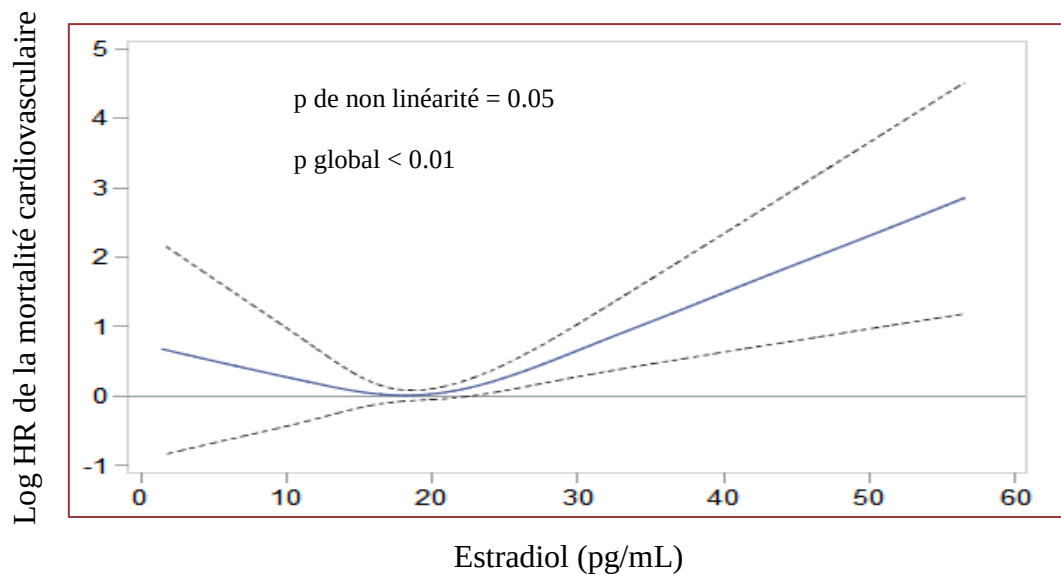


Figure 15 : Relation entre les niveaux d'estradiol et le risque de mortalité cardiovasculaire avec les splines cubiques (3 nœuds placés au 10^{ème}, 50^{ème}, et 90^{ème} percentile).

Remarque: Les risques estimés sont ajustés sur l'âge, le centre, les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, l'hypertension et le diabète. La valeur de référence pour les logs du HR est la médiane d'estradiol (18,69 pg / mL); la ligne bleue continue correspond aux logs HR et les lignes en pointillés correspondent aux intervalles de confiance inférieur et supérieur à 95%.

5. Discussion

Cette thèse s'est attachée à évaluer l'association entre les niveaux d'hormones sexuelles et le risque de mortalité toutes causes et par causes spécifiques après 12 ans de suivi à partir d'un échantillon de 473 hommes âgés de plus de 65 ans au sein de la cohorte prospective 3C. Il a été en particulier étudié l'influence du contexte clinique et génétique sur ces relations. L'objectif de ce travail était de tenter de comprendre et d'expliquer, au moins en partie, la divergence des résultats de la littérature publiés depuis plusieurs années.

5.1 Testostérone

Dans une première partie de cette thèse, nous avons évalué le risque de mortalité en relation avec les niveaux de testostérone endogène.

5.1.1 Synthèse des principaux résultats

Tout d'abord, nous avons étudié l'association entre les concentrations de testostérone et le risque de mortalité toutes causes. Globalement, aucun lien significatif n'a été mis en évidence entre les niveaux de testostérone et la mortalité toutes causes après un suivi de 12 ans. Cependant, il existait une interaction significative entre les niveaux de testostérone et la présence d'un syndrome métabolique défini par les critères de l'IDF sur le risque de mortalité toutes causes. Une analyse stratifiée sur le syndrome métabolique n'a montré aucun lien significatif entre les concentrations d'hormone endogène et le risque de mortalité chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique. En revanche, il a été mis en évidence que la diminution d'un écart-type des niveaux de testostérone (6,2 nmol/l) était significativement associée à une augmentation de 80 % du risque de mortalité toutes causes chez les hommes souffrant d'un syndrome métabolique et cette association persistait après la prise en compte des facteurs de confusion. Des résultats similaires étaient retrouvés en utilisant deux autres définitions du syndrome métabolique et en analysant séparément l'influence des différents composants individuels de ce phénotype clinique. Enfin, la mise en œuvre d'un modèle d'interaction avec médiation a permis de suggérer que le syndrome métabolique jouait, en plus d'un effet modificateur, un rôle de médiateur dans la relation entre la testostérone et la mortalité.

Dans une seconde étape, nous avons étudié les associations entre la testostérone et la mortalité avec la prise en compte des causes de décès. Au vu des résultats précédents et du nombre de décès dans le sous-groupe des hommes présentant un syndrome métabolique ($n = 11$; $n = 9$ et $n = 16$ respectivement pour la mortalité cardiovasculaire, par cancer et par autres causes), nous n'avons pas pu formellement tester d'interaction entre la testostérone et le syndrome métabolique sur les différentes causes de décès et nous avons donc centré cette analyse sur le sous-groupe des hommes considérés comme sains. Aucune association n'a été mise en évidence entre les niveaux d'hormone et le risque de mortalité par cancers et par autres causes. En revanche, nous avons trouvé que la mortalité cardiovasculaire à 12 ans était

significativement augmentée chez les hommes présentant les niveaux les plus hauts de testostérone. De plus, cette association était indépendante des facteurs de confusion, en particulier des facteurs de risque cardiovasculaire.

5.1.2 Données antérieures

A notre connaissance, l'étude 3C est la première à avoir permis de mettre en évidence une interaction significative entre la testostérone et la présence du syndrome métabolique sur la mortalité toutes causes chez des hommes vieillissants. En revanche, le profil d'association différentiel entre les niveaux d'hormone et la mortalité toutes causes en fonction du syndrome métabolique était en accord avec certaines données antérieures.

S'agissant des résultats mis en évidence dans le sous-groupe des hommes présentant un syndrome métabolique, l'association inverse observée entre la testostérone et la mortalité était cohérente avec des résultats antérieurs. En particulier, dans une étude de cohorte de 596 hommes âgés de 40 ans ou plus dont 187 sujets (31,4 %) présentaient un syndrome métabolique à l'inclusion, les niveaux bas de testostérone étaient associés à un risque accru de décès toutes causes uniquement dans ce sous-groupe, alors qu'il n'y avait aucune relation chez les hommes sains ; cependant, l'interaction n'était pas statistiquement significative dans cette étude [75]. Nos données chez les hommes présentant un syndrome métabolique étaient également cohérentes avec certains résultats, notamment ceux d'études menées dans des populations présentant des prévalences importantes d'un ou de plusieurs composants du syndrome métabolique. En effet, des associations inverses entre la testostérone et la mortalité ont été mises en évidence dans des études conduites chez des hommes atteints de diabète de type 2 [73, 140], mais également dans des populations d'hommes présentant une forte prévalence de dyslipidémie [71], d'hypertension [62] et un IMC élevé [60]. Enfin, il était possible de rapprocher nos résultats d'une étude portant sur la testostérone exogène où la réduction de la mortalité en réponse à une supplémentation en testostérone était limitée aux hommes diabétiques [141].

D'autre part, l'absence d'association entre la testostérone et le risque de mortalité que nous avons trouvée chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique étaient en accord avec les résultats de plusieurs études réalisées chez des hommes en meilleure santé ou

présentant une faible prévalence de diabète et d'hypertension [66-68]. En effet, ces études faisaient partie de celles dans lesquelles aucune relation n'avait été mise en évidence entre les concentrations de testostérone et le risque de mortalité toutes causes chez les hommes.

En revanche, nos résultats se montraient contradictoires avec certaines données antérieures. La phase II du « Fremantle Diabetes Study », menée auprès de 788 hommes diabétiques, avait permis de montrer une association quadratique entre la testostérone totale et la mortalité toutes causes [142]. En outre, une récente étude de cohorte prospective portant sur 531 hommes atteints de diabète n'avait pas détecté de relation entre la testostérone totale et le risque de décès [143]. Plusieurs différences entre ces études et la cohorte 3C pouvaient expliquer la divergence de ces résultats. D'une part, les sujets inclus dans ces études étaient plus jeunes que ceux de la cohorte des Trois Cités et d'origine hospitalière. D'autre part, les méthodes de dosage de la testostérone différaient et enfin, les durées de suivi et les variables d'ajustement n'étaient pas les mêmes.

S'agissant de nos résultats concernant l'association entre la testostérone et le risque de mortalité par causes spécifiques, les résultats de la littérature sont encore contradictoires. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que les taux élevés de testostérone étaient associés à une augmentation du risque de décès d'origine cardiovasculaire. Nos résultats sont cohérents avec l'étude du Massachusetts Male Aging Study montrant une association entre des niveaux élevés de testostérone libre et un risque accru de mortalité par cardiopathie ischémique [86]. Deux autres études récentes chez des personnes âgées ont montré une association en forme de U ou de J, avec de faibles taux de testostérone associées à un risque accru, et une augmentation graduelle du risque de mortalité par maladie cardiovasculaire lorsque les concentrations de testostérone se situaient à l'extrémité supérieure de la plage optimale et bien au-dessus [71, 144]. En outre, des niveaux élevés de testostérone endogène étaient également liés à un risque accru de coronaropathie chez les hommes âgés dans l'Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) study [145]. Enfin, nos résultats peuvent être rapprochés de ceux d'un essai clinique chez des hommes âgés de 65 ans et plus qui a rapporté un excès d'événements cardiovasculaires indésirables dans le groupe traité par un gel de testostérone comparé au groupe recevant le placebo. Cet essai a d'ailleurs été stoppé en raison du taux élevé d'effets indésirables [146]. Globalement, une récente méta-analyse de 27 essais randomisés portant sur 2 994 hommes a également conclu à un risque élevé d'événements cardiovasculaires dans les groupes testostérone comparés aux groupes placebo [147].

En revanche, nos résultats étaient contradictoires avec certaines données antérieures. Plusieurs études avaient montré que des taux bas de testostérone étaient associés à un risque accru d'événements cardiovasculaires [84, 148, 149]. Plusieurs différences entre ces études et la cohorte 3C pouvaient expliquer la divergence de ces résultats. D'une part, les sujets inclus dans notre analyse qui était limitée au sous-groupe des hommes ne présentant pas de syndrome métabolique avaient par définition moins de comorbidité que ceux des autres études dans lesquelles aucune sélection à l'inclusion n'était faite. D'autre part, les durées de suivi de ces études étaient courtes (entre 3 et 5 ans), pouvant entraîner un biais de causalité inverse qui était beaucoup moins vraisemblable dans 3C dont le délai de suivi était plus long (12 ans).

Nos résultats divergeaient également des données ne montrant aucune association entre les taux de testostérone et la mortalité cardiovasculaire [65, 67, 150]. Outre un manque de puissance potentielle de ces investigations, la différence majeure qui pourrait expliquer les divergences de ces résultats avec les nôtres repose sur l'âge des sujets qui étaient plus jeunes que dans 3C. En effet, l'étude de Smith et al. portait sur des hommes âgés de 45 à 59 ans et celles de Vikan et al. et Srinath et al. avaient inclus respectivement des hommes âgés en moyenne de 66 et 63 ans.

S'agissant de nos résultats concernant l'association entre la testostérone et le risque de mortalité par cancers, les résultats de la littérature sont, là encore, contradictoires. Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence une association entre les taux de testostérone et le risque de mortalité par cancers, ce qui était cohérent avec les résultats de trois études de cohorte prospective [62, 72, 86].

En revanche, nos résultats n'étaient pas en accord avec certaines études qui montraient une association inverse entre les taux de testostérone et le risque de mortalité par cancers. Deux d'entre elles avaient mis en évidence une association entre des taux bas de testostérone et la mortalité par cancers, [61, 85] et des données récentes ont suggéré que les hommes dont les niveaux de testostérone diminuaient progressivement avaient un risque accru de décès par cancers [88]. Outre le manque de puissance qui existe dans notre analyse sur la mortalité par causes spécifiques, le statut tabagique pourrait également expliquer les divergences de nos résultats. En effet, le tabagisme actif représente un important facteur de confusion dans la relation entre la testostérone et la mortalité par cancers, notamment dans les cancers aéro-pharyngés qui représentent l'une des familles de cancers les plus prévalents chez les hommes.

En effet, il est bien connu que le tabagisme augmente le risque de ce type de cancers et certaines études ont montré un lien entre le nombre de paquets de cigarettes et les niveaux de testostérone [151]. Dans notre étude, le peu de sujets fumant à l'inclusion pourrait expliquer en partie cette absence d'association.

5.1.3 Interprétation des résultats

Le rôle de la testostérone dans la mortalité chez les hommes a été évoqué depuis de nombreuses années mais reste encore aujourd'hui très débattu. Les premières études ont montré que les niveaux bas de testostérone étaient associés à une augmentation du risque de mortalité chez les hommes au cours du vieillissement. Plus récemment une association non linéaire a été suggérée, avec des niveaux de testostérone optimale. Analysés globalement dans une méta-analyse, ces résultats demeurent encore contradictoires. Une lecture plus approfondie de la littérature nous a menés à émettre l'hypothèse que ces incohérences pourraient reposer d'une part sur des différences dans les caractéristiques cliniques des sujets analysés et d'autre part sur les causes de décès. A partir des données de l'étude 3C, nous avons montré le rôle modulateur du syndrome métabolique sur la relation entre la testostérone et la mortalité toutes causes et des associations différentielles de l'hormone avec les causes spécifiques de mortalité.

Globalement, nos résultats sont issus d'une étude d'observation et nécessitent donc une grande prudence dans leur interprétation causale, en particulier car nous n'avons pas pu examiner la temporalité de la relation entre la testostérone et le syndrome métabolique à l'inclusion. Néanmoins, nos résultats sont compatibles avec l'hypothèse que l'effet des bas niveaux de testostérone sur la mortalité toutes causes soit en partie médié par le syndrome métabolique et par son interaction avec l'hormone. Les niveaux bas de testostérone pourraient exercer un effet négatif sur les différents paramètres qui définissent le syndrome métabolique et les multi-composants de ce phénotype pourraient agir en synergie et avoir un impact causal sur le risque de mortalité [152]. Cependant, des ajustements supplémentaires sur les différents facteurs constituant le syndrome métabolique (l'IMC ou le tour de taille, l'hypercholestérolémie, l'hypertension et le diabète) n'avaient pas d'impact significatif et menaient à des résultats similaires de ceux obtenus dans les analyses principales conduites chez les hommes présentant un syndrome métabolique (Tableau 34, Annexe C). Néanmoins,

nous ne pouvons pas exclure que cette association ait pu s'expliquer par d'autres facteurs de risque qui n'avaient pas été évalués dans l'étude 3C.

Le potentiel rôle causal de la testostérone sur la mortalité a également été étudié par une approche de randomisation mendélienne. Une étude a conclu qu'il n'y avait aucune preuve solide en faveur d'une association causale de la testostérone avec des facteurs de risque cardio-métabolique et la mortalité [153]. Cependant, cette étude était limitée en termes de puissance statistique en raison de la petite taille de l'échantillon et les auteurs ont utilisé un marqueur indirect de la testostérone. Inversement, dans une autre étude récente de randomisation mendélienne présentant une taille d'échantillon plus importante, l'hormone anti-Müllérienne et le syndrome de dysgénésie testiculaire génétiquement prédits, tous deux liés à de bas niveaux d'androgènes chez les hommes, étaient négativement associés aux cardiopathies ischémiques [154].

A côté de ces potentiels effets causaux, il est également possible que des taux bas de testostérone ne jouent pas un rôle causal dans le lien avec la mortalité chez les sujets présentant un syndrome métabolique. Dans ce cas, ils pourraient être le marqueur d'une affection sous-jacente plutôt qu'un facteur contribuant directement à la mortalité et refléter simplement un état de santé altéré. Il est aujourd'hui bien connu que les niveaux bas de testostérone représentent un biomarqueur de mauvaise santé chez les hommes âgés, car ils sont souvent associés à des pathologies médicales aiguës et/ou chroniques [3, 155, 156]. La testostérone pourrait agir comme un biomarqueur de maladie, semblable à d'autres hormones telles que l'hormone thyroïdienne dont les taux diminuent avec la sévérité de la maladie et qui pourrait ainsi prédire la mortalité [157, 158]. Différents mécanismes, notamment un état inflammatoire chronique, pourraient aussi être impliqués dans ces phénomènes mais, dans notre échantillon d'étude, nous n'avons pas de données sur les paramètres de l'inflammation et notamment sur des cytokines pro-inflammatoires étroitement liées à l'obésité. L'impact négatif des niveaux bas de testostérone pourrait également être médié par des symptômes dépressifs ou une altération de la fonction cognitive. Néanmoins, des ajustements additionnels sur l'état de dépression (en utilisant l'échelle du Center for Epidemiologic Studies – Depression) et sur le déclin cognitif (en utilisant l'échelle du MMSE) ne modifiaient nos résultats (Tableau 35, Annexe C). Enfin, la prise en compte de l'estradiol, qui est un des métabolites les plus actifs de la testostérone, ne modifiait pas non plus les résultats, suggérant que l'estradiol ne médiait pas l'association de la testostérone avec la mortalité.

L'interprétation de nos résultats concernant l'augmentation de risque de mortalité cardiovasculaire en relation avec les taux les plus hauts de testostérone demeure aujourd'hui très incertaine et en grande partie spéculative. Comme nous l'avons rappelé précédemment, la plupart des résultats antérieurs sur les plans cliniques et biologiques seraient plutôt en faveur d'un impact délétère des niveaux bas de testostérone, y compris sur les événements cardiovasculaire [154]. En effet, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer un effet délétère de l'hypogonadisme sur le système vasculaire [42] et ces hypothèses pourraient en partie être confortées par des travaux montrant qu'une supplémentation en testostérone chez des hommes hypogonadiques pourrait rétablir un profil cardiovasculaire favorable [159, 160]. Pourtant, des taux élevés de testostérone pourraient également être impliqués dans la survenue de la mortalité d'origine cardiovasculaire, comme le suggère nos résultats chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique. En effet, la testostérone pourrait favoriser la rétention hydro-sodée chez les hommes au cours du vieillissement et ce mécanisme pourrait contribuer au développement d'une hypertension artérielle et d'une insuffisance cardiaque [161]. De plus, l'utilisation de stéroïdes anabolisants a été associée à l'hypertrophie ventriculaire gauche [162], et ainsi augmenter le risque de mortalité d'origine cardiovasculaire.

Ces résultats feront également l'objet d'une discussion en regard des biais inhérents à l'étude conjointement avec les données sur l'estradiol dans la partie « Limites » de ce manuscrit (partie 5.3.2).

5.2 Estradiol

Dans une seconde partie de cette thèse, nous avons évalué le risque de mortalité en relation avec les niveaux d'estradiol endogène.

5.2.1 Synthèse des principaux résultats

Tout d'abord, nous avons étudié la relation entre les niveaux d'estradiol endogène et le risque de mortalité toutes causes chez les hommes de notre échantillon. Globalement, nous avons mis en évidence une relation quadratique entre les niveaux d'estradiol et la mortalité toutes causes à 12 ans. Les bas et les hauts niveaux d'estradiol étaient associés à une augmentation du risque de mortalité toutes causes à 12 ans, comparés aux niveaux intermédiaires. Cette relation était indépendante des facteurs de confusion.

Dans un second temps, cette relation a été étudiée en tenant compte du statut génétique des récepteurs aux estrogènes. Une analyse d'interaction « classique » et la mise en œuvre d'une analyse « cas-seuls » n'ont pas montré d'influence des polymorphismes génétiques étudiés sur l'association de l'estradiol avec la mortalité toutes causes chez les hommes.

Enfin, nous avons évalué la relation entre les concentrations d'estradiol endogène et le risque de mortalité en prenant en compte l'origine des décès. Cette analyse par causes spécifiques n'a montré aucun lien entre les niveaux plasmatique d'estradiol et la mortalité par cancers ou par autres causes. En revanche, nous avons mis en évidence une relation quadratique très marquée pour la mortalité d'origine cardiovasculaire, et ce, indépendamment de la prise en compte des facteurs de confusion, notamment des facteurs de risque cardiovasculaire.

5.2.2 Données antérieures

À notre connaissance, notre étude a été la première à avoir montré une association quadratique significative de l'estradiol avec la mortalité toutes causes qui se retrouvait renforcée dans une analyse portant exclusivement sur la mortalité cardiovasculaire chez les hommes âgés dans la population générale. Globalement, les données de la littérature concernant le rôle de l'estradiol sur la santé des hommes sont encore très parcellaires.

Néanmoins, les résultats de nos travaux peuvent être analysés en regard de certaines études antérieures.

Tout d'abord, nos résultats en faveur d'un niveau d'estradiol optimal pour la mortalité toutes causes et d'origine cardiovasculaire étaient consistants avec ceux publiés dans une précédente étude portant sur des hommes atteints d'insuffisance cardiaque et qui montraient une augmentation de la mortalité toutes causes chez les sujets présentant des concentrations faibles et élevées d'estradiol, comparés aux individus dont les niveaux d'hormone étaient intermédiaires [163]. En outre, nos données étaient à rapprocher, même plus indirectement, des études ayant montré individuellement que des niveaux bas ou élevés d'estradiol étaient associés à un risque augmenté de mortalité toutes causes chez les hommes. Au cours de ces 10 dernières années, de faibles concentrations d'estradiol ou une diminution de ses niveaux plasmatiques ont été reliées à un risque accru de mortalité toutes causes et d'origine cardiovasculaire [64, 88]. Récemment, Hsu et al. ont également mis en évidence que la diminution des taux d'hormone était associée à une augmentation du risque de mortalité cardiovasculaire et l'étude du Framingham Heart Study a rapporté que de faibles taux d'estradiol augmentaient le risque de fibrillation auriculaire [88, 164]. S'agissant des taux élevés d'hormone, d'autres études ont montré que les hommes décédés, quelle qu'en soit la cause, présentaient en moyenne des niveaux d'estradiol endogènes plus élevés que les sujets vivants [66, 72] et une étude prospective a mis en évidence que des taux élevés d'estradiol endogène prédisaient la survenue d'AVC incident chez les hommes [165]. Enfin, notre résultat est cohérent avec une étude sur l'estradiol exogène dans laquelle un excès de risque de maladie coronarienne a été observé chez les hommes recevant de l'estradiol par voie orale en prévention secondaire du risque cardiovasculaire [166].

A contrario, nos données étaient en contradiction avec plusieurs études qui n'avaient rapporté aucune association entre les niveaux d'estradiol endogène et le risque de mortalité toutes causes chez les hommes [67, 68, 71, 96]. De plus, une méta-analyse a conclu à l'absence d'association entre les niveaux d'estradiol endogène et le risque cardiovasculaire chez les hommes [167]. Il est intéressant de noter que les résultats non conclusifs ont tendance à être plus fréquemment observés dans des études ayant inclus des hommes jeunes [67, 68, 96] que dans celles dont la moyenne d'âge était plus élevée. [71]. En effet, le faible taux de mortalité dans les populations jeunes pourrait entraîner un manque de puissance expliquant la non-signification des résultats.

Dans notre étude, nous n'avons trouvé aucune association entre l'estradiol et la mortalité par cancers, ce qui était cohérent avec les résultats de Chan et al. [102], Daniels et al. [101] et Menke et al. [68]. A notre connaissance, aucune étude n'avait montré une association entre les niveaux d'estradiol et la mortalité par cancers chez les hommes. Néanmoins, des études par type de cancers ont mis en évidence une association positive entre les niveaux d'estradiol et le risque de cancer de la prostate [103] et du sein chez l'homme [104]. Nous ne pouvions donc pas exclure l'hypothèse que nos résultats auraient été différents en tenant compte du type de cancers. Cependant, il y avait trop peu de cas pour effectuer une analyse spécifique par types de pathologies malignes.

S'agissant du statut génétique des récepteurs aux estrogènes, plusieurs études ont évalué le lien direct entre des polymorphismes génétiques et différentes comorbidités chez les hommes et certains allèles ont été montrés comme associés à des pathologies spécifiques, telles les maladies cardiovasculaires [97, 99, 168-171]. Cependant, aucune étude antérieure n'avait eu pour but d'évaluer le potentiel effet modificateur du statut génétique des récepteurs aux estrogènes sur l'association de l'estradiol endogène avec des événements de santé chez les hommes. Cette influence a en revanche été mise en évidence chez les femmes dans plusieurs pathologies estrogéno-dépendantes dont les maladies artérielles ischémiques et les cancers du sein [98, 100]. A partir de notre échantillon, aucun lien direct n'a été retrouvé entre les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes et le risque de mortalité chez les hommes ; de même, nos résultats ne supportaient pas l'hypothèse d'un lien différentiel de l'estradiol avec la mortalité en fonction du statut génétique des récepteurs aux estrogènes chez les hommes.

5.2.3 Interprétations des résultats

Similairement aux données sur la testostérone, nos résultats concernant l'estradiol sont issus d'une étude d'observation et nécessitent donc d'être interprétés avec prudence. Néanmoins, plusieurs mécanismes biologiques pourraient expliquer l'association de l'estradiol avec la mortalité cardiovasculaire.

Tout d'abord, il est possible que les niveaux à la fois élevés et bas d'estradiol endogène puissent être associés à un profil délétère des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels tels que l'obésité, le diabète et l'hypercholestérolémie. En effet, il a été montré qu'un état de carence estrogénique, telle que la déficience congénitale en aromatase, était associé à une

altération du métabolisme glucido-lipidique [172]. De plus, d'autres études ont rapporté que les hommes obèses avaient des niveaux d'estradiol total et libre plus élevés que les hommes non obèses, ce qui était en accord avec une activité accrue de l'aromatase adipocytaire dans le tissu adipeux [173, 174]. Cependant, dans notre analyse, l'ajustement sur le diabète n'atténuait pas l'association entre l'estradiol et la mortalité toutes causes et renforçait même la relation avec la mortalité cardiovasculaire. L'hypercholestérolémie et une augmentation de l'IMC n'étaient pas incluses dans le modèle final, car ils n'étaient pas fortement associés à l'estradiol dans notre étude, mais un ajustement supplémentaire sur ces variables ne modifiait pas les résultats (Tableau 36, Annexe D). Force est de reconnaître malgré tout que l'hypothèse de la persistance d'un biais résiduel n'est pas à exclure, en particulier concernant l'obésité dont la prise en compte par l'IMC demeure très imparfaite comme marqueur d'adiposité. Néanmoins, l'utilisation du rapport taille sur hanche, mis de côté dans les analyse principales en raison d'un nombre important de données manquantes, ne modifiait pas non plus la relation entre l'estradiol et la mortalité cardiovasculaire.

En outre, nous pouvons également émettre l'hypothèse que la relation entre l'estradiol et la mortalité cardiovasculaire pourrait passée par des mécanismes impliqués dans l'athéromatose, telles que l'inflammation et l'hypercoagulabilité. Dans une étude de cohorte représentative des hommes âgés, les niveaux d'estradiol étaient faiblement mais significativement associés à l'IL-6 après ajustement sur l'âge et de multiples facteurs de confusion potentiels, y compris le niveau de testostérone totale [32]. D'autres études ont montré que l'estradiol, et en particulier le rapport estradiol/testostérone, étaient positivement associés à des adipokines autres que l'IL-6, telle que la leptine, et inversement liés à l'adiponectine chez les hommes âgés, suggérant ainsi un lien potentiel entre l'estradiol et un état métabolique défavorable chez les personnes âgées [81]. Dans notre étude, il n'avait pas été possible de tester l'hypothèse de l'implication des mécanismes inflammatoires et coagulolytiques dans les liens que nous avons mis en évidence. Par ailleurs, bien que la testostérone soit le précurseur prédominant de l'estradiol chez les hommes et que les niveaux d'estradiol et de testostérone soient corrélés, il semble peu probable que l'association de l'estradiol avec la mortalité ait été médiée par la testostérone, car l'ajustement statistique sur les niveaux de testostérone ne modifiait pas les résultats. Nous ne pouvons néanmoins pas exclure que d'autres facteurs, non évalués dans notre étude, puissent expliquer nos résultats.

Comme pour la testostérone, ces résultats feront également l'objet d'une discussion en regard des biais inhérents à l'étude dans la partie « Limites » de ce manuscrit (partie 5.3.2).

5.3 Forces et limites de l'étude 3C

Dans cette partie, nous discuterons les forces et les limites de l'étude et leurs influences sur les résultats conjointement pour la testostérone et l'estradiol.

5.3.1 Forces

L'étude 3C est une étude multicentrique réalisée en population générale qui bénéficie d'un taux élevé de participation (80 % après 12 ans de suivi) [175]. Une des principales forces de l'étude 3C réside dans son caractère prospectif et dans une durée de suivi importante, limitant ainsi l'influence d'un événement de santé sur les facteurs d'exposition qui sont mesurés à l'entrée dans la cohorte.

Par ailleurs, la constitution de la sous-cohorte pour l'étude des biomarqueurs à partir d'un échantillon aléatoire de la cohorte entière a permis une estimation non biaisée des risques de mortalité. Les informations collectées à l'examen initial provenaient d'interviews réalisées en face à face, limitant dans une certaine mesure les biais de mémoire et de classements. De même, la définition des causes de décès reposait sur une définition internationale et nous avons utilisé uniquement les causes immédiates, s'assurant ainsi d'une classification optimale des causes de mortalité.

De plus, la quantité et la richesse des informations collectées ont permis la prise en compte de nombreux facteurs de confusion dans l'estimation des risques, permettant de s'assurer d'une bonne indépendance des relations mises en évidence. La recherche systématique des médicaments pris par chacun des participants était également une force de l'étude car cela nous a permis d'exclure les participants qui utilisaient des traitements susceptibles d'influencer les niveaux hormonaux et de prendre en compte la polymédication fréquente, en particulier dans le contexte du vieillissement.

En outre, les dosages d'hormones ont été effectués à l'aveugle du statut vital et avec une méthode sensible qui n'a donné aucune valeur inférieures aux concentrations détectables. Néanmoins, les dosages d'hormones par RIA ont été très critiqués et ce point sera discuté dans les limites.

Enfin, la recherche des polymorphismes a été effectuée par une méthode validée et l'étude des associations génétiques ne pouvait pas être influencée par une stratification ou une

hétérogénéité de la population puisque la plupart des participants étaient caucasiens. Les fréquences génotypiques des polymorphismes des récepteurs aux estrogènes étaient d'ailleurs compatibles avec celles attendues dans une population caucasienne.

5.3.2 Limites

L'étude 3C présente également des limites à prendre en considération dans l'interprétation des résultats.

5.3.2.1 Validité externe

L'étude 3C a été réalisée en France sur la base du volontariat, parmi des individus majoritairement caucasiens, non institutionnalisés, âgés de plus de 65 ans et en relative bonne santé. Notre travail a porté sur des hommes et concernait uniquement la mortalité et les événements fatals. Pour l'ensemble de ces raisons, il est donc nécessaire de se montrer prudent dans l'extrapolation directe de nos résultats qui ne sont en particulier pas généralisables aux hommes plus jeunes ou aux pathologies cliniques non fatals.

5.3.2.2 Biais inhérents à l'étude

Comme rappelé précédemment, l'étude 3C a porté sur une population sélectionnée d'individus. Ces sujets, du fait de leur participation à l'étude, étaient, par la force des choses, en meilleure santé que la population générale. En particulier, ils étaient majoritairement non obèses, fumaient et buvaient peu. Seule la prévalence de l'hypertension était élevée. Par ailleurs, les individus de l'étude 3C présentaient un niveau d'éducation supérieur à la moyenne compte tenu de leur âge et appartenaient donc à une catégorie socioprofessionnelle plus élevée que la population générale. La principale conséquence de ce biais de sélection était le nombre plus faible qu'attendu de décès et une perte éventuelle de puissance statistique. En effet, l'incidence des décès observée dans notre échantillon (4,1 %) était significativement plus faible que celle attendue en France chez les hommes de même âge (4,6 %, données de Insee), avec un ratio de mortalité standardisé (SMR) inférieur à 1 (0,72 ; 95%IC : 0,61-0,82 ; $p < 0,01$). Néanmoins, il a été montré de façon empirique qu'en dépit d'une sous-estimation de l'incidence, les associations observées dans les études épidémiologiques sont peu susceptibles

d'être biaisées dans la mesure où le suivi est adéquate [176, 177]. De plus, notre analyse portait sur un sous-échantillon de l'étude, introduisant potentiellement un biais supplémentaire. Bien qu'il y ait eu des différences mineures de caractéristiques cliniques entre les hommes inclus dans la sous-cohorte et ceux exclus, nous avons utilisé l'IPW pour prendre en compte l'échantillonnage de la sous-cohorte et corriger les différences observées. Les analyses de validation présentées dans la partie résultats ont démontré l'adéquation de la procédure IPW. Par conséquent, bien que cette approche reposait sur un nombre plus faible de sujets et ait donc conduit à des estimations moins précises que la cohorte entière, l'échantillonnage aléatoire était peu susceptible d'entraîner des estimations biaisées.

Dans les études épidémiologiques, notamment dans les investigations portant sur le vieillissement, il est également important de prendre en considération le biais de survie sélective inhérent à la troncature à gauche des modèles liée à l'inclusion dans l'étude exclusivement des sujets encore en vie. Ce biais pourrait conduire à une sous-estimation des associations, voire à une inversion de celles-ci. Néanmoins, dans notre échantillon, nous retrouvions des associations connues entre des facteurs d'exposition tels que le diabète, l'hypertension, les antécédents de maladies cardiovasculaires et le risque de mortalité. Il semblerait donc que l'impact de ce biais soit limité dans notre étude.

En outre, les études épidémiologiques peuvent être soumises à un biais de causalité inverse, notamment dans le contexte des maladies chroniques où la temporalité entre l'effet étiologique supposé du facteur d'exposition et l'événement est remise en cause. Ce n'est alors pas le facteur qui est à l'origine de l'événement mais le processus sous-jacent de l'événement qui va entraîner une modification du facteur d'exposition. Dans ce cas, une mesure du facteur d'exposition longtemps avant la survenue de l'événement est un bon moyen de s'affranchir de cette difficulté. Dans nos analyses, les facteurs d'exposition étaient mesurés à l'inclusion et l'exclusion des décès survenus durant les premières années de suivi ne modifiaient pas les résultats, ce qui était rassurant sur l'absence d'un biais fort de causalité inverse.

Par ailleurs, l'hypothèse de la présence de biais de classement portant notamment sur les expositions d'intérêt n'est pas à exclure. Les mesures hormonales étaient basées sur un dosage unique des stéroïdes sexuels endogènes. Cependant, les prélèvements sanguins ont tous été réalisés le matin réduisant ainsi l'impact des variations diurnes bien connues de la testostérone [178]. Par ailleurs, tous les dosages des hormones ont été effectués par RIA, méthode qui, comparée au « gold standard » que représente la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS), a été beaucoup critiquée [179]. De nombreux RIA sont en

effet disponibles et les résultats des mesures peuvent varier en fonction des réactifs et des techniques utilisées [180]. 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 [180]. Cette procédure nécessite cependant une grande quantité de plasma incompatible avec les stocks disponibles dans la bio-banque 3C. Des RIA directs, sans étape d'extraction, ont donc été utilisés dans la cohorte 3C. Dans notre étude, la reproductibilité des mesures hormonales donnée par le laboratoire était satisfaisante au vu 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 une étude précédente sur les données de 3C, une comparaison entre les dosages par RIA et par GCMS montre une forte corrélation entre les méthodes, même si les taux de testostérone mesurés par RIA étaient sous-estimés par rapport à la GC-MS [181]. Ainsi, l'utilisation des RIA aurait un impact modéré en épidémiologie puisque le classement des valeurs relatives des hormones est généralement conservé et ne modifie pas ou peu la transformation des variables biologiques en données catégorielles (tertiles par exemple) [182]. Un autre biais de classement portant sur le syndrome métabolique était possible. En effet, ce phénotype était défini à l'inclusion et non réévalué au cours du suivi. Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces biais de classement demeurerait non différentiel et avait pour effet de diluer la force des associations. Ils n'expliquaient, en aucun cas, les associations significatives mais pourraient, en revanche, être à l'origine des associations non détectées.

Enfin, un ensemble de biais de confusion pourrait venir perturber l'interprétation de nos données. Comme nous l'avons décrit précédemment, l'étude 3C, par son important recueil d'information, offrait la possibilité de prendre en compte de nombreux facteurs de confusion potentiel. Néanmoins, la possibilité d'un biais résiduel pouvant expliquer une part de nos associations n'était pas à exclure.

5.3.2.3 Puissance

Certaines analyses présentées dans ce travail souffraient d'un manque évident de puissance pour identifier les associations recherchées. C'était notamment le cas des analyses concernant les interactions avec les polymorphismes génétiques et celles pour certaines causes

spécifiques de mortalité. Ces analyses devront être répliquées dans des études ayant inclus un nombre de sujets plus importants.

5.4 Perspectives

Au terme de ces résultats, plusieurs perspectives peuvent être envisagées pour poursuivre ce travail.

Tout d'abord, il serait intéressant d'étudier le statut génétique des récepteurs aux androgènes et d'en évaluer un potentiel effet modificateur dans le lien entre les niveaux d'hormones et le risque de mortalité. En effet, des études ont rapporté que la diminution des niveaux de testostérone liée à l'âge était plus rapide chez les hommes présentant un nombre plus élevé de polymorphismes de répétitions du tri-nucléotide CAG de l'exon 1 des récepteurs aux androgènes [183]. Des polymorphismes d'enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des hormones, telles que l'aromatase ou la 5 α -réductase, pourraient également se révéler pertinents à étudier puisqu'elles sont impliquées dans la variation des concentrations hormonales et la mise en œuvre de méthode de randomisation mendélienne pourrait apporter des éléments sur un potentiel lien causal entre les concentrations hormonales et la mortalité.

Par ailleurs, le résultat de l'analyse de médiation permettant l'interaction entre les niveaux de testostérone et le syndrome métabolique sur la mortalité, pourrait conduire à mener des études de cohorte avec des mesures répétées du syndrome métabolique au cours du temps afin de tenir compte de l'antériorité des bas niveaux de testostérone par rapport au statut syndrome métabolique afin de définir le sens des associations et préciser ainsi le diagramme causal qui pourrait sous-tendre nos résultats.

Plus globalement, il serait intéressant d'évaluer l'effet de ratios de concentrations d'hormones ou de profils hormonaux plus complets à travers de nouvelles méthodes d'analyse statistique comme les « régressions par profil » qui permettent de prendre en compte plusieurs variables corrélées, comme c'est le cas avec nos données. En outre, il serait pertinent, à travers des données de « stéroïdomique », d'étudier un ensemble de métabolites de la testostérone et de l'estradiol, qui pourraient se révéler plus actifs que les hormones elles-mêmes, comme la dihydrotestostérone pour la testostérone par exemple.

Enfin, nous pourrions étudier l'ajout des concentrations hormonales dans différents scores de risque, par exemple pour les maladies cardiovasculaires, afin de déterminer si leur prise en compte dans ces équations améliore la prédiction du risque chez les hommes.

6. Conclusion

Ce travail de thèse avait pour objectif d'améliorer les connaissances concernant le rôle de la testostérone et de l'estradiol sur la mortalité chez les hommes au cours du vieillissement en tenant compte du contexte clinique et génétique des sujets ainsi que des causes de décès. Nous avons tenté d'expliquer en partie l'inconsistance des résultats précédemment publiés à ce sujet. Pour atteindre nos objectifs, nous avons utilisé un échantillon aléatoire de l'étude de cohorte des Trois Cités réalisée chez des hommes de plus de 65 ans suivis durant 12 ans.

Dans un premier temps, nous avons montré un lien complexe entre la testostérone endogène, la présence d'un syndrome métabolique et le risque de mortalité toutes causes. Le syndrome métabolique pourrait jouer à la fois un rôle médiateur mais également modificateur sur le lien entre les concentrations d'hormone et le risque de décès chez les hommes. Chez les sujets ne présentant pas de syndrome métabolique, aucun lien entre la testostérone et la mortalité n'a été mis en évidence alors qu'une relation inverse linéaire a été identifiée chez ceux souffrant d'un syndrome métabolique. Ce résultat pourrait permettre d'apporter un premier niveau d'explication sur la divergence des résultats précédemment publiés dans lesquels ce phénotype clinique n'avait pas été pris en compte. Par ailleurs, nous avons évalué l'association entre la testostérone endogène et le risque de mortalité par causes spécifiques chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique chez lesquels nous avons montré un lien différentiel entre les concentrations d'hormone et le risque de décès d'origine cardiovasculaire, par cancers et par autres causes. Aucune association n'a été mise en évidence entre la testostérone et le risque de mortalité par cancers et par autres causes alors qu'une augmentation de la testostérone endogène serait associée à un risque accru de mortalité d'origine cardiovasculaire. Ce résultat pourrait apporter un second niveau d'explication sur l'inconsistance des résultats antérieurs au sein desquels les causes de décès n'avaient pas systématiquement été prises en compte.

Dans un second temps, nous avons évalué le risque de mortalité toutes causes en relation avec les niveaux d'estradiol, en prenant en compte le contexte génétique des sujets. Une relation quadratique entre l'estradiol endogène et le risque de décès a été mis en évidence et ce lien ne semblait pas moduler par le statut génétique des récepteurs aux estrogènes. En revanche, il existait une hétérogénéité de cette association en fonction des différentes causes de mortalité. Une relation quadratique plus marquée a été retrouvée pour la mortalité cardiovasculaire alors qu'aucun lien n'a été mis en évidence pour la mortalité par cancers ou par autres causes. Ces résultats permettaient d'apporter de nouvelles données dans ce domaine peu étudié et d'en comprendre en partie les résultats jusque-là contradictoires.

En conclusion, ce travail a confirmé les liens complexes entre les hormones endogènes et le risque de mortalité chez les hommes au cours du vieillissement et nous a permis d'apporter différents niveaux d'explications concernant les divergences des résultats antérieurs à ce sujet. Nos résultats pourraient permettre d'améliorer la connaissance du rôle étiologique de la testostérone et de l'estradiol dans le risque de décès et la stratification du risque de mortalité en identifiant des sous-groupes de sujets à haut risque pour lesquels un suivi et une prise en charge particulière pourrait s'avérer nécessaire. De façon plus générale, ce travail vient alimenter un débat déjà très nourri concernant une éventuelle supplémentation hormonale au cours du vieillissement qui pourrait s'avérer bénéfique chez certains individus présentant un phénotype clinique particulier.

Références

1. Schulze, C., Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 1984. 88: p. 1-104.
2. Hedger, M.P. and D.M. de Kretser, Leydig cell function and its regulation. *Results Probl Cell Differ*, 2000. 28: p. 69-110.
3. Kaufman, J.M. and A. Vermeulen, The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev*, 2005. 26(6): p. 833-76.
4. Naessen, T., et al., Higher endogenous estrogen levels in 70-year-old women and men: an endogenous response to counteract developing atherosclerosis? *Menopause*, 2012. 19(12): p. 1322-8.
5. Rosner, W., The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr Rev*, 1990. 11(1): p. 80-91.
6. Rosner, W., Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1991. 20(4): p. 697-720.
7. Zhou, Z.X., et al., The androgen receptor: an overview. *Recent Prog Horm Res*, 1994. 49: p. 249-74.
8. Tostain, J., D. Rossi, and P.M. Martin, [Physiology of androgens in adult men]. *Prog Urol*, 2004. 14(5): p. 639-60.
9. He, Z., et al., Plasma steroids, body composition, and fat distribution: effects of age, sex, and exercise training. *Int J Obes (Lond)*, 2018.
10. Dimopoulou, C., et al., The complex association between metabolic syndrome and male hypogonadism. *Metabolism*, 2018.
11. Tostain, J. and D. Rossi, [Androgen deficiency in the ageing male: a neuro-endocrine disease]. *Prog Urol*, 2004. 14(5): p. 627-9.
12. Sodergard, R., et al., Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 beta to human plasma proteins at body temperature. *J Steroid Biochem*, 1982. 16(6): p. 801-10.
13. Vermeulen, A., J.M. Kaufman, and V.A. Giagulli, Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81(5): p. 1821-6.
14. Raven, G., et al., In men, peripheral estradiol levels directly reflect the action of estrogens at the hypothalamo-pituitary level to inhibit gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91(9): p. 3324-8.

15. Heldring, N., et al., Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*, 2007. 87(3): p. 905-31.
16. Kuiper, G.G., et al., Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(12): p. 5925-30.
17. Panno, M.L., et al., Effect of oestradiol and insulin on the proliferative pattern and on oestrogen and progesterone receptor contents in MCF-7 cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996. 122(12): p. 745-9.
18. Herrington, D.M., et al., Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med*, 2002. 346(13): p. 967-74.
19. Zhao, C., K. Dahlman-Wright, and J.A. Gustafsson, Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*, 2008. 6: p. e003.
20. Hayes, F.J., et al., Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(9): p. 3027-35.
21. Bagatell, C.J., K.D. Dahl, and W.J. Bremner, The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. *J Androl*, 1994. 15(1): p. 15-21.
22. Finkelstein, J.S., et al., Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. II. Effects of estradiol administration in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991. 73(3): p. 621-8.
23. Smith, E.P., et al., Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*, 1994. 331(16): p. 1056-61.
24. Morishima, A., et al., Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(12): p. 3689-98.
25. Carani, C., et al., Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med*, 1997. 337(2): p. 91-5.
26. Veldhuis, J.D. and A. Iranmanesh, Short-term aromatase-enzyme blockade unmasks impaired feedback adaptations in luteinizing hormone and testosterone secretion in older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(1): p. 211-8.
27. Khosla, S., L.J. Melton, 3rd, and B.L. Riggs, Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(4): p. 1443-50.
28. Gennari, L., R. Nuti, and J.P. Bilezikian, Aromatase activity and bone homeostasis in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(12): p. 5898-907.

29. Riggs, B.L., S. Khosla, and L.J. Melton, 3rd, Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*, 2002. 23(3): p. 279-302.
30. Khosla, S., et al., Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(4): p. 1550-4.
31. Nakhai Pour, H.R., et al., Association of endogenous sex hormone with C-reactive protein levels in middle-aged and elderly men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007. 66(3): p. 394-8.
32. Maggio, M., et al., Estradiol and inflammatory markers in older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(2): p. 518-22.
33. Toran-Allerand, C.D., M. Singh, and G. Setalo, Jr., Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol*, 1999. 20(2): p. 97-121.
34. Vegeto, E., P. Ciana, and A. Maggi, Estrogen and inflammation: hormone generous action spreads to the brain. *Mol Psychiatry*, 2002. 7(3): p. 236-8.
35. Simpson, E.R., Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003. 86(3-5): p. 225-30.
36. Feldman, H.A., 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. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(2): p. 589-98.
37. Gray, A., et al., Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991. 73(5): p. 1016-25.
38. Harman, S.M., et al., Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(2): p. 724-31.
39. Tenover, J.L., Testosterone and the aging male. *J Androl*, 1997. 18(2): p. 103-6.
40. Davidson, J.M., C.A. Camargo, and E.R. Smith, Effects of androgen on sexual behavior in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1979. 48(6): p. 955-8.
41. Morales, A., et al., Testosterone supplementation for hypogonadal impotence: assessment of biochemical measures and therapeutic outcomes. *J Urol*, 1997. 157(3): p. 849-54.
42. Kelly, D.M. and T.H. Jones, Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *J Endocrinol*, 2013. 217(3): p. R47-71.
43. Kelly, D.M. and T.H. Jones, Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. *J Endocrinol*, 2013. 217(3): p. R25-45.
44. Rao, P.M., D.M. Kelly, and T.H. Jones, Testosterone and insulin resistance in the metabolic syndrome and T2DM in men. *Nat Rev Endocrinol*, 2013. 9(8): p. 479-93.

45. Saad, F., et al., Testosterone as potential effective therapy in treatment of obesity in men with testosterone deficiency: a review. *Curr Diabetes Rev*, 2012. 8(2): p. 131-43.
46. Traish, A.M., R. Abdou, and K.E. Kypreos, Androgen deficiency and atherosclerosis: The lipid link. *Vascul Pharmacol*, 2009. 51(5-6): p. 303-13.
47. Corona, G., et al., The age-related decline of testosterone is associated with different specific symptoms and signs in patients with sexual dysfunction. *Int J Androl*, 2009. 32(6): p. 720-8.
48. Laaksonen, D.E., et al., Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. *Eur J Endocrinol*, 2003. 149(6): p. 601-8.
49. Chen, R.Y., G.A. Wittert, and G.R. Andrews, Relative androgen deficiency in relation to obesity and metabolic status in older men. *Diabetes Obes Metab*, 2006. 8(4): p. 429-35.
50. Gannage-Yared, M.H., et al., Serum adiponectin and leptin levels in relation to the metabolic syndrome, androgenic profile and somatotrophic axis in healthy non-diabetic elderly men. *Eur J Endocrinol*, 2006. 155(1): p. 167-76.
51. Maggio, M., et al., Association between hormones and metabolic syndrome in older Italian men. *J Am Geriatr Soc*, 2006. 54(12): p. 1832-8.
52. Kaplan, S.A., A.G. Meehan, and A. Shah, The age related decrease in testosterone is significantly exacerbated in obese men with the metabolic syndrome. What are the implications for the relatively high incidence of erectile dysfunction observed in these men? *J Urol*, 2006. 176(4 Pt 1): p. 1524-7; discussion 1527-8.
53. Tang, Y.J., et al., Serum testosterone level and related metabolic factors in men over 70 years old. *J Endocrinol Invest*, 2007. 30(6): p. 451-8.
54. Bianchi, V.E. and V. Locatelli, Testosterone a key factor in gender related metabolic syndrome. *Obes Rev*, 2018. 19(4): p. 557-575.
55. Elliott, J., et al., Testosterone therapy in hypogonadal men: a systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open*, 2017. 7(11): p. e015284.
56. Vandenput, L. and C. Ohlsson, Estrogens as regulators of bone health in men. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. 5(8): p. 437-43.
57. Ohlsson, C. and L. Vandenput, The role of estrogens for male bone health. *Eur J Endocrinol*, 2009. 160(6): p. 883-9.
58. Carani, C., et al., [Estrogen resistance and aromatase deficiency in humans]. *J Soc Biol*, 2002. 196(3): p. 245-8.
59. Maggio, M., et al., Multiple hormonal dysregulation as determinant of low physical performance and mobility in older persons. *Curr Pharm Des*, 2014. 20(19): p. 3119-48.

60. Shores, M.M., et al., Low serum testosterone and mortality in male veterans. *Arch Intern Med*, 2006. 166(15): p. 1660-5.
61. Khaw, K.T., 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(23): p. 2694-701.
62. Laughlin, G.A., E. Barrett-Connor, and J. Bergstrom, Low serum testosterone and mortality in older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(1): p. 68-75.
63. Lehtonen, A., et al., Serum testosterone but not leptin predicts mortality in elderly men. *Age Ageing*, 2008. 37(4): p. 461-4.
64. Tivesten, A., et al., Low serum testosterone and estradiol predict mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(7): p. 2482-8.
65. Smith, G.D., et al., Cortisol, testosterone, and coronary heart disease: prospective evidence from the Caerphilly study. *Circulation*, 2005. 112(3): p. 332-40.
66. Szulc, P., B. Claustrat, and P.D. Delmas, Serum concentrations of 17beta-E2 and 25-hydroxycholecalciferol (25OHD) in relation to all-cause mortality in older men--the MINOS study. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009. 71(4): p. 594-602.
67. Vikan, T., et al., Endogenous sex hormones and the prospective association with cardiovascular disease and mortality in men: the Tromso Study. *Eur J Endocrinol*, 2009. 161(3): p. 435-42.
68. Menke, A., et al., Sex steroid hormone concentrations and risk of death in US men. *Am J Epidemiol*, 2010. 171(5): p. 583-92.
69. Araujo, A.B., et al., Clinical review: Endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. 96(10): p. 3007-19.
70. Haring, R., et al., Association of sex steroids, gonadotrophins, and their trajectories with clinical cardiovascular disease and all-cause mortality in elderly men from the Framingham Heart Study. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013. 78(4): p. 629-34.
71. Yeap, B.B., et al., In older men an optimal plasma testosterone is associated with reduced all-cause mortality and higher dihydrotestosterone with reduced ischemic heart disease mortality, while estradiol levels do not predict mortality. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. 99(1): p. E9-18.
72. Holmboe, S.A., et al., The Association of Reproductive Hormone Levels and All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality in Men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. 100(12): p. 4472-80.
73. Daka, B., et al., Low concentrations of serum testosterone predict acute myocardial infarction in men with type 2 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord*, 2015. 15: p. 35.

74. Srinath, R., et al., Association Between Endogenous Testosterone and Cerebrovascular Disease in the ARIC Study (Atherosclerosis Risk in Communities). *Stroke*, 2016. 47(11): p. 2682-2688.
75. Lin, J.W., et al., Metabolic syndrome, testosterone, and cardiovascular mortality in men. *J Sex Med*, 2011. 8(8): p. 2350-60.
76. Lopez, D.S., et al., Double trouble: Co-occurrence of testosterone deficiency and body fatness associated with all-cause mortality in US men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2018. 88(1): p. 58-65.
77. Ding, E.L., et al., Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2006. 295(11): p. 1288-99.
78. Laaksonen, D.E., et al., Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care*, 2004. 27(5): p. 1036-41.
79. Barud, W., et al., Inverse relationship between total testosterone and anti-oxidized low density lipoprotein antibody levels in ageing males. *Atherosclerosis*, 2002. 164(2): p. 283-8.
80. Khaw, K.T. and E. Barrett-Connor, Blood pressure and endogenous testosterone in men: an inverse relationship. *J Hypertens*, 1988. 6(4): p. 329-32.
81. Laughlin, G.A., E. Barrett-Connor, and S. May, Sex-specific association of the androgen to oestrogen ratio with adipocytokine levels in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2006. 65(4): p. 506-13.
82. Maggio, M. and S. Basaria, Welcoming low testosterone as a cardiovascular risk factor. *Int J Impot Res*, 2009. 21(4): p. 261-4.
83. Jones, T.H., Testosterone deficiency: a risk factor for cardiovascular disease? *Trends Endocrinol Metab*, 2010. 21(8): p. 496-503.
84. Hyde, Z., et al., Low free testosterone predicts mortality from cardiovascular disease but not other causes: the Health in Men Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. 97(1): p. 179-89.
85. Haring, R., et al., Low serum testosterone levels are associated with increased risk of mortality in a population-based cohort of men aged 20-79. *Eur Heart J*, 2010. 31(12): p. 1494-501.
86. Araujo, A.B., et al., Sex steroids and all-cause and cause-specific mortality in men. *Arch Intern Med*, 2007. 167(12): p. 1252-60.
87. Goodale, T., et al., Testosterone and the Heart. *Methodist Debaquey Cardiovasc J*, 2017. 13(2): p. 68-72.

88. Hsu, B., et al., Temporal Changes in Androgens and Estrogens Are Associated With All-Cause and Cause-Specific Mortality in Older Men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016. 101(5): p. 2201-10.
89. Fleishman, S.B., et al., Testosterone levels and quality of life in diverse male patients with cancers unrelated to androgens. *J Clin Oncol*, 2010. 28(34): p. 5054-60.
90. Garcia, J.M., et al., Hypogonadism in male patients with cancer. *Cancer*, 2006. 106(12): p. 2583-91.
91. Maggio, M., et al., Relationship between higher estradiol levels and 9-year mortality in older women: the Invecchiare in Chianti study. *J Am Geriatr Soc*, 2009. 57(10): p. 1810-5.
92. Dossett, L.A., et al., High levels of endogenous estrogens are associated with death in the critically injured adult. *J Trauma*, 2008. 64(3): p. 580-5.
93. Scarabin-Carre, V., et al., High level of plasma estradiol as a new predictor of ischemic arterial disease in older postmenopausal women: the three-city cohort study. *J Am Heart Assoc*, 2012. 1(3): p. e001388.
94. Key, T., et al., Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(8): p. 606-16.
95. Carcaillon, L., et al., High plasma estradiol interacts with diabetes on risk of dementia in older postmenopausal women. *Neurology*, 2014. 82(6): p. 504-11.
96. Chan, Y.X., et al., Neutral associations of testosterone, dihydrotestosterone and estradiol with fatal and non-fatal cardiovascular events, and mortality in men aged 17-97 years. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2016. 85(4): p. 575-82.
97. Schuit, S.C., et al., Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *JAMA*, 2004. 291(24): p. 2969-77.
98. Onland-Moret, N.C., et al., The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control*, 2005. 16(10): p. 1195-202.
99. Kjaergaard, A.D., et al., Estrogen receptor alpha polymorphism and risk of cardiovascular disease, cancer, and hip fracture: cross-sectional, cohort, and case-control studies and a meta-analysis. *Circulation*, 2007. 115(7): p. 861-71.
100. Scarabin-Carre, V., et al., Plasma estrogen levels, estrogen receptor gene variation, and ischemic arterial disease in postmenopausal women: the three-city prospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. 99(8): p. E1539-46.
101. Daniels, N.A., et al., Sex hormones and the risk of incident prostate cancer. *Urology*, 2010. 76(5): p. 1034-40.
102. Chan, Y.X., et al., Higher Dihydrotestosterone Is Associated with the Incidence of Lung Cancer in Older Men. *Horm Cancer*, 2017. 8(2): p. 119-126.

103. Carruba, G., Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *J Cell Biochem*, 2007. 102(4): p. 899-911.
104. Brinton, L.A., et al., Prediagnostic Sex Steroid Hormones in Relation to Male Breast Cancer Risk. *J Clin Oncol*, 2015. 33(18): p. 2041-50.
105. Group, C.S., Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*, 2003. 22(6): p. 316-25.
106. Ronning, M., et al., Different versions of the anatomical therapeutic chemical classification system and the defined daily dose--are drug utilisation data comparable? *Eur J Clin Pharmacol*, 2000. 56(9-10): p. 723-7.
107. Boleloucky, Z., [Aspects of the 10th decennial revision of the international statistical classification of diseases (ICD-10)]. *Cesk Psychiatr*, 1989. 85(3): p. 183-93.
108. Rove, K.O., et al., Role of testosterone in managing advanced prostate cancer. *Urology*, 2012. 80(4): p. 754-62.
109. Sjoval, J. and R. Vihko, Determination of androsterone and dehydroepiandrosterone sulfates in human serum by gas-liquid chromatography. *Steroids*, 1965. 6(5): p. 597-604.
110. Abraham, G.E., Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta. *J Clin Endocrinol Metab*, 1969. 29(6): p. 866-70.
111. Stanczyk, F.Z., J. Jurow, and A.W. Hsing, Limitations of direct immunoassays for measuring circulating estradiol levels in postmenopausal women and men in epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. 19(4): p. 903-6.
112. Dufour-Rainfray, D., et al., [Mass spectrometry for steroid assays]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2015. 73(1): p. 70-8.
113. Auchus, R.J., Steroid assays and endocrinology: best practices for basic scientists. *Endocrinology*, 2014. 155(6): p. 2049-51.
114. Bland, J.M. and D.G. Altman, Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986. 1(8476): p. 307-10.
115. Soisson, V., et al., Low plasma testosterone and elevated carotid intima-media thickness: importance of low-grade inflammation in elderly men. *Atherosclerosis*, 2012. 223(1): p. 244-9.
116. Loric, S., et al., Determination of testosterone in serum not bound by sex-hormone-binding globulin: diagnostic value in hirsute women. *Clin Chem*, 1988. 34(9): p. 1826-9.
117. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972. 18(6): p. 499-502.

118. Alberti, K.G., et al., The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*, 2005. 366(9491): p. 1059-62.
119. Grundy, S.M., et al., Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, 2005. 112(17): p. 2735-52.
120. Balkau, B. and M.A. Charles, Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med*, 1999. 16(5): p. 442-3.
121. Hogben, L. and K.W. Cross, Sampling from a discrete universe. I. Sampling without replacement from a finite universe. *Acta Genet Stat Med*, 1952. 3(4): p. 305-42.
122. Xu, S., et al., Use of stabilized inverse propensity scores as weights to directly estimate relative risk and its confidence intervals. *Value Health*, 2010. 13(2): p. 273-7.
123. Cole, S.R. and M.A. Hernan, Adjusted survival curves with inverse probability weights. *Comput Methods Programs Biomed*, 2004. 75(1): p. 45-9.
124. Austin, P.C., D.S. Lee, and J.P. Fine, Introduction to the Analysis of Survival Data in the Presence of Competing Risks. *Circulation*, 2016. 133(6): p. 601-9.
125. Lau, B., S.R. Cole, and S.J. Gange, Competing risk regression models for epidemiologic data. *Am J Epidemiol*, 2009. 170(2): p. 244-56.
126. Korn, E.L., B.I. Graubard, and D. Midthune, Time-to-event analysis of longitudinal follow-up of a survey: choice of the time-scale. *Am J Epidemiol*, 1997. 145(1): p. 72-80.
127. Thiebaut, A.C. and J. Benichou, Choice of time-scale in Cox's model analysis of epidemiologic cohort data: a simulation study. *Stat Med*, 2004. 23(24): p. 3803-20.
128. Commenges, D., et al., Modelling age-specific risk: application to dementia. *Stat Med*, 1998. 17(17): p. 1973-88.
129. DAVID, S., Partial Residuals for The Proportional Hazards Regression Model. *Biometrika*, 1982. 69(1): p. 239-241.
130. Baron, R.M. and D.A. Kenny, The moderator-mediator variable distinction in social psychological research: conceptual, strategic, and statistical considerations. *J Pers Soc Psychol*, 1986. 51(6): p. 1173-82.
131. Robins, J.M. and S. Greenland, Identifiability and exchangeability for direct and indirect effects. *Epidemiology*, 1992. 3(2): p. 143-55.
132. Pearl, J., Direct and indirect effects. *Proceedings of the Seventeenth Conference on Uncertainty and Artificial Intelligence*. San Francisco: Morgan Kaufmann, 2001: p. 411–420.

133. Vanderweele, T.J. and S. Vansteelandt, Odds ratios for mediation analysis for a dichotomous outcome. *Am J Epidemiol*, 2010. 172(12): p. 1339-48.
134. Valeri, L. and T.J. Vanderweele, Mediation analysis allowing for exposure-mediator interactions and causal interpretation: theoretical assumptions and implementation with SAS and SPSS macros. *Psychol Methods*, 2013. 18(2): p. 137-50.
135. VanderWeele, T.J., Causal mediation analysis with survival data. *Epidemiology*, 2011. 22(4): p. 582-5.
136. Prentice, R.L., W.M. Vollmer, and J.D. Kalbfleisch, On the use of case series to identify disease risk factors. *Biometrics*, 1984. 40(2): p. 445-58.
137. Piegorsch, W.W., C.R. Weinberg, and J.A. Taylor, Non-hierarchical logistic models and case-only designs for assessing susceptibility in population-based case-control studies. *Stat Med*, 1994. 13(2): p. 153-62.
138. Yang, Q. and M.J. Khoury, Evolving methods in genetic epidemiology. III. Gene-environment interaction in epidemiologic research. *Epidemiol Rev*, 1997. 19(1): p. 33-43.
139. Laouali, N., et al., Testosterone and All-Cause Mortality in Older Men: The Role of Metabolic Syndrome. *J Endocr Soc*, 2018. 2(4): p. 322-335.
140. Muraleedharan, V., et al., Testosterone deficiency is associated with increased risk of mortality and testosterone replacement improves survival in men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*, 2013. 169(6): p. 725-33.
141. Shores, M.M., et al., Testosterone treatment and mortality in men with low testosterone levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. 97(6): p. 2050-8.
142. Hamilton, E.J., et al., Prevalence and prognosis of a low serum testosterone in men with type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study Phase II. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2016. 85(3): p. 444-52.
143. Tint, A.N., et al., Association of sex hormone-binding globulin and free testosterone with mortality in men with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*, 2016. 174(1): p. 59-68.
144. Soisson, V., et al., A J-shaped association between plasma testosterone and risk of ischemic arterial event in elderly men: the French 3C cohort study. *Maturitas*, 2013. 75(3): p. 282-8.
145. Sueoka, K., Higher Endogenous Testosterone Levels Associated with Increased Risk of Coronary Heart Disease in Elderly Men: A Prospective Study. *The Endocrine Society*, 2010.
146. Basaria, S., et al., Adverse events associated with testosterone administration. *N Engl J Med*, 2010. 363(2): p. 109-22.

147. Xu, L., et al., Testosterone therapy and cardiovascular events among men: a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *BMC Med*, 2013. 11: p. 108.
148. Ohlsson, C., 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. *J Am Coll Cardiol*, 2011. 58(16): p. 1674-81.
149. Yeap, B.B., et al., Lower testosterone levels predict incident stroke and transient ischemic attack in older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(7): p. 2353-9.
150. Srinath, R., et al., Endogenous testosterone and its relationship to preclinical and clinical measures of cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. 100(4): p. 1602-8.
151. Svartberg, J. and R. Jorde, Endogenous testosterone levels and smoking in men. The fifth Tromso study. *Int J Androl*, 2007. 30(3): p. 137-43.
152. Akbaraly, T.N., et al., Metabolic syndrome, its components, and mortality in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(11): p. E327-32.
153. Haring, R., et al., Mendelian randomization suggests non-causal associations of testosterone with cardiometabolic risk factors and mortality. *Andrology*, 2013. 1(1): p. 17-23.
154. Zhao, J.V. and C.M. Schooling, Endogenous androgen exposures and ischemic heart disease, a separate sample Mendelian randomization study. *Int J Cardiol*, 2016. 222: p. 940-945.
155. Spratt, D.I., et al., Reproductive axis suppression in acute illness is related to disease severity. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 76(6): p. 1548-54.
156. Matsumoto, A.M., Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2002. 57(2): p. M76-99.
157. Wang, F., et al., Relationship between thyroid function and ICU mortality: a prospective observation study. *Crit Care*, 2012. 16(1): p. R11.
158. Rodondi, N., et al., Subclinical hypothyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality. *JAMA*, 2010. 304(12): p. 1365-74.
159. Muraleedharan, V. and T.H. Jones, Testosterone and the metabolic syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2010. 1(5): p. 207-23.
160. Srinivas-Shankar, U., et al., 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. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(2): p. 639-50.

161. Bhasin, S., et al., Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(2): p. 678-88.
162. Far, H.R., G. Agren, and I. Thiblin, Cardiac hypertrophy in deceased users of anabolic androgenic steroids: an investigation of autopsy findings. *Cardiovasc Pathol*, 2012. 21(4): p. 312-6.
163. Jankowska, E.A., et al., Circulating estradiol and mortality in men with systolic chronic heart failure. *JAMA*, 2009. 301(18): p. 1892-901.
164. Magnani, J.W., et al., Association of sex hormones, aging, and atrial fibrillation in men: the Framingham Heart Study. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2014. 7(2): p. 307-12.
165. Abbott, R.D., et al., Serum estradiol and risk of stroke in elderly men. *Neurology*, 2007. 68(8): p. 563-8.
166. The Coronary Drug Project. Initial findings leading to modifications of its research protocol. *JAMA*, 1970. 214(7): p. 1303-13.
167. Vandenplas, G., et al., Endogenous oestradiol and cardiovascular disease in healthy men: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Heart*, 2012. 98(20): p. 1478-82.
168. Pan, Y., Y. Li, and H. Shen, Meta-analysis of the association between polymorphisms of estrogen receptor alpha genes rs9340799 and rs2234693 and Alzheimer's disease: evidence from 23 articles. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*, 2014. 29(8): p. 704-11.
169. Gu, Z., G. Wang, and W. Chen, Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis involving 18 studies. *Tumour Biol*, 2014. 35(6): p. 5921-30.
170. Casazza, K., G.P. Page, and J.R. Fernandez, The association between the rs2234693 and rs9340799 estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk factors for cardiovascular disease: a review. *Biol Res Nurs*, 2010. 12(1): p. 84-97.
171. Liu, Y., et al., Association of PvuII and XbaI polymorphisms in estrogen receptor alpha gene with the risk of hepatitis B virus infection in the Guangxi Zhuang population. *Infect Genet Evol*, 2014. 27: p. 69-76.
172. Goodman-Gruen, D. and E. Barrett-Connor, Sex differences in the association of endogenous sex hormone levels and glucose tolerance status in older men and women. *Diabetes Care*, 2000. 23(7): p. 912-8.
173. Schneider, G., et al., Increased estrogen production in obese men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1979. 48(4): p. 633-8.

174. Maggio, M., et al., Estradiol and metabolic syndrome in older italian men: The InCHIANTI Study. *J Androl*, 2010. 31(2): p. 155-62.
175. Letellier, N., et al., Sex-specific association between neighborhood characteristics and dementia: The Three-City cohort. *Alzheimers Dement*, 2018. 14(4): p. 473-482.
176. Criqui, M.H., Response bias and risk ratios in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol*, 1979. 109(4): p. 394-9.
177. Batty, G.D., et al., Generalizability of occupational cohort study findings. *Epidemiology*, 2014. 25(6): p. 932-3.
178. Brambilla, D.J., et al., The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(3): p. 907-13.
179. Muller, M., et al., Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(11): p. 5076-86.
180. Taieb, J., et al., Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin Chem*, 2003. 49(8): p. 1381-95.
181. Chung, S., et al., Disruption of the melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCH1R) affects thyroid function. *Endocrinology*, 2012. 153(12): p. 6145-54.
182. Toniolo, P. and A. Lukanova, The challenge of measuring circulating estradiol at low concentrations. *Breast Cancer Res*, 2005. 7(2): p. 45-7.
183. Krithivas, K., et al., Evidence that the CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. *J Endocrinol*, 1999. 162(1): p. 137-42.

Annexes

ANNEXE A : CORRELATIONS ET DETERMINANTS DE LA TESTOSTERONE

BIODISPONIBLE

Tableau 27 : Caractéristiques des hommes en fonction des tertiles de distribution de la testostérone biodisponible.

Les données sont exprimées en n (%) ou moyenne (ET) excepté pour les triglycérides et le glucose pour lesquels elles sont

Caractéristiques	T1 (< 8.33) (n = 157)	T2 (8.33-11.12) (n = 158)	T3 (≥ 11.13) (n = 158)	p de tendance linéaire
Sociodémographique				
Age (années)	74.6 (5.9)	73.9 (5.4)	73.0 (4.9)	< 0.01
Centre				0.51
Bordeaux	39 (24.8)	29 (18.4)	28 (17.8)	
Dijon	72 (45.2)	90 (57.0)	85 (54.1)	
Montpellier	47 (30.0)	39 (24.7)	44 (28.1)	
Niveau d'éducation ^a				0.99
Pas d'étude ou primaire	47 (30.1)	36 (22.8)	46 (29.3)	
Secondaire	46 (29.5)	43 (27.2)	49 (31.2)	
Bac ou université	63 (40.4)	80 (50.0)	62 (39.5)	
Mesure anthropométrique				
IMC ^b (kg/m ²)	26.7 (3.6)	26.1 (3.2)	25.6 (2.9)	< 0.01
Comportements de santé				
Statut tabagique				0.49
Jamais	49 (31.2)	43 (27.2)	54 (34.4)	
Ancien	102 (65.0)	104 (65.8)	85 (54.1)	
Actuel	6 (3.8)	11 (7.0)	19 (11.5)	
Consommation d'alcool				0.88
Jamais	147 (93.6)	148 (93.7)	148 (93.7)	
Ancien	6 (3.8)	5 (3.2)	5 (3.2)	
Actuel	4 (2.6)	5 (3.2)	5 (3.2)	
Activité physique ^c				0.04
Rarement/Jamais	80 (75.5)	83 (69.2)	75 (62.5)	
Occasionnellement/Régulièrement	26 (24.5)	38 (30.8)	45 (37.5)	
Antécédents personnel				
Hypertension	123 (78.3)	122 (77.2)	124 (79.0)	0.89
Hypercholestérolémie	68 (43.3)	66 (41.8)	70 (44.6)	0.82
Diabète ^a	22 (14.1)	22 (13.9)	10 (6.4)	0.03
SM-IDF ^d	47 (29.9)	32 (20.3)	27 (17.2)	< 0.01
Maladie coronaire	17 (10.8)	20 (12.7)	23 (14.7)	0.31
AVC ^e	12 (7.8)	10 (6.5)	4 (2.6)	0.04
Paramètres biologiques				
Cholestérol total (mmol/L)	5.5 (0.9)	5.6 (0.8)	5.6 (0.9)	0.10
LDL-C ^f (mmol/L)	3.5 (0.8)	3.6 (0.8)	3.6 (0.8)	0.43
HDL-C (mmol/L)	1.4 (0.3)	1.4 (0.3)	1.5 (0.4)	< 0.01
Triglycérides (mmol/L)	1.2 (0.9-1.6)	1.2 (0.9-1.6)	1.0 (0.8-1.4)	0.02
Glucose ^a (g/L)	5.1 (4.8-5.7)	5.0 (4.7-5.4)	4.9 (4.6-5.3)	< 0.01

exprimées en médiane (IQR). T: Tertile de testostérone biodisponible (seuils en nmol/L) ; % : pourcentage ; ET : Ecart type; IQR : interquartile range. p de tendance linéaire basé sur le test Cochran-Armitage ou l'analyse de variance.

Données manquantes: ^a n = 1, ^b n = 2, ^c n = 118. ^d n = 29, ^e n = 8, ^f n = 3.

Tableau 28 : Déterminants de la testostérone biodisponible chez les hommes de l'échantillon (n = 473).

Testostérone biodisponible (nmol/L)	Modèle univarié			Modèle multivarié			R ² (%)
	β^b	ET	p	β^b	ET	p	
Age ^a (années)	-0.53	0.17	< 0.01	-0.39	0.19	0.04	2.27
IMC ^a (kg/m ²)	-0.59	0.16	< 0.01	-0.53	0.19	< 0.01	2.79
Cholestérol total ^a (mmol/L)	0.10	0.16	0.53				
Glucose ^a (g/L)	-0.56	0.16	< 0.01	-0.30	0.25	0.24	
Diabète (%)	-1.72	0.51	< 0.01	-1.22	0.73	0.09	3.31
Hypertension (%)	-0.21	0.39	0.60				
Hypercholestérolémie (%)	0.04	0.33	0.10				
Activité physique	0.37	0.18	0.04	0.09	0.19	0.61	
AVC (%)	-1.59	0.71	0.03	-1.18	0.80	0.14	
Maladie coronaire (%)	0.37	0.49	0.45				
R ² total ajusté (%)							8.37

^a Résultats obtenus pour une augmentation d'un écart-type (ET).

^b Variation d'un écart-type de la variable s'accompagne d'une variation de β écart-type de l'hormone.

R²= pourcentage de variance expliquée.

ANNEXE B : ASSOCIATION ENTRE LA TESTOSTERONE BIODISPONIBLE ET LA MORTALITE

B1 : Risque de mortalité toutes causes

Tableau 29 : Testostérone biodisponible et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi[¥].

Testostérone biodisponible (nmol/L)	Nombres de décès	Modèle 1 (n = 473)		Modèle 2 (n = 473)	
		HR (95% IC)	P	HR (95% IC)	p
Pour l'augmentation d'un ET	183	1.06 (0.91-1.23)	0.47	1.08 (0.92-1.26)	0.36
T1 (< 8.33)	68	1.06 (0.75-1.49)	0.76	1.11 (0.77-1.59)	0.59
T2 (8.33-11.12)	58	0.87 (0.61-1.25)	0.46	0.89 (0.61-1.28)	0.51
T3 (≥ 11.13)	57	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
p de tendance linéaire			0.79		0.61

[¥]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimé par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1 : ajusté sur l'âge, le centre ; modèle 2 : modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool, le syndrome métabolique et l'activité physique.

T = Tertiles de la testostérone biodisponible, ET = Ecart type.

Tableau 30 : Testostérone biodisponible et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique[‡].

	Sans syndrome métabolique					Avec syndrome métabolique					p ^a
	Model 1 (n = 338)			Model 2 (n = 338)		Model 1 (n = 106)			Model 2 (n = 106)		
	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p	
Testostérone biodisponible (nmol/L)											
Pour la diminution d'un ET	130	0.93 (0.78-1.11)	0.425	0.85 (0.72-1.01)	0.07	36	2.14 (1.37-3.34)	< 0.01	1.79 (1.14-2.79)	0.01	< 0.01
T1 (<8.33)	40	0.84 (0.56-1.26)	0.395	0.94 (0.62-1.43)	0.767	20	2.48 (0.90-6.84)	0.08	2.04 (0.70-5.95)	0.19	
T2 (8.33-11.12)	42	0.81 (0.54-1.21)	0.301	0.90 (0.60-1.36)	0.632	10	1.35 (0.46-3.92)	0.58	1.66 (0.54-5.08)	0.37	
T3 (≥11.13)	48	1.00 (référence)	-	1.00 (référence)	-	6	1.00 (référence)	-	1.00 (référence)	-	
p de tendance linéaire			0.387		0.761			0.03		0.05	

[‡]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimé par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1 : ajusté sur l'âge, le centre ; modèle 2 : modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et l'activité physique.

T = Tertiles de la testostérone biodisponible; ET= Ecart type ; p^a = p interaction entre les niveaux de testostérone et le syndrome métabolique sur la mortalité dans le modèle 2.

Tableau 31 : Testostérone biodisponible et risque de mortalité toutes causes après 12 ans de suivi chez les hommes présentant un syndrome métabolique en fonction de la présence des différents composants du syndrome métabolique[‡].

Composants du syndrome métabolique	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	p interaction ^a
Diabètes (n = 71)				
HR pour la diminution d'un ET	24	1.60 (0.86-2.91)	0.14	0.06
Hypertriglycéridémie (n = 49)				
HR pour la diminution d'un ET	16	3.68 (1.54-8.76)	< 0.01	< 0.01
HDL-C bas (n = 22)				
HR pour la diminution d'un ET	11	9.40 (0.46-192.56)	0.15	0.06
Hypertension (n = 105)				
HR pour la diminution d'un ET	35	1.91 (1.18-3.07)	< 0.01	0.01

[‡]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimé par un modèle de Cox pondéré par IPW et ajusté sur l'âge, le centre, les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool, l'activité physique et les 3 autres composants du syndrome métabolique.

^a: p de l'interaction comparant les HRs associés à la diminution des niveaux de testostérone biodisponible d'un ET chez les hommes avec chacun des composants au HR chez les hommes sans syndrome métabolique (i.e. 0.85 [0.72-1.01], voir le tableau 28).

ET : Ecart type (3,5 nmol/L).

Tableau 32 : Effets direct, indirect, et total de la testostérone biodisponible sur la mortalité toutes causes et la proportion de l'effet total médiée par le syndrome métabolique.

Effets	Modèle 1 (n = 444)		Modèle 2 (n = 444)	
	Coefficients ^a	95% IC ^b	Coefficients ^a	95% IC ^b
Effet Direct Contrôlé	1.03	(0.83-1.27)	0.97	(0.79-1.22)
Effet Direct Natural	0.89	(0.74-1.11)	0.87	(0.73-1.10)
Effet Indirect Natural	0.91	(0.81-0.99)	0.93	(0.86-0.99)
Effet Total	0.81	(0.66-1.01)	0.81	(0.68-1.04)
Proportion médiée	0.44	-	0.31	-

^a: Modèle de vie accélérée. Modèle 1 : ajusté sur l'âge et le centre ; Modèle 2 : modèle 1 + la consommation d'alcool et les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC et l'activité physique. Les coefficients représentent le ratio moyen de la survie et sont estimés pour le changement d'un niveau 'élevé' de testostérone biodisponible (9,97 nmol/L) à un 'bas' niveau (2.72 nmol/L); Ces valeurs représentent les médianes du niveau de testostérone biodisponible dans deux groupes d'hommes respectivement, avec des niveaux 'élevés' et 'bas'; défini par rapport au seuil clinique de 4 nmol/L. Un ratio moyen de survie inférieur à 1 indique que la diminution du niveau de testostérone biodisponible est associée à une mauvaise survie.

^b: Les intervalles de confiance à 95% (95%IC) des coefficients sont estimés avec un bootstrap (2000 échantillons).

B2 : Risque de mortalité par causes spécifiques

Tableau 33 : Testostérone biodisponible et mortalité par causes spécifiques après 12 ans de suivi chez les hommes ne présentant pas de syndrome métabolique[¥].

		Modèle 1 (n = 338)		Modèle 2 (n = 338)	
Testostérone biodisponible (nmol/L)	Nombre de décès	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Mortalité cardiovasculaire					
Pour l’augmentation d’un ET	30	1.41 (1.02-1.95)	0.04	1.50 (1.04-2.17)	0.03
T1 (< 8.33)	8	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T2 (8.33-11.12)	4	0.55 (0.18-1.67)	0.29	0.56 (0.17-1.79)	0.33
T3 (≥ 11.13)	18	2.41 (1.10-5.33)	0.03	2.75 (1.15-6.57)	0.02
p de tendance linéaire			0.02		0.01
Mortalité par cancers					
Pour l’augmentation d’un ET	45	0.89 (0.66-1.18)	0.41	0.86 (0.64-1.16)	0.32
T1 (< 8.33)	16	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T2 (8.33-11.12)	17	1.13 (0.60-2.16)	0.70	1.19 (0.60-2.32)	0.62
T3 (≥ 11.13)	12	0.79 (0.39-1.61)	0.51	0.65 (0.30-1.40)	0.27
p de tendance linéaire			0.53		0.24
Mortalité par autres causes					
Pour l’augmentation d’un ET	55	1.06 (0.81-1.39)	0.66	0.97 (0.73-1.29)	0.83
T1 (< 8.33)	20	1.00 (référence)		1.00 (référence)	
T2 (8.33-11.12)	19	1.00 (0.53-1.89)	0.99	0.94 (0.48-1.83)	0.86
T3 (≥ 11.13)	16	1.06 (0.56-2.04)	0.85	0.94 (0.47-1.88)	0.86
p de tendance linéaire			0.35		0.41

¥: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimé par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle 1: ajusté sur l'âge et le centre; modèle 2: modèle 1 + les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'IMC et l'activité physique.

ET : Ecart type ; T: tertile de testostérone biodisponible (seuil en nmol/L).

ANNEXE C : TESTOSTERONE TOTALE ET RISQUE DE MORTALITE : ANALYSES COMPLEMENTAIRES

Tableau 34 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique et ajustements additionnels sur les composants du syndrome métabolique[‡].

	Sans syndrome métabolique (n= 338)			syndrome métabolique (n= 106)			p interaction
	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	
Testostérone totale (nmol/L)							
Pour la diminution d'un ET	130	0.84 (0.71-1.01)	0.06	36	1.88 (1.13-3.12)	0.02	< 0.01
T1 (< 14.33)	34	0.71 (0.46-1.11)	0.13	20	5.10 (1.15-22.62)	0.03	
T2 (14.33-19.33)	43	0.79 (0.53-1.18)	0.24	13	4.05 (0.94-17.44)	0.06	
T3 (> 19.33)	53	1.00 (référence)	-	3	1.00 (référence)	-	
p de tendance linéaire			0.12			0.03	

[‡]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimé par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle ajusté sur l'âge, le centre, les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool, l'activité physique, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le diabète et l'IMC.

Tableau 35 : Testostérone totale et risque de mortalité toutes causes chez les hommes après 12 ans de suivi en fonction du statut syndrome métabolique et ajustements additionnels sur l'état de dépression et le déclin cognitif[¶].

	Sans syndrome métabolique (n= 338)			syndrome métabolique (n= 106)			p interaction
	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	Nombres de décès	HR (95% IC)	p	
Testostérone totale (nmol/L)							
Pour la diminution d'un ET	130	0.85 (0.71-1.01)	0.06	36	1.74 (1.03-2.93)	0.04	<0.01
T1 (< 14.33)	34	0.74 (0.48-1.13)	0.17	20	6.09 (0.89-41.59)	0.07	
T2 (14.33-19.33)	43	0.78 (0.52-1.17)	0.24	13	4.36 (0.61-31.05)	0.14	
T3 (> 19.33)	53	1.00 (référence)	-	3	1.00 (référence)	-	
p de tendance linéaire			0.12			0.08	

[¶]: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimé par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle ajusté sur l'âge, le centre, les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool, l'activité physique, l'état de dépression et le déclin cognitif.

ANNEXE D : ESTRADIOL ET RISQUE DE MORTALITE CARDIOVASCULAIRE:
ANALYSE COMPLEMENTAIRE

Tableau 36 : Estradiol et décès d'origine cardiovasculaire après 12 ans de suivi et ajustements additionnels sur l'hypercholestérolémie et l'IMC[¶].

Estradiol totale (pg/mL)	Nombre de décès	HR (95% IC)	p
Mortalité par CVD	44		
T1 (< 15.35)	12	1.90 (0.82-4.41)	0.14
T2 (15.35-21.66)	10	1.00 (référence)	
T3 (≥ 21.67)	22	3.18 (1.46-6.94)	< 0.01
P de la relation en U			0.02

¶: Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance à 95% (95% IC) estimé par un modèle de Cox pondéré par IPW.

Modèle ajusté sur l'âge, le centre, les antécédents personnels de maladie coronarienne et d'AVC, la consommation d'alcool et de tabac, l'hypertension, le diabète, l'hypercholestérolémie et l'IMC.

T = Tertile d'estradiol (seuils en pg/mL).

E1 : Premier article : TESTOSTERONE AND ALL-CAUSE MORTALITY IN OLDER MEN: THE ROLE OF METABOLIC SYNDROME.

ISSN 2472-1972

Testosterone and All-Cause Mortality in Older Men: The Role of Metabolic Syndrome

Nasser Laouali,¹ Sylvie Brailly-Tabard,^{2,3,4} Catherine Helmer,^{5,6}
Marie-Laure Ancelin,⁷ Christophe Tzourio,^{5,6} Archana Singh-Manoux,¹
Aline Dugravot,¹ Alexis Elbaz,¹ Anne Guiochon-Mantel,^{2,3,4}
and Marianne Canonico¹

¹Paris-Saclay University, Paris-South University, Université de Versailles St-Quentin-en-Yvelines, Center for Research in Epidemiology and Population Health, INSERM, 78035 Versailles, France; ²Department of Molecular Genetics, Pharmacogenetics, and Hormonology, Paris-South University, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; ³Bicêtre Hospital, Public Assistance-Paris Hospital, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France; ⁴INSERM U693, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; ⁵INSERM, U1219-Bordeaux Population Health Research Center, 33000 Bordeaux, France; ⁶Bordeaux University, Institut de Santé Publique d'Epidémiologie et de Développement, 33000 Bordeaux, France; and ⁷INSERM U1061, Montpellier University, 34093 Montpellier, France

Previous studies have shown controversial results about the role of testosterone in all-cause mortality in elderly men. We hypothesized that metabolic syndrome (MetS) could partly explain this discrepancy. We therefore examined the association of all-cause mortality with total and bioavailable testosterone, taking into account the MetS. We used data from the Three-City Cohort (3C) study with 12-year follow-up. The 3C study included 3650 men aged >65 years in three French cities. Hormone was measured in a random subsample of 444 men, and MetS was determined as stated by the International Diabetes Federation criteria. We used inverse-probability-weighted Cox regression to estimate hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (95% CIs). Of 444 men included in the analysis, 106 (23.9%) had MetS at baseline, and 166 died over the follow-up. There was a significant interaction between testosterone level and MetS for all-cause mortality ($P = 0.002$ and $P = 0.008$ for total and bioavailable testosterone, respectively). Among men with MetS, a decrease in one standard deviation of testosterone was associated with higher mortality risk [HR 1.78 (95% CI 1.13 to 2.78) and HR 1.83 (95% CI 1.17 to 2.86) for total and bioavailable testosterone, respectively]. By contrast, there was no association of testosterone with mortality risk among men without MetS. Our results suggest that MetS modifies the association between testosterone and mortality in older men. If confirmed, these findings could contribute to improve risk stratification and better manage the health of older men.

Copyright © 2018 Endocrine Society

This article has been published under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial, No-Derivatives License (CC BY-NC-ND; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Freeform/Key Words: aging, metabolic syndrome, mortality, testosterone

Testosterone is the principal male sex hormone, mainly secreted by the testes and, to a lesser extent, by adrenal glands [1]. Total testosterone consists of sex hormone-binding globulin- and cortisol-binding globulin-bound steroid, and a bioavailable component that includes free testosterone and an albumin-bound fraction. The bioavailable form of testosterone represents 30% to 50% of total testosterone and is primarily responsible for its biological effects.

Testosterone is an important anabolic hormone that controls the expression and maintenance of male sexual characteristics and promotes muscle mass, strength, and bone density [2]. Testosterone levels decline gradually with age, and low levels have been associated with

Abbreviations: 3C, Three-City Cohort; ATC, Anatomical Therapeutic Chemical; BMI, body mass index; CDE, controlled direct effect; CI, confidence interval; HDL, high-density lipoprotein; HR, hazard ratio; IPW, inverse-probability weight; LDL, low-density lipoprotein; MetS, metabolic syndrome; NDE, natural direct effect; NIE, natural indirect effect; RIA, radioimmunoassay; SD, standard deviation.

Received 4 January 2018
Accepted 21 February 2018
First Published Online 26 February 2018

April 2018 | Vol. 2, Iss. 4
doi: 10.1210/js.2018-00005 | Journal of the Endocrine Society | 322–335

sexual dysfunction. Low levels of testosterone are also linked to a range of physiological disorders, including reduced insulin sensitivity, diabetes, abdominal obesity, hypertension, and dyslipidemia, which can be grouped under the metabolic syndrome (MetS) [3–6].

Several epidemiological studies have examined the association of low plasma total and bioavailable testosterone with all-cause mortality in elderly men. Their results, reviewed by Araujo *et al.* [7] in a meta-analysis, are inconsistent. Although some studies show an increased risk of death among men with the lowest testosterone levels [8–12], others found no association [13–16]. More recent studies also yielded inconsistent findings [7, 17–19].

Studies that reported a noteworthy association of low testosterone with mortality were usually performed in older men who are more likely than younger men to have low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels, dyslipidemia, or abdominal obesity, three important components of MetS [8–10, 12]. In addition, a previous study [20] suggested that the association of low plasma testosterone and mortality could be restricted to men with MetS.

Based on these observations, we hypothesized that the association of testosterone and mortality in men may be modified by MetS. In a random subsample of elderly men aged ≥ 65 years from the French Three-City Cohort (3C) study [21], we examined the association between the plasma level of total and bioavailable testosterone and the risk of 12-year all-cause mortality, while taking into account the presence of MetS status and its individual components.

1. Methods

A. Study Population and Follow-up

Men included in the present analysis are a random subsample of the 3C study, a large ongoing French prospective cohort study that aimed at studying the relation between vascular factors and dementia. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Kremlin-Bicêtre, and all participants gave written informed consent. The detailed protocol has been described elsewhere [21]. Briefly, 9294 noninstitutionalized subjects (3650 men and 5644 women) > 65 years of age were selected from electoral rolls of three French cities (Bordeaux, Dijon, and Montpellier) between 1999 and 2001. Data were collected by trained psychologists or nurses during face-to-face interviews using standardized questionnaires. Information recorded included sociodemographic characteristics (education, occupational position, and marital status), medical history, cognitive function (Mini-Mental State Examination scores), drugs use in the past month [coded with the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification], diet, alcohol drinking, and smoking. Systolic and diastolic blood pressure, weight, and height were assessed during a clinical examination.

At baseline, fasting blood samples were collected, and plasma aliquots were immediately stored at -80°C after centrifugation at 3000g. Fasting glycemia, different fractions of cholesterol [total, HDL, and low-density lipoprotein (LDL)], and triglycerides were measured for all participants.

Participants were then interviewed five times every 2 to 3 years. Over the follow-up, the vital status of each participant was determined through death certificates, contact with family members and physicians, and hospital records. Our analyses are based on mortality data collected over 12 years of follow-up.

For the biological investigations including the present analysis, a random subcohort representing one-seventh of the original cohort was selected within participants with blood samples, after stratification on sex, center, and age. The present analyses are based on men included in this subcohort, after excluding those who used treatments that might change testosterone levels [antiandrogens (ATC code G03H), hormones and related agents (ATC code L02A), hormone antagonists and related agents (ATC code L02AB)], men with prostate cancer or prostatitis, and those with missing data on measures used to define MetS.

B. Hormone Measurement

Frozen EDTA plasmas were used to determine hormone concentrations. Total testosterone was assessed by a radioimmunoassay (RIA) method with an Orion Diagnostica device (Spectria, Espoo, Finland) and a minimum detectable concentration of 0.06 nmol/L; all testosterone assays were detectable. The intra- and interassay coefficients of variation were 3.8% and 4.8%, respectively, for a total testosterone concentration of 10.2 nmol/L and 4.8% and 5.5%, respectively, for a total testosterone concentration of 21.3 nmol/L. 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 testosterone labeled with tritium [(3H)-testosterone]. The intra- and interassay coefficients of variation were, respectively, 7.0% and 8.5% for a bioavailable testosterone concentration of 4.5 nmol/L.

C. MetS

Baseline MetS was defined according to the International Diabetes Federation criteria, which require the presence of central obesity [defined as waist circumference ≥ 94 cm or body mass index (BMI) >30 kg/m²] plus any two of the following four characteristics (dichotomized as present or absent): (1) raised triglyceride levels (>1.7 mmol/L) or treatment of this lipid abnormality, (2) reduced HDL cholesterol (<1.03 mmol/L) or treatment of this lipid abnormality, (3) raised blood pressure (systolic ≥ 130 mm Hg and diastolic ≥ 85 mm Hg) or treatment of previously diagnosed hypertension, and (4) raised fasting plasma glucose (≥ 5.6 mmol/L) or treatment of previously diagnosed type 2 diabetes [22].

D. Statistical Analysis

Baseline characteristics were reported as means [standard deviation (SD)] for normally distributed continuous variables or otherwise as medians (interquartile range) and as numbers (percentages) for categorical variables. Characteristics were compared according to baseline MetS status and vital status at the end of follow up using Pearson χ^2 tests for categorical variables and Student *t* test for continuous variables after normalization by log-transformation where appropriate.

BMI was calculated by dividing weight in kilograms by height in meters squared. Baseline smoking status and daily alcohol consumption were considered in three categories (never, former, and current) as well as education level (less than lower secondary school, secondary school, high school diploma, or university). Hypothyroidism was defined by self-report or use of thyroid medications (ATC code H03A), and statin use was identified by ATC code C10A.

We used weighted Cox proportional hazards models with age as the time scale to estimate hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs). Participants were followed from age at recruitment until death or end of follow-up, whichever occurred first. Schoenfeld residuals and log-minus-log plots were examined to confirm the proportional hazards assumption.

The interaction between MetS and testosterone on the risk of all-cause mortality was estimated by including a multiplicative term between the two variables in the Cox model. As it was statistically significant, we examined the association of testosterone with all-cause mortality in men with and without MetS status. Other interactions were also systematically tested but were not statistically significant.

Total and bioavailable testosterone were modeled in three different ways. For our main analysis, hormones were included as continuous variables, and we report effect estimates for a 1-SD decrease (z-score) in hormone levels. This approach assumes a linear association between testosterone and mortality; to check this assumption, hormones were categorized into tertiles based on the subcohort distribution, and we computed tests for linear trend across tertiles by including the median of each category as an ordinal variable in the models. Finally, we used a clinically relevant cutoff (11 nmol/L and 4.4 nmol/L for total testosterone and

bioavailable testosterone, respectively) characterizing hormone deficiency in aging men [23, 24], and we compared mortality in men with low and high (reference group) levels.

Two models are presented: model 1 is adjusted for age (time scale) and center; and model 2 is further adjusted for smoking, alcohol drinking, and history of stroke and coronary heart disease.

To estimate the impact of each MetS component as potential modifiers of the association between testosterone and mortality, we conducted separate analyses among men with MetS by defining subgroups of men with each MetS component. We then compared HRs associated with a 1-SD decrease in testosterone levels in men with each MetS component to HRs in those free of MetS. According to this approach, for each MetS component, men with MetS and without that specific component were excluded from the analysis. Central obesity, which represents a mandatory criteria for our MetS definition, was therefore not studied alone as a component.

All analyses were weighted using inverse-probability weights (IPWs) [25] to take into account the sampling of the subcohort in which hormones were measured (one-seventh of the overall men cohort). Weights were estimated for each participant using data on all men in the 3C study ($n = 3650$). The probability of remaining in the subcohort was estimated by logistic regression based on baseline sociodemographic characteristics (age, education, height, occupational position, and marital status), health behaviors (smoking and alcohol, fruit, and vegetable consumption), cardiometabolic risk factors (BMI, hypertension, diabetes, and cholesterol), chronic conditions (coronary heart disease and stroke), and cognitive function (Mini-Mental State Examination scores) and 12-year mortality.

We conducted several sensitivity analyses. First, we excluded participants who died during the first 2 and 4 years of the follow-up to examine whether reverse causation may partly explain our findings. Second, we performed further adjustments on (1) MetS components (central obesity, hypertension, hypercholesterolemia, and diabetes) to consider the association of each of these parameters with testosterone and (2) statin use and hypothyroidism, as these conditions can influence MetS and mortality. Finally, we conducted similar analyses using two other MetS definitions: (1) National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria, according to which MetS is defined by the presence of any three of the following five features: (1) central obesity (defined as waist circumference ≥ 102 cm), (2) raised triglyceride levels (≥ 1.69 mmol/L), (3) reduced HDL cholesterol (< 1.03 mmol/L), (4) raised blood pressure [systolic (≥ 130 mm Hg) or diastolic (≥ 85 mm Hg)], or (5) raised fasting plasma glucose ≥ 6.11 mmol/L or diagnosed diabetes [26]; and (2) European Group for the Study of Insulin Resistance criteria that require the presence of insulin resistance (defined as insulin levels > 75 th percentile of patients without diabetes) plus any two of the following: (1) waist circumference ≥ 94 cm, (2) raised triglyceride levels (≥ 2.0 mmol/L) and/or reduced HDL cholesterol (< 1.01 mmol/L) or specific treatment of lipid abnormality, (3) raised blood pressure [systolic (≥ 140 mm Hg) or diastolic (≥ 90 mm Hg)] or treatment of previously diagnosed hypertension, and (4) raised fasting plasma glucose ≥ 6.11 mmol/L [27].

In addition to our main analysis described previously and to better understand the complex relationship among testosterone, MetS, and mortality, we used counterfactual mediation models allowing for exposure-mediation interaction, according to which MetS represents both a mediator and an effect modifier of the relation between testosterone and mortality. This approach allows us to estimate several quantities for a change of testosterone from high to low: the controlled direct effect (CDE) is the average effect of a decrease in testosterone in the absence of MetS; the natural direct effect (NDE) represents the average effect of a decrease in testosterone when MetS is fixed at the level it would take when testosterone is high; and the natural indirect effect (NIE) expresses how much the outcome would change on average when testosterone is controlled at a low level, but the mediator is changed from the level it would take if testosterone is high to the level it would take if testosterone is low. The total effect is the product of the NDE and NIE. In the absence of interaction, the CDE is equal to the NDE [28–30].

Statistical analyses were performed with Statistical Analysis System software, version 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

2. Results

A. General Characteristics

The characteristics of the 495 men included in the random subcohort were similar to those of other men in the study ($n = 3155$) (Supplemental Table 1). To validate the random sampling and the adequacy of the IPW procedure, we compared the association of cardiometabolic risk factors and personal history of cardiovascular disease with mortality in the overall men cohort and in the subcohort with and without IPW. Results showed that the three different samples yielded similar findings (Supplemental Table 2).

From the random subcohort, we excluded 29 men who did not have data on MetS and 22 men who had treatments that might change hormone levels. These 51 men did not differ from the others in term of age, sociodemographic characteristics, and risk factors. The remaining 444 subjects constitute the sample for our analysis (Fig. 1).

The prevalence of MetS was 23.9% ($n = 106$). Table 1 presents the baseline characteristics of the study sample, overall and according to baseline MetS status. Mean age of the subjects was 73.6 years (SD 5.1). Men with MetS were less likely to be current smokers and former/current drinkers than those without. By contrast, they were more likely to have a history of stroke. As expected, they had also a higher BMI and lower levels of total and bioavailable testosterone. Supplemental Table 3 presents participants' characteristics by tertiles of total testosterone. Total testosterone was inversely associated with BMI (Pearson correlation -0.20 ; $P < 0.01$), diabetes (P for trend <0.01), stroke (P for trend <0.05), and triglycerides (Pearson correlation -0.13 ; $P < 0.01$).

There were 166 deaths (37.5%) over the 12-year follow-up. Table 2 shows baseline characteristics according to vital status at the end of study. Mean age, waist circumference, hypertension, current alcohol drinking, and coronary heart disease and stroke were significantly associated with mortality. These associations were explained by the age differences between the two groups. Overall, mean testosterone levels did not differ between the two groups.

There was a strong positive correlation between total and bioavailable testosterone ($r = 0.90$; $P < 0.001$).

B. Hormone Levels and All-Cause Mortality Stratified by MetS Status

Overall, total and bioavailable testosterone levels were not significantly associated with all-cause mortality in an adjusted model including MetS. For 1-SD decrease of hormones, the HR was 0.97 (95% CI 0.82 to 1.14) for total testosterone and 1.08 (95% CI 0.92 to 1.26) for bioavailable testosterone. However, there was a significant interaction between hormone levels and MetS on the risk of mortality ($P = 0.002$ and $P = 0.008$ for total and bioavailable testosterone, respectively), and we stratified the analyses on MetS status. Figure 2 shows the association of total and bioavailable testosterone with all-cause mortality stratified by MetS status. In subjects without MetS, there was no association of total and bioavailable testosterone with mortality. On the contrary, lower total and bioavailable testosterone were associated with higher mortality in men with MetS [HR for 1-SD decrease: 1.78 (95% CI 1.13 to 2.78) and 1.83 (95% CI 1.17 to 2.86) for total and bioavailable testosterone, respectively]. When hormones were categorized into tertiles, we observed a significant linear trend among those with MetS ($P = 0.033$ and $P = 0.047$ for total and bioavailable testosterone, respectively), but not among those without MetS. When hormones levels were categorized using a clinically relevant cutoff, we found an increased risk of death associated with low hormones levels for men with MetS [HR 3.14 (95% CI 1.33 to 7.40) and 3.47 (95% CI 1.12 to 10.8) for total and bioavailable testosterone, respectively] (Supplemental Table 4), but not for men without MetS for total testosterone; for bioavailable testosterone, the small number of men with low levels without MetS precluded the analysis.

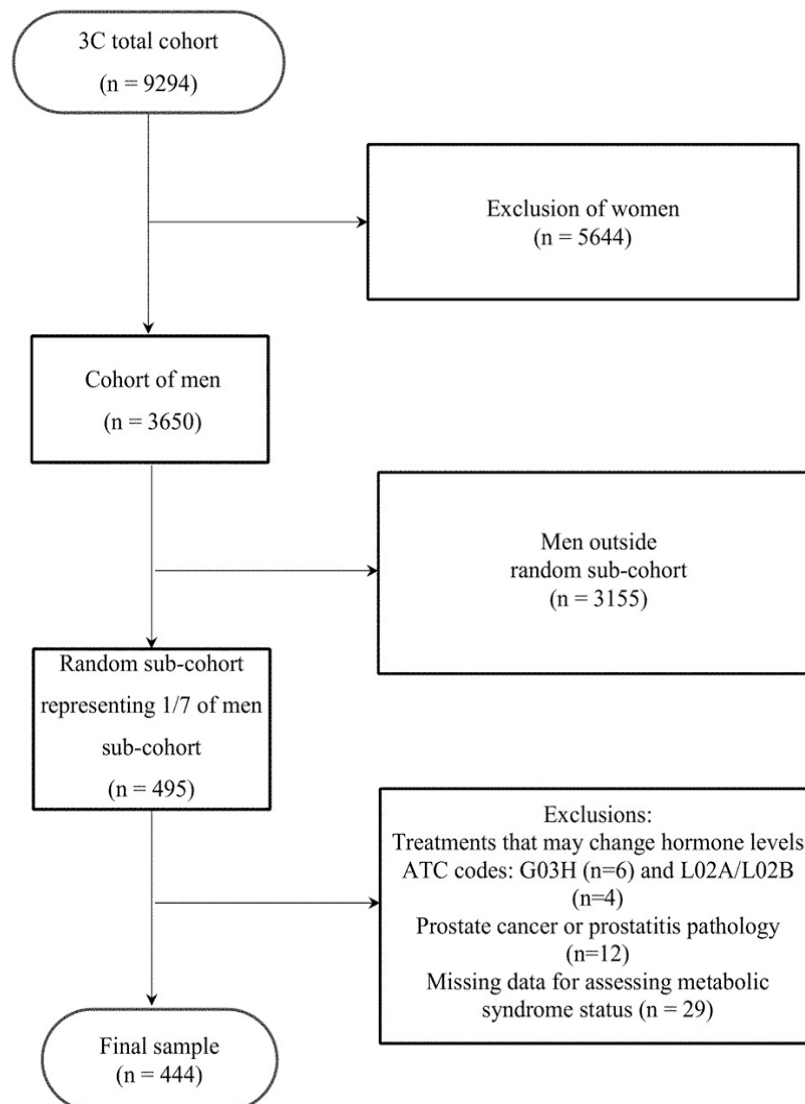


Figure 1. Flow chart representing the constitution of the sample for the investigation of all-cause mortality in relation to testosterone level.

C. Hormone Levels and All-Cause Mortality by MetS Components

Table 3 shows the results of multivariate analyses when MetS components were analyzed separately in men with MetS as compared with those without MetS. Interaction terms of each MetS component with total and bioavailable testosterone on all-cause mortality were statistically significant or borderline noteworthy.

D. Mediation Models Allowing for Testosterone-MetS Interaction

The results of these analyses are summarized in Supplemental Table 5. The CDE was different from the NDE, in agreement with the interaction between testosterone and MetS. Both for total and bioavailable testosterone, decreasing testosterone level was associated with higher mortality risk, and an important proportion of this effect (total, 56%; bioavailable,

Table 1. Baseline Characteristics of the Sample, Overall and According to MetS Status, in the 3C Cohort Study

Characteristics	Whole Sample (n = 444)	Without MetS (n = 338)	With MetS (n = 106)	P Value
Sociodemographic				
Age (y)	73.6 (5.1)	73.6 (5.1)	73.5 (5.2)	0.873
Center				0.249
Bordeaux	94 (21.2)	69 (20.4)	25 (23.8)	
Dijon	233 (52.6)	174 (51.5)	60 (56.2)	
Montpellier	116 (26.2)	95 (28.1)	21 (20.0)	
Education level				0.053
No education or primary school	120 (27.0)	86 (25.4)	34 (32.4)	
Secondary school	130 (29.4)	94 (27.8)	37 (34.3)	
High-school or university degree	193 (43.6)	158 (46.8)	35 (33.3)	
Anthropometric measures				
Waist (cm)	95.9 (9.8)	93.6 (9.4)	103.5 (7.1)	<0.001
BMI (kg/m ²) ^a	26.2 (3.2)	25.5 (2.9)	28.5 (2.9)	<0.001
Cardiovascular risk factors				
Smoking				0.002
Never	136 (30.7)	104 (30.8)	32 (30.5)	
Former	274 (61.9)	204 (60.4)	70 (66.7)	
Current	33 (7.4)	30 (8.9)	3 (2.9)	
Daily alcohol consumption				0.019
Never	415 (93.7)	313 (92.6)	103 (97.1)	
Former	15 (3.4)	13 (3.9)	2 (1.9)	
Current	13 (2.9)	12 (3.6)	1 (0.9)	
Hypertension	352 (79.5)	248 (73.4)	105 (99.0)	<0.001
Hypercholesterolemia	199 (44.9)	138 (40.8)	61 (58.1)	0.002
Diabetes	53 (11.9)	19 (5.6)	34 (32.1)	<0.001
Hypothyroidism	10 (2.3)	9 (2.7)	1 (0.9)	0.937
Statin use	118 (26.6)	78 (23.1)	40 (37.7)	0.003
Medical history				
Coronary heart disease	56 (12.6)	42 (12.4)	14 (13.2)	0.806
Stroke ^b	19 (4.4)	10 (3.0)	9 (8.5)	0.014
Biological parameters				
Total cholesterol (mmol/L)	5.6 (0.9)	5.6 (0.8)	5.6 (0.9)	0.474
LDL cholesterol (mmol/L) ^c	3.6 (0.8)	3.6 (0.8)	3.6 (0.8)	0.695
HDL cholesterol (mmol/L)	1.5 (0.3)	1.5 (0.3)	1.3 (0.3)	<0.001
Triglycerides (mmol/L)	1.1 (0.8–1.5)	1.0 (0.8–1.3)	1.5 (1.2–2.0)	<0.001
Glucose (g/L)	5.0 (4.7–5.5)	4.9 (4.6–5.2)	5.7 (5.1–6.4)	<0.001
Total testosterone (nmol/L)	17.4 (6.2)	18.0 (6.2)	15.4 (5.9)	<0.001
Bioavailable testosterone (nmol/L)	10.0 (3.5)	10.4 (3.4)	9.0 (3.6)	<0.001

Data are expressed as n (%) or means (SD), except for triglycerides and glucose expressed as median (interquartile range). *P* values from *t* or χ^2 test.

^an = 1, missing data.

^bn = 8, missing data.

^cn = 3, missing data.

31%) was explained by a substantial indirect effect through MetS [NIE of 0.97 (95% CI 0.94 to 0.99) and 0.93 (95% CI 0.86 to 0.99) for total and bioavailable testosterone, respectively].

E. Sensitivity Analyses

Results were not substantially modified after exclusion of participants who died during the first 2 (n = 14) or 4 (n = 33) years of the follow-up (data not tabulated). Further adjustment for MetS components, statins use, or hypothyroidism did not change the results (Supplemental Table 6). The same patterns of association were observed when two other MetS definitions were used (Supplemental Tables 7 and 8).

Table 2. Baseline Characteristics of Men According to the Vital Status After a 12-Year Follow-up in the 3C Cohort Study

Characteristics	Alive (n = 278)	Died (n = 166)	P Value ^a	P Value ^b
Sociodemographic				
Age (y)	71.7 (4.2)	76.6 (4.9)	<0.001	—
Center			0.342	0.717
Bordeaux	54 (19.5)	40 (24.1)		
Dijon	145 (52.4)	88 (53.0)		
Montpellier	78 (28.1)	38 (22.9)		
Education level			0.190	0.358
No education or primary school	74 (26.7)	46 (27.7)		
Secondary school	74 (26.7)	56 (33.7)		
High-school or university degree	129 (46.6)	64 (38.6)		
Anthropometric measures				
Waist (cm)	95.2 (9.6)	97.2 (10.1)	0.045	0.722
BMI (kg/m ²) ^c	26.2 (3.1)	26.1 (3.3)	0.795	0.329
Cardiovascular risk factors				
Smoking			0.221	0.452
Never	86 (31.0)	50 (30.1)		
Former	175 (63.2)	99 (59.6)		
Current	16 (5.8)	17 (10.2)		
Daily alcohol consumption			0.055	0.001
Never	264 (95.3)	151 (91.0)		
Former	9 (3.3)	6 (3.6)		
Current	4 (1.4)	9 (5.4)		
Hypertension	212 (76.5)	140 (84.3)	0.049	0.815
Hypercholesterolemia	136 (49.1)	63 (37.9)	0.022	0.268
Diabetes	68 (24.6)	44 (26.5)	0.646	0.322
MetS-IDF	69 (24.9)	36 (21.7)	0.440	0.742
Hypothyroidism	6 (2.2)	4 (2.4)	0.698	0.909
Statin use	78 (28.1)	40 (24.1)	0.361	0.699
Medical history				
Coronary heart disease	28 (10.1)	28 (16.9)	0.038	0.321
Stroke ^d	6 (2.2)	13 (8.0)	0.006	0.032
Biological parameters				
Total cholesterol (mmol/L)	5.6 (0.9)	5.5 (0.9)	0.225	0.943
LDL cholesterol (mmol/L) ^e	3.6 (0.8)	3.5 (0.8)	0.208	0.850
HDL cholesterol (mmol/L)	1.5 (0.3)	1.4 (0.3)	0.594	0.711
Triglycerides (mmol/L)	1.1 (0.8–1.5)	1.2 (0.9–1.5)	0.679	0.877
Glucose (g/L)	5.0 (4.7–5.5)	5.0 (4.6–5.5)	0.796	0.430
Total testosterone (nmol/L)	14.4 (5.7)	17.4 (7.0)	0.919	0.640
Bioavailable testosterone (nmol/L)	10.3 (3.4)	9.8 (3.7)	0.163	0.979

Data are expressed as n (%) or means (SD), except for triglycerides and glucose expressed as median (interquartile range).

Abbreviation: MetS-IDF, MetS according to the International Diabetes Federation.

^aP value from *t* test or χ^2 .

^bP value from a Cox model adjusted for age.

^cn = 1, missing data.

^dn = 8, missing data.

^en = 3, missing data.

3. Discussion

In this study, MetS modified the association of total and bioavailable testosterone with the risk of all-cause mortality among elderly men. Among men without MetS, we found no association between testosterone and all-cause mortality. On the contrary, lower total and bioavailable testosterone were associated with higher risk of all-cause mortality among men with MetS. This pattern was observed for most of the MetS components, except for low HDL cholesterol. These results are in agreement with the hypothesis that differences in MetS

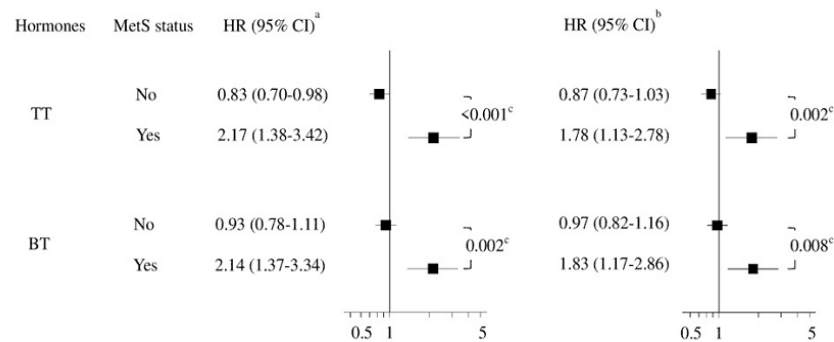


Figure 2. All-cause mortality according to baseline hormone concentrations stratified by MetS status in the 3C cohort study. HRs and 95% CIs are computed for a decrease of 1 SD [total testosterone (TT) 6.2 nmol/L and bioavailable testosterone (BT) 3.5 nmol/L] using IPW Cox models. ^aAdjusted for age and center; ^bfurther adjusted for smoking status, daily alcohol consumption, and personal history of coronary disease and stroke; ^cP value for the interaction of hormones with MetS status on all-cause mortality.

prevalence across epidemiological studies may partly explain inconsistent findings on the relation of testosterone with mortality in men.

Our finding of a differential pattern of association between testosterone and mortality in men by MetS status are in line with some previous data. On one hand, the association observed in men with MetS is consistent with some studies. In a cohort study of 596 men aged ≥ 40 years, 187 (31.4%) had MetS at baseline; low testosterone levels were associated with all-cause mortality only in men with MetS, whereas there was no association in men without MetS; however, the interaction was not statistically significant [20]. Other studies showed an association of low testosterone with higher all-cause mortality and acute myocardial infarction in men with type 2 diabetes [31, 32]. Our results in men with MetS are also indirectly consistent with those from studies performed in men with a high prevalence of dyslipidemia [18], hypertension [10], and elevated BMI [8] that reported an association between low testosterone and mortality. On the other hand, our findings in men without MetS are consistent with negative results of studies in which subjects were healthier and had a low

Table 3. All-Cause Mortality According to Baseline Hormone Concentrations Stratified by MetS Components in Men With MetS in the 3C Cohort Study^a

MetS Components	Total Testosterone (nmol/L)				Bioavailable Testosterone (nmol/L)			
	No. of Deaths	HR (95% CI)	P Value	P Interaction ^b	No. of Deaths	HR (95% CI)	P Value	
Diabetes (n = 71)								
HR for 1-SD decrease	24	1.73 (0.94–3.19)	0.080	0.015	24	1.60 (0.86–2.91)	0.138	0.059
Hypertriglyceridemia (n = 49)								
HR for 1-SD decrease	16	2.75 (1.22–6.16)	0.014	<0.001	16	3.68 (1.54–8.76)	0.003	<0.001
Low HDL-cholesterol (n = 22)								
HR for 1-SD decrease	11	2.41 (0.49–11.83)	0.279	0.056	11	9.40 (0.46–192.56)	0.146	0.058
Hypertension (n = 105)								
HR for 1-SD decrease	35	1.85 (1.15–2.98)	0.012	0.004	35	1.91 (1.18–3.07)	0.008	0.012

^aHRs and 95% CIs computed using IPW Cox models adjusted for age, center, smoking status, daily alcohol consumption, and personal history of coronary disease and stroke plus three other MetS components.
^bP for interaction compared HRs associated with 1-SD decrease in hormone levels in men with each MetS component to HRs in those without MetS [i.e., HR 0.87 (95% CI 0.73–1.03) and 0.97 (0.82–1.16) for total and bioavailable testosterone, respectively; see Fig. 2]. SDs are 6.2 and 3.5 for total and bioavailable testosterone, respectively.

prevalence of diabetes and hypertension [14–16]. Finally, our results are consistent with a recent large study that found no association between endogenous testosterone and cerebrovascular disease [33], although modification by MetS was not investigated. With respect to exogenous testosterone, our results were deeply consistent with those from a study in which reduced mortality in response to testosterone supplementation was restricted to men with diabetes [34].

By contrast, our results are inconsistent with some other findings. The Fremantle Diabetes Study phase II of 788 men with diabetes showed a U-shaped association of total testosterone with all-cause mortality [35]. In addition, a recent prospective cohort study of 531 men with diabetes failed to show an association of total testosterone with the risk of death [36]. Both studies presented some differences compared with the 3C study, including the age of the participants (younger than in the 3C study), the source population (outpatients *vs.* community-based), the type of testosterone assay, and the availability of variables for multivariable analyses.

As we were not able to examine the temporality of the relation between testosterone and MetS, and our analyses rely on observational data, their findings need to be interpreted with caution in terms of causality. Nevertheless, our findings are consistent with the hypothesis that the effect of low testosterone on mortality is partly mediated by MetS and their interaction. The adverse effect of low testosterone could be partly mediated by its negative impact on the risk factors that define MetS. In the elderly, the multicomponent of MetS may act synergistically and could have a causal impact on mortality risk [37]. However, further adjustment for BMI or waist circumference, hypercholesterolemia, hypertension, and diabetes did not have a substantial impact and led to similar results compared with the main analyses. Adjustment for statin use and hypothyroidism, two conditions that could influence MetS and mortality, did not change the results either. Nevertheless, we cannot exclude that this association may be explained by other risk factors that were not assessed in the 3C study. The potential causal role of testosterone on mortality has also been investigated through a Mendelian randomization approach. One study concluded that there was no evidence in favor of a causal association of testosterone with cardiometabolic risk factors and mortality [38]. However, this study had low statistical power due to the small sample size, and the authors used an indirect marker of testosterone. On the contrary, in another recent Mendelian randomization study with a larger sample size, genetically predicted anti-Müllerian hormone and testicular dysgenesis syndrome, which are both related to lower androgens in men, were inversely associated with ischemic heart disease [39]. In contrast, it is also possible that low testosterone does not play a causal role. In this case, low testosterone may be a marker for an underlying condition rather than a direct contributor to the mortality and simply reflects poor health. Low testosterone represents a biomarker of poor health in older men, as it is associated with acute and chronic medical conditions [40–42]. Testosterone may act as a biomarker of illness, similar to other hormones, such as thyroid hormone that declines with illness severity and predicts mortality [43, 44]. Different mechanisms, including low-grade inflammation, could be involved. In the 3C study, baseline fibrinogen and C-reactive protein were measured but adjustment for these variables did not attenuate the association between testosterone and mortality (data not shown). Other inflammatory parameters, especially those closely linked to adiposity, could contribute to our results. The negative impact of low testosterone could also be mediated by depressive symptoms or altered cognitive function. However, further adjustment for depression (using the Center for Epidemiologic Studies Depression scale) and Mini-Mental State Examination did not change our results.

Our study presents several strengths. First, the 3C study is a large prospective and multicenter study with a long follow-up; exclusion of deaths occurring during the first 2 and 4 years of follow-up did not change the results, which suggests that reverse causation is unlikely to explain our findings. Second, we reached similar conclusions when we used two other MetS definitions. Third, baseline data collected by standardized questionnaires included detailed

information for the definition of MetS and multivariable analyses. Fourth, data on current medication allowed us to exclude participants who used drugs susceptible to influence hormone levels. Finally, hormone measurements were conducted without knowledge of vital status and with a sensitive method that yielded no values under the detectable concentrations.

Our study also has limitations. First, our analyses were performed in a random stratified subcohort of men rather than in all men, and the number of deaths was therefore relatively small. There were minor differences between men included in the subcohort and the other men. To take into account the sampling of the subcohort and to correct for the small differences observed between the subcohort and the other men, we used IPW. Availability of data at study recruitment and over the follow-up allowed us to incorporate this information into the construction of the weights. The adequacy of the IPW procedure was demonstrated by the similarity of the associations of cardiometabolic risk factors, personal medical history, and mortality between conventional analysis (on the whole cohort) and the analytic sample with or without IPW. Therefore, although this approach led to less precise estimates (compared with using the whole cohort), the random sampling is unlikely to lead to biased estimates. Although the number of deaths was limited, several associations, including interaction tests, were statistically noteworthy, and *post hoc* power calculations are not useful in this context. Second, the testosterone measurement was carried out by RIA rather than the state-of-the-art gas chromatography mass spectrometry method. However, validation studies showed that RIA provided accurate results in terms of relative ranking and was therefore adequate for large epidemiological investigations in which population-level inferences are more of interest than subject-specific ones. This limitation of the 3C biological investigations has been already largely discussed by Soisson *et al.* [45, 46]. In addition, our analyses are based on a single measurement of testosterone, and within-subject variability of sex hormones might lead to bias associations toward the null. However, blood samples were collected in the morning from fasting men to minimize diurnal variation [47]; in addition, it is unlikely that variability is differential according to the MetS status and therefore explains the absence of association in men without MetS. Finally, MetS was assessed at baseline only, and we cannot exclude that some men developed MetS during the follow-up, leading to a misclassification of these individuals; however, this would have resulted in an attenuation of associations, making our estimates conservative.

4. Conclusion

Low total and bioavailable testosterone are associated with increased all-cause mortality in elderly men with MetS. Among them, this increase in mortality risk is also observed for men suffering for testosterone deficiency as compared with those with normal or high physiological levels of hormone. By contrast, testosterone was not associated with mortality among men without MetS. The presence of MetS could, at least partly, explain the discrepancy across previous studies. Our data suggest that the response to testosterone therapy in men may depend on the presence of MetS or its components. It would be therefore important to take MetS status into account when examining outcomes related to testosterone level. If confirmed, these results may help clinicians to detect individuals at higher risk of death and requiring intensive medical monitoring.

Acknowledgments

The 3C study is conducted under a partnership agreement among INSERM, Victor Segalen-Bordeaux 2 University, and Sanofi. We thank Julie Setia, Bicêtre Hospital, for excellent technical assistance.

Financial Support: The Fondation pour la Recherche Médicale funded preparation and initiation of the study. The 3C is also supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés, Direction Générale de la Santé, Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale, Institut de la Longévité, Conseils Régionaux of Aquitaine and Bourgogne, Fondation de France, Ministry of

Research-INSERM Programme “Cohortes et collections de données biologiques,” Agence Nationale de la Recherche (ANR PNRA 2006 and LongVie 2007), the “Fondation Plan Alzheimer” (FCS 2009-2012), and the Caisse Nationale de Solidarité pour l'Autonomie. The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Biological assays regarding hemostatic and hormone parameters were supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2007-LVIE-005-01; principal investigator Pierre-Yves Scarabin).

Author Contributions: N.L., A.S.-M., A.D., and A.E. made substantial contributions to analysis and interpretation of data and drafting the article or revising it critically for important intellectual content. S.B.-T. and A.G.-M. made substantial contributions to acquisition of data and drafting the article or revising it critically for important intellectual content. C.H., M.-L.A., and C.T. made substantial contributions to conception and design, acquisition of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content. M.C. made substantial contributions to conception and design, acquisition, analysis, and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content. All authors approved the final version. M.C. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Correspondence: Marianne Canonico, PhD, Centre for Research in Epidemiology and Population Health, 16 Avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex, France. E-mail: marianne.canonico@inserm.fr.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References and Notes

1. Kloner RA, Carson C III, Dobs A, Kopecky S, Mohler ER III. Testosterone and Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2016;**67**(5):545–557.
2. Brodsky IG, Balagopal P, Nair KS. Effects of testosterone replacement on muscle mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men—a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;**81**(10):3469–3475.
3. Stanworth RD, Jones TH. Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice. *Clin Interv Aging*. 2008;**3**(1):25–44.
4. Rao PM, Kelly DM, Jones TH. Testosterone and insulin resistance in the metabolic syndrome and T2DM in men. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;**9**(8):479–493.
5. Rotter I, Kosik-Bogacka D, Dołęgowska B, Skonieczna-Zydecka K, Pawlukowska W, Laszczyńska M. Analysis of relationships between the concentrations of total testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate and the occurrence of selected metabolic disorders in aging men [published correction appears in *Aging Male*. 2017;**20**(3):i]. *Aging Male*. 2015;**18**(4):249–255.
6. Blaya R, Thomaz LD, Guilhermano F, Paludo AO, Rhoden L, Halmenschlager G, Rhoden EL. Total testosterone levels are correlated to metabolic syndrome components. *Aging Male*. 2016;**19**(2):85–89.
7. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;**96**(10):3007–3019.
8. Shores MM, Matsumoto AM, Sloan KL, Kivlahan DR. Low serum testosterone and mortality in male veterans. *Arch Intern Med*. 2006;**166**(15):1660–1665.
9. Khaw KT, Dowsett M, Folkard E, Bingham S, Wareham N, Luben R, Welch A, Day N. 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**(23):2694–2701.
10. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J. Low serum testosterone and mortality in older men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;**93**(1):68–75.
11. Lehtonen A, Huupponen R, Tuomilehto J, Lavonius S, Arve S, Isoaho H, Huhtaniemi I, Tilvis R. Serum testosterone but not leptin predicts mortality in elderly men. *Age Ageing*. 2008;**37**(4):461–464.
12. Tivesten A, Vandenput L, Labrie F, Karlsson MK, Ljunggren O, Mellström D, Ohlsson C. Low serum testosterone and estradiol predict mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;**94**(7):2482–2488.
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**(3):332–340.

14. Szulc P, Clausturat B, Delmas PD. Serum concentrations of 17beta-E2 and 25-hydroxycholecalciferol (25OHD) in relation to all-cause mortality in older men—the MINOS study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009; **71**(4):594–602.
15. Vikan T, Schirmer H, Njølstad I, Svartberg J. Endogenous sex hormones and the prospective association with cardiovascular disease and mortality in men: the Tromsø Study. *Eur J Endocrinol*. 2009; **161**(3):435–442.
16. Menke A, Guallar E, Rohrmann S, Nelson WG, Rifai N, Kanarek N, Feinleib M, Michos ED, Dobs A, Platz EA. Sex steroid hormone concentrations and risk of death in US men. *Am J Epidemiol*. 2010; **171**(5):583–592.
17. Haring R, Teng Z, Xanthakis V, Coviello A, Sullivan L, Bhasin S, Murabito JM, Wallaschofski H, Vasan RS. Association of sex steroids, gonadotrophins, and their trajectories with clinical cardiovascular disease and all-cause mortality in elderly men from the Framingham Heart Study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013; **78**(4):629–634.
18. Yeap BB, Alfonso H, Chubb SA, Handelsman DJ, Hankey GJ, Almeida OP, Golledge J, Norman PE, Flicker L. In older men an optimal plasma testosterone is associated with reduced all-cause mortality and higher dihydrotestosterone with reduced ischemic heart disease mortality, while estradiol levels do not predict mortality. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; **99**(1):E9–E18.
19. Holmboe SA, Vradi E, Jensen TK, Linneberg A, Husemoen LL, Scheike T, Skakkebaek NE, Juul A, Andersson AM. The association of reproductive hormone levels and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; **100**(12):4472–4480.
20. Lin JW, Lee JK, Wu CK, Caffrey JL, Chang MH, Hwang JJ, Dowling N, Lin YS. Metabolic syndrome, testosterone, and cardiovascular mortality in men. *J Sex Med*. 2011; **8**(8):2350–2360.
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**(6):316–325.
22. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet*. 2005; **366**(9491):1059–1062.
23. Cuzin B, Giuliano F, Jamin C, Legros JJ, Lejeune H, Rigot JM, Roger M; International Society for the Study of the Aging Male. [Investigation, treatment and surveillance of late-onset hypogonadism in males: the official guidelines of the International Society for the Study of the Aging Male (ISSAM) with comments]. *Prog Urol*. 2004; **14**(1):1–14.
24. Kenny AM, Prestwood KM, Gruman CA, Marcello KM, Raisz LG. Effects of transdermal testosterone on bone and muscle in older men with low bioavailable testosterone levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001; **56**(5):M266–M272.
25. Cole SR, Hernán MA. Constructing inverse probability weights for marginal structural models. *Am J Epidemiol*. 2008; **168**(6):656–664.
26. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*. 2005; **112**(17):2735–2752.
27. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med*. 1999; **16**(5):442–443.
28. Ickram MA, VanderWeele TJ. A proposed clinical and biological interpretation of mediated interaction. *Eur J Epidemiol*. 2015; **30**(10):1115–1118.
29. Valeri L, Vanderweele TJ. Mediation analysis allowing for exposure-mediator interactions and causal interpretation: theoretical assumptions and implementation with SAS and SPSS macros. *Psychol Methods*. 2013; **18**(2):137–150.
30. Valeri L, VanderWeele TJ. SAS macro for causal mediation analysis with survival data. *Epidemiology*. 2015; **26**(2):e23–e24.
31. Muraleedharan V, Marsh H, Kapoor D, Channer KS, Jones TH. Testosterone deficiency is associated with increased risk of mortality and testosterone replacement improves survival in men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2013; **169**(6):725–733.
32. Daka B, Langer RD, Larsson CA, Rosén T, Jansson PA, Råstam L, Lindblad U. Low concentrations of serum testosterone predict acute myocardial infarction in men with type 2 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord*. 2015; **15**(1):35.
33. Srinath R, Gottesman RF, Hill Golden S, Carson KA, Dobs A. Association between endogenous testosterone and cerebrovascular disease in the ARIC Study (Atherosclerosis Risk in Communities). *Stroke*. 2016; **47**(11):2682–2688.

34. Shores MM, Smith NL, Forsberg CW, Anawalt BD, Matsumoto AM. Testosterone treatment and mortality in men with low testosterone levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;**97**(6):2050–2058.
35. Hamilton EJ, Davis WA, Makepeace A, Lim EM, Yeap BB, Peters KE, Davis TM. Prevalence and prognosis of a low serum testosterone in men with type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study Phase II. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;**85**(3):444–452.
36. Tint AN, Hoermann R, Wong H, Ekinci EI, MacIsaac RJ, Jerums G, Zajac JD, Grossmann M. Association of sex hormone-binding globulin and free testosterone with mortality in men with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2016;**174**(1):59–68.
37. Akbaraly TN, Kivimaki M, Ancelin ML, Barberger-Gateau P, Mura T, Tzourio C, Touchon J, Ritchie K, Berr C. Metabolic syndrome, its components, and mortality in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;**95**(11):E327–E332.
38. Haring R, Teumer A, Völker U, Dörr M, Nauck M, Biffar R, Völzke H, Baumeister SE, Wallaschofski H. Mendelian randomization suggests non-causal associations of testosterone with cardiometabolic risk factors and mortality. *Andrology.* 2013;**1**(1):17–23.
39. Zhao JV, Schooling CM. Endogenous androgen exposures and ischemic heart disease, a separate sample Mendelian randomization study. *Int J Cardiol.* 2016;**222**:940–945.
40. Spratt DI, Cox P, Orav J, Moloney J, Bigos T. Reproductive axis suppression in acute illness is related to disease severity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;**76**(6):1548–1554.
41. Matsumoto AM. Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002;**57**(2):M76–M99.
42. Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2005;**26**(6):833–876.
43. Wang F, Pan W, Wang H, Wang S, Pan S, Ge J. Relationship between thyroid function and ICU mortality: a prospective observation study. *Crit Care.* 2012;**16**(1):R11.
44. Rodondi N, den Elzen WP, Bauer DC, Cappola AR, Razvi S, Walsh JP, Asvold BO, Iervasi G, Imaizumi M, Collet TH, Bremner A, Maisonneuve P, Sgarbi JA, Khaw KT, Vanderpump MP, Newman AB, Cornuz J, Franklyn JA, Westendorp RG, Vittinghoff E, Gussekloo J; Thyroid Studies Collaboration. Subclinical hypothyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality. *JAMA.* 2010;**304**(12):1365–1374.
45. Soisson V, Brailly-Tabard S, Helmer C, Rouaud O, Ancelin ML, Zerhouni C, Guiochon-Mantel A, Scarabin PY. A J-shaped association between plasma testosterone and risk of ischemic arterial event in elderly men: the French 3C cohort study. *Maturitas.* 2013;**75**(3):282–288.
46. Soisson V, Brailly-Tabard S, Empana JP, Féart C, Ryan J, Bertrand M, Guiochon-Mantel A, Scarabin PY. Low plasma testosterone and elevated carotid intima-media thickness: importance of low-grade inflammation in elderly men. *Atherosclerosis.* 2012;**223**(1):244–249.
47. 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;**94**(3):907–913.

Supplementary tables

Table S1: Baseline characteristics of men in the sub-cohort and the other men

Characteristics	Not in the Sub-cohort (n=3155)	Sub-cohort (n=495)	p-value
Sociodemographic			
Age (years)	74.2 (5.6)	73.9 (5.4)	0.381
Center			0.745
Bordeaux	709 (22.5)	107 (21.6)	
Dijon	1635 (51.8)	253 (51.1)	
Montpellier	811 (25.7)	135 (27.3)	
Education level ^a			0.397
No education or primary school	931 (29.5)	135 (27.3)	
Secondary school	817 (25.9)	141 (28.5)	
High-school or university degree	1404 (44.5)	218 (44.1)	
Anthropometric measures			
BMI (kg/m ²)	26.2 (3.4)	26.1 (3.2)	0.690
Waist circumference (cm)	96.1 (10.2)	96.0 (9.8)	0.779
Waist/hip ratio	0.94 (0.9-1.0)	0.95 (0.9-1.0)	0.294
Cardiovascular risk factors			
Smoking ^b			0.737
Never	961 (30.5)	149 (30.1)	
Former	1933 (61.3)	310 (62.6)	
Current	259 (8.2)	36 (7.3)	
Daily alcohol consumption ^a			0.052
Never	2870 (91.1)	464 (93.7)	
Former	195 (6.2)	17 (3.4)	
Current	86 (2.7)	14 (2.8)	
Hypertension ^c	2643 (83.8)	398 (80.4)	0.062
Hypercholesterolemia ^c	1425 (47.2)	215 (43.4)	0.121
Diabetes ^d	427 (14.4)	59 (11.9)	0.150
Hypothyroidism	71 (2.3)	12 (2.4)	0.810
Statins use	929 (29.5)	126 (25.5)	0.069
Personal history			
Coronary heart disease ^b	555 (17.6)	64 (12.9)	0.010
Stroke ^e	186 (5.9)	27 (5.5)	0.710
Mental health			
MMSE scores ^f			0.488
Low	272 (8.7)	35 (7.1)	
Medium	296 (9.5)	49 (10.0)	
Normal	2577 (81.8)	408 (82.9)	
Biologicals parameters			
Total cholesterol (mmol/L)	5.5 (0.9)	5.6 (0.9)	0.379
LDL-C (mmol/L) ^g	3.5 (0.8)	3.6 (0.8)	0.162
HDL-C (mmol/L)	1.4 (0.4)	1.4 (0.3)	0.090
Triglycerides (mmol/L)	1.2 (0.9-1.6)	1.1 (0.9-1.5)	0.034
Glucose (g/L) ^d	5.1 (4.7-5.6)	4.9 (4.7-5.5)	0.200
Deaths (12-year follow-up)	1256 (39.8)	195 (39.4)	0.861

Data are expressed as n (%) or means (SD) except for triglycerides and glucose expressed as median (IQR).

SD= standard deviation; IQR = interquartile range; MMSE=Mini Mental State Examination.

p-value from t-test or Chi².

Missing data: ^a n = 4, ^b n = 2, ^c n = 135, ^d n = 185, ^e n = 48, ^f n = 33, ^g n = 3.

Table S2: All-cause mortality related to baseline diabetes, hypertension, and history of stroke or coronary heart disease in the overall cohort and in the sub-cohort of men, with or without inverse probability weighting

	Overall cohort of men (n= 3650)			Sub-cohort of men (n= 495)				
	No of deaths (n=1445)			No of deaths (n=195)				
	No. of exposed cases	HR (95% CI)	p-value	No. of exposed cases	HR (95% CI)	p	HR (95% CI) ¥	p-value
Diabetes	236	1.52 (1.32-1.75)	< 0.010	29	1.54 (1.04-2.29)	0.032	1.52 (1.02-2.26)	0.039
Hypertension	1257	1.43 (1.22-1.66)	< 0.010	166	1.56 (1.05-2.31)	0.028	1.56 (1.09-2.24)	0.015
Stroke	136	2.27 (1.90-2.71)	< 0.010	18	2.19 (1.35-3.56)	0.002	2.27 (1.43-3.61)	0.001
Coronary heart disease	320	1.63 (1.44-1.84)	< 0.010	33	1.60 (1.13-2.39)	0.009	1.64 (1.06-2.41)	0.026

Crude analyses.

¥: Inverse probability weighted Cox models.

Table S3: Baseline characteristics of the sample, according to tertile of testosterone, in the 3C cohort study.

Characteristics	T1 (<14.33) (n=147)	T2 (14.33-19.33) (n=146)	T3 (>19.33) (n=151)	P trend
Sociodemographic				
Age (years)	73.7 (5.3)	73.7 (5.1)	73.3 (4.7)	0.487
Center				0.183
Bordeaux	38 (25.9)	30 (20.6)	26 (17.2)	
Dijon	72 (49.0)	78 (53.4)	84 (55.6)	
Montpellier	37 (25.1)	38 (26.0)	41 (27.2)	
Education level				0.337
No education or primary school	40 (27.2)	29 (19.9)	51 (33.8)	
Secondary school	49 (33.3)	37 (25.3)	44 (29.1)	
High-school or university degree	58 (39.5)	80 (54.8)	56 (37.1)	
Anthropometric measures				
Waist (cm)	98.0 (9.9)	96.6 (9.2)	93.4 (9.9)	0.002
BMI (kg/m ²) ^a	26.8 (3.6)	26.2 (2.9)	25.5 (3.0)	<0.001
Cardiovascular risk factors				0.294
Smoking				
Never	41 (27.9)	51 (34.9)	44 (29.1)	0.422
Former	98 (66.7)	88 (60.3)	89 (58.9)	
Current	8 (5.4)	7 (4.8)	18 (11.9)	
Daily alcohol consumption				
Never	139 (94.6)	138 (94.5)	139 (92.1)	0.309
Former	4 (2.7)	6 (4.1)	5 (3.3)	
Current	4 (2.7)	2 (1.4)	7 (4.6)	
Hypertension	112 (76.2)	117 (80.1)	124 (82.1)	0.206
Hypercholesterolemia	62 (42.2)	68 (46.6)	69 (45.7)	0.545
Diabetes	52 (35.4)	37 (25.3)	23 (15.2)	<0.001
MetS-IDF	49 (33.3)	33 (22.6)	24 (15.9)	<0.001
Hypothyroidism	3 (2.0)	2 (1.4)	5 (3.3)	0.228
Statins use	43 (29.3)	33 (22.6)	42 (27.8)	0.393
Medical history				
Coronary heart disease	17 (11.6)	16 (11.0)	23 (15.2)	0.338
Stroke ^b	11 (7.6)	6 (4.2)	3 (2.0)	0.022
Biologicals parameters				
Total cholesterol (mmol/L)	5.5 (0.8)	5.7 (0.9)	5.6 (0.9)	0.448
LDL-C (mmol/L) ^c	3.5 (0.8)	3.7 (0.8)	3.5 (0.8)	0.903
HDL-C (mmol/L)	1.3 (0.3)	1.4 (0.3)	1.5 (0.4)	<0.001
Triglycerides (mmol/L)	1.2 (0.9-1.6)	1.1 (0.9-1.5)	1.0 (0.8-1.4)	0.013
Glucose (g/L)	5.2 (4.8-5.7)	5.0 (4.7-5.4)	4.9 (4.6-5.3)	<0.001
Total testosterone (nmol/L)	11.1 (2.9)	16.8 (1.5)	24.1 (4.5)	-
Bioavailable testosterone (nmol/L)	6.8 (1.9)	9.9 (1.6)	13.5 (2.9)	<0.001

Data are expressed as n (%) or means (SD) except for triglycerides and glucose expressed as median (IQR).

T: Tertile of testosterone (cut-off in nmol/L), SD= standard deviation; IQR = interquartile range; MetS-IDF = Metabolic syndrome according to the International Diabetes Federation.

P trend based on Cochran-Armitage Test or analysis of variance

Missing data: ^a n = 1, ^b n = 8, ^c n = 3.

Table S4: All-cause mortality according to baseline hormones concentrations by metabolic syndrome status in the 3C cohort study[‡]

Testosterone	Without MetS (n= 338)					With MetS (n= 106)					p- interaction
	Model 1			Model 2		Model 1			Model 2		
	No. of deaths	HR (95% CI)	P- value	HR (95% CI)	P- value	No. of deaths	HR (95% CI)	P- value	(HR 95% CI)	P- value	
Total testosterone (nmol/L)											
T1 (<14.33)	34	0.69 (0.45-1.05)	0.047	0.79 (0.51-1.21)	0.273	20	5.31 (1.27-22.18)	0.022	5.08 (1.14-22.57)	0.033	0.002
T2 (14.33-19.33)	43	0.76 (0.51-1.12)	0.160	0.83 (0.55-1.25)	0.373	13	3.69 (0.87-15.73)	0.078	3.94 (0.92-16.92)	0.066	
T3 (> 19.33)	53	1.00 [181]	-	1.00 [181]	-	3	1.00 [181]	-	1.00 [181]	-	
<i>p for linear trend</i>			0.073		0.263			0.015		0.033	
Low level < 11	13	0.62 (0.35-1.11)	0.110	0.65 (0.36-1.17)	0.155	12	3.67 (1.73-7.82)	0.001	3.14 (1.33-7.40)	0.009	0.004
High level ≥ 11	117	1.00 [181]		1.00 [181]		24	1.00 [181]		1.00 [181]		
Bioavailable testosterone (nmol/L)											
T1 (<8.42)	40	0.84 (0.56-1.26)	0.395	0.94 (0.62-1.43)	0.767	20	2.48 (0.90-6.84)	0.078	2.04 (0.70-5.95)	0.190	0.008
T2 (8.42-11.06)	42	0.81 (0.54-1.21)	0.301	0.90 (0.60-1.36)	0.632	10	1.35 (0.46-3.92)	0.583	1.66 (0.54-5.08)	0.374	
T3 (>11.06)	48	1.00 [181]	-	1.00 [181]	-	6	1.00 [181]	-	1.00 [181]	-	
<i>p for linear trend</i>			0.387		0.761			0.027		0.047	
Low level < 4.4	1	na		na		5	5.51 (1.97-15.43)	0.001	3.47 (1.12-10.80)	0.032	0.002
High level ≥ 4.4	129	na		na		31	1.00 [181]		1.00 [181]		

‡: Inverse probability weighted Cox models.

T: Tertiles.

Model 1: adjusted for age and center; model 2: model 1 + smoking status, daily alcohol consumption and personal history of coronary disease and stroke.

Table S5: Direct, indirect, and total effects of total and bioavailable testosterone level on all-cause mortality and the proportion of the total effect mediated by metabolic syndrome

Hormones	Effect	Estimate^a	95% CI^b
Total testosterone	Controlled direct effect	1.07	(0.91-1.26)
	Natural direct effect	0.97	(0.86-1.16)
	Natural indirect effect	0.97	(0.94-0.99)
	Total effect	0.94	(0.84-1.13)
	Proportion mediated	0.56	-
Bioavailable testosterone	Controlled direct effect	0.97	(0.79-1.22)
	Natural direct effect	0.87	(0.73-1.10)
	Natural indirect effect	0.93	(0.86-0.99)
	Total effect	0.81	(0.68-1.04)
	Proportion mediated	0.31	-

^a: Accelerated failure time model adjusted for age, center, smoking status, daily alcohol consumption and personal history of coronary disease and stroke. Estimates are mean survival ratios and are computed for changing the testosterone level from a 'high' level (total testosterone, 17.89 nmol/L; bioavailable testosterone, 9.97 nmol/L) to a 'low' level (total testosterone, 9.15 nmol/L; bioavailable testosterone, 2.72 nmol/L); these values are the medians of testosterone level in the two groups defined by the clinically relevant cutoff (total testosterone, 11 nmol/L; bioavailable testosterone, 4.4 nmol/L; Table S3). Mean survival ratios below 1 indicate that decreasing testosterone from high to low is associated with worse survival.

^b: The 95% confidence intervals (CI) of these estimates were computed using the bootstrap (2000 samples).

Table S6: HRs (95% CI) of all-cause mortality according to baseline hormones concentrations by metabolic syndrome status in the 3C cohort study[‡]

	Without MetS (n= 338)		With MetS (n= 106)		
	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value	p- interaction
For 1 SD decrease in total testosterone					
Model 2	0.87 (0.73-1.03)	0.106	1.78 (1.13-2.78)	0.012	0.002
Model 2 + MetS components	0.87 (0.72-1.04)	0.134	1.78 (1.09-2.92)	0.022	0.001
Model 2 + Hypothyroidism	0.86 (0.72-1.02)	0.082	1.82 (1.15-2.88)	0.010	0.002
Model 2 + Statins use	0.87 (0.73-1.03)	0.104	1.71 (1.01-2.70)	0.022	0.002
Model 2 + MetS components, hypothyroidism and statins use	0.86 (0.71-1.03)	0.104	1.76 (1.05-2.94)	0.038	0.001
For 1 SD decrease in bioavailable testosterone					
Model 2	0.97 (0.82-1.16)	0.752	1.83 (1.17-2.86)	0.009	0.008
Model 2 + MetS components	0.99 (0.83-1.19)	0.919	1.83 (1.12-2.97)	0.015	0.006
Model 2 + Hypothyroidism	0.96 (0.81-1.15)	0.675	1.86 (1.18-2.93)	0.008	0.007
Model 2 + Statins use	0.97 (0.82-1.16)	0.749	1.76 (1.11-2.78)	0.016	0.009
Model 2 + MetS components, hypothyroidism and statins use	0.98 (0.82-1.18)	0.853	1.78 (1.08-2.95)	0.024	0.006

Number of deaths = 130 and 36 in subjects without MetS and with MetS, respectively.

[‡]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Model 2 adjusted for: age, center, smoking status, daily alcohol consumption and personal history of coronary disease and stroke.

MetS components are: diabetes, hypertriglyceridemia, low-HDL-C, hypertension, and central obesity

Table S7: HRs (95% CI) of all-cause mortality related to baseline hormones concentrations by metabolic syndrome status according to the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP: ATPIII) criteria[‡]

Without MetS 1 (n= 397)				With MetS (n= 47)			
		Model	Model 2			Model 1	Model 2
	No. of events	HR (95% CI)	HR (95% CI)	No. of events	HR (95% CI)	HR (95% CI)	P-interaction
Total testosterone							
HR for 1 SD decrease	146	0.87 (0.74-1.02)	0.90 (0.76-1.06)	20	3.07 (1.45-6.49)	2.99 (1.20-7.48)	0.003
Bioavailable testosterone							
HR for 1 SD decrease	146	0.97 (0.82-1.14)	1.01 (0.86-1.19)	20	3.18 (1.55-6.49)	3.14 (1.28-7.69)	0.003

[‡]: Inverse probability weighted Cox models.

SD: Standard Deviation (6.2 and 3.5 nmol/L for total and bioavailable testosterone, respectively).

Model 1: adjusted for age and center; model 2: model 1 + smoking status, daily alcohol consumption and personal history of coronary disease and stroke.

Table S8: All-cause mortality related to baseline hormones concentrations by metabolic syndrome status according to the European Group for the Study of Insulin Resistance criteria[‡]

Without MetS 1 (n= 385)				With MetS (n= 59)			
		Model 1		Model 1		Model 2	
	No. of events	HR (95% CI)	HR (95% CI)	No. of events	HR (95% CI)	HR (95% CI)	P-interaction
Total testosterone							
HR 1 SD decrease	137	0.85 (0.72-1.00)	0.89 (0.75-1.06)	29	1.79 (1.10-2.92)	1.47 (0.81-2.68)	0.014
Bioavailable testosterone							
HR 1 SD decrease	137	0.95 (0.80-1.13)	0.99 (0.84-1.18)	29	1.74 (1.10-2.76)	1.45 (0.80-2.63)	0.030

[‡]: Inversely probability weighted Cox models.

SD: Standard Deviation (6.2 and 3.5 nmol/L for total and bioavailable testosterone, respectively).

Model 1: adjusted for age and center; model 2: model 1 + smoking status, daily alcohol consumption and personal history of coronary disease and stroke.

E2 : Deuxième article : ESTRADIOL LEVEL, ESTROGEN RECEPTORS, AND MORTALITY IN ELDERLY MEN: THE THREE-CITY COHORT STUDY.

Clinical Endocrinology



Estradiol Level, Estrogen Receptors, and Mortality in Elderly Men: The Three-City Cohort Study.

Journal:	<i>Clinical Endocrinology</i>
Manuscript ID	CEN-2018-000312.R1
Manuscript Type:	2 Original Article - Europe, excluding UK
Date Submitted by the Author:	09-Jun-2018
Complete List of Authors:	LAOUALI, Nasser; Centre de recherche en Epidemiologie et Sante des Populations, Epidemiology of Ageing and Age-related Diseases Brailly-Tabard, Sylvie; Univ Paris-Sud; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Molecular Genetics and Hormonology Helmer, Catherine; 4Univ. Bordeaux, INSERM, Bordeaux Population Health Research Center, UMR 1219, CHU Bordeaux, NSERM, Bordeaux Population Health Research Center, UMR 1219 Ancelin, Marie-Laure; Inserm, U1061 Tzourio, Christophe; ISPED, INSERM Elbaz, Alexis; Centre de recherche en Epidemiologie et Sante des Populations, INSERM Guiochon-Mantel, Anne; AP-HP, Service de Génétique moléculaire CANONICO, Marianne; Inserm, U780
Key Words:	Sex hormone, Genetic polymorphisms, Cardiovascular mortality, Cancer mortality, Aging

SCHOLARONE™
Manuscripts

Estradiol Level, Estrogen Receptors, and Mortality in Elderly Men: The Three-City Cohort Study.

Estradiol Level and Mortality in Elderly Men

Nasser Laouali¹, Sylvie Brailly-Tabard^{2,3}, Catherine Helmer⁴, Marie-Laure Ancelin⁵, Christophe Tzourio⁴, Alexis Elbaz¹, Anne Guiochon-Mantel^{2,3}, Marianne Canonico^{1*}

¹Paris-Saclay University, Paris-South University, UVSQ, Center for Research in Epidemiology and Population Health, INSERM, Villejuif, F-94807, France ; ²Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, AH-HP, CHU Bicêtre, F-94275, France ; ³INSERM UMR_S U1185, Fac Med Paris Sud, Univ. Paris Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, F-94276, France ; ⁴Univ. Bordeaux, INSERM, Bordeaux Population Health Research Center, UMR 1219, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France ; ⁵INSERM, Univ Montpellier, Neuropsychiatry: Epidemiological and Clinical Research, Montpellier, France .

Address for Correspondence:

Marianne Canonico
CESP Centre for Research in Epidemiology and Population Health
16 Avenue Paul Vaillant Couturier
94807 Villejuif Cedex France
Tel.: 00-33-145595166
E-mail: marianne.canonico@inserm.fr

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. We thank Julie Setia, Bicêtre Hospital, for her excellent technical assistance.

Disclosure Statement: The authors report no conflicts of interest in this work.

Context: Although endogenous estradiol, generally considered as the female hormone, has been little investigated in men, it could play a role in men's health, mortality in particular. The influence of estrogen receptors (ER) genetic polymorphisms on this relationship has never been studied.

Design and Participants: The Three-City cohort study included (1999-2001) 3650 men ≥ 65 years who were followed for mortality over 12 years. At baseline, total estradiol (tE2) was measured and ER genotyped in a random subsample of 472 men without hormonal treatment. Free estradiol (fE2) was estimated using Vermeulen and Södergard algorithms.

Main Outcome: Mortality data were obtained from death certificates. We used inverse probability weighted Cox models to examine the association of estradiol with all-cause and cause-specific mortality and its interaction with ER genetic polymorphisms.

Results: 183 men died over the follow-up (cardiovascular disease (CVD), n=44; cancer, n=57; other causes, n=82). After adjustment, there was a quadratic relationship of all-cause mortality with tE2 and fE2 (p-quadratic=0.04 and 0.05, respectively), with higher mortality for the top and bottom tertiles compared to the middle one. These associations were stronger for CVD mortality (p-quadratic=0.01 and 0.02 for tE2 and fE2, respectively) and disappeared for cancer mortality. There was no evidence of an interaction of estradiol with any ER polymorphisms on all-cause mortality.

Conclusion: In elderly men, we showed a nonlinear association of tE2 and fE2 with all-cause mortality. These quadratic relationships were stronger for CVD mortality and did not exist for cancer mortality. ER genetic polymorphisms did not modify this association.

Keywords: Sex hormone, Genetic polymorphisms, Risk, Cardiovascular mortality, Cancer mortality, Aging.

1. Introduction

The levels of sex steroids decline progressively in men throughout adult life, and their relationship with health during ageing is likely to be complex (1). Testosterone is the main sex steroid hormone in men and the most investigated in relation to health outcomes. Estradiol, considered for a long time as the female hormone, is mainly synthesized in men from testosterone via adipose aromatase (2), but has not been widely investigated in this population. Although its concentration in men is about 200 times lower than that of testosterone, it is higher than the concentration in postmenopausal women and comparable to estradiol levels found in women in the early follicular phase of the menstrual cycle (3). In addition, it has been suggested that estradiol could play a crucial role in a number of physiologic functions in men, including regulation of body fat and sexual function (4), bone metabolism (5,6), brain functioning (7), and regulation of testosterone biosynthesis and spermatogenesis (8). In women, there is some evidence that high levels of endogenous estradiol may be associated with increased mortality (9,10). Few studies have examined this question in men, with inconsistent findings. While some studies showed no association (11-14), other studies found significant associations but in opposite directions (15-18). In addition, most studies focused on all-cause mortality, and cause-specific mortality has been little investigated (19).

Estrogens mainly act through two distinct types of estrogen receptors (ER), ER α encoded by the *ESR1* gene and ER β encoded by the *ESR2* gene (20,21). Functional genetic polymorphisms have been identified in both genes that could modify ER transcription and may influence the occurrence of different health outcomes in both men and women (22-24). In women, ER genetic polymorphisms modify the association of endogenous estradiol with breast cancer and ischemic arterial disease (25,26). In men, the association of ER genetic

25 polymorphisms with Alzheimer disease, cardiovascular disease (CVD) and cancer has been
 26 examined (27-29), but no studies investigated the interaction between ER genetic
 27 polymorphisms and estradiol on mortality risk. Such an interaction, if confirmed, could
 28 account for inconsistent results of previous studies.

29 We used data from the French Three-City (3C) prospective cohort study to investigate
 30 the relationship of estradiol levels with all-cause and cause-specific mortality in men after 65
 31 years and to examine whether ER genetic polymorphisms modify the relation with all-cause
 32 mortality.

33

For Peer Review

1 **2. Subjects and Methods**

2 A. Study population

3 The subjects included in the present analysis consist of a subsample of the 3C study, a large
4 ongoing French prospective cohort study on the relationship between vascular risk factors and
5 dementia. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital
6 of Kremlin-Bicêtre, and a written informed consent was obtained from all participants. The
7 detailed protocol is available elsewhere (30). Briefly, 9294 noninstitutionalized subjects (3650
8 men, 5644 women) aged at least 65 years were selected from the electoral rolls of three French
9 cities (Bordeaux, Dijon, Montpellier) between 1999-2001. At baseline, participants were
10 administered standardized questionnaires by trained psychologists or nurses during face-to-face
11 interviews and underwent clinical examinations to measure systolic and diastolic blood
12 pressure, weight, and height. Information recorded included socio-demographic characteristics,
13 education, medical history, medication use, food consumption, and alcohol and tobacco use. At
14 baseline, a blood sample was proposed to all participants, and was obtained for over 90% of the
15 participants.

16 B. Assessment of mortality over the follow-up

17 After the baseline examination, participants were assessed 5 times every 2 to 3 years. The vital
18 status of each participant over the 12-year follow-up was determined based on death
19 certificates, medical records, and reports from the participant's family and physician. A
20 committee reviewed records to determine immediate and underlying causes of death, according
21 to the International Classification of Diseases (ICD) codes, 10th revision.

22 Our analyses are based on all-cause mortality and three main causes of death: CVD, cancer,
23 and other causes. Death from CVD was defined as an immediate cause of death with ICD codes
24 between I00 and I99 (including coronary heart disease, stroke, peripheral vascular disease, and

1 other cardiovascular disease), or equal to R09.2 or R96.0. Death from cancer as an immediate
 2 cause of death included ICD codes between C00 and C97. Other causes of deaths included
 3 infectious and respiratory diseases, digestive causes, trauma, suicide, and death of
 4 undetermined cause.

5 C. Hormones and steroid-bound proteins measurement

6 Total estradiol (tE2), total testosterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), and albumin
 7 were measured in a random subsample of the original cohort. The sub-cohort was selected
 8 within participants with a blood sample, after stratification by sex, center, and age. Our
 9 analyses are therefore based on men from the sub-cohort, after exclusion of men who used
 10 treatments that might change levels of sex steroid hormones (antiandrogens [ATC code:
 11 G03H], hormones and related agents [L02A], hormone antagonists and related agents
 12 [L02AB]) and men with a history of prostate cancer or prostatitis.

13 EDTA plasmas were obtained after one centrifugation at 3000g and were immediately stored at
 14 -80°C in 1 mL plastic tubes.

15 Plasma tE2 was measured by a sensitive direct radioimmunoassay (RIA) with an Orion
 16 Diagnostica device (Spectria, Espoo, Finland). The minimum detectable concentration was 2
 17 pg/mL (7.3 pmol/L). The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 17.6% and
 18 18.1%, respectively, for a tE2 concentration of 3.2 pg/mL (12 pmol/L) and were 2.8% and
 19 5.8%, respectively, for a tE2 concentration of 24 pg/mL (88.1 pmol/L).

20 Total testosterone was also measured by a direct RIA as previously described (31).

21 SHBG was measured by a solid-phase chemiluminescent immunometric assay (Immulite[®],
 22 Siemens Health Diagnostic Products Llanberis, UK) with a minimum detectable concentration
 23 of 0.02 nmol/L. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 2.5% and 5.2%,
 24 respectively at 21 nmol/L.

1 Albumin was measured by colorimetry with bromocresol green (Albumin-Kit, BioMerieux,
2 Marcy l'etoile, France). The minimum detectable concentration was lower than 0.35 g/L (5
3 $\mu\text{mol/L}$) and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 1.9% and 2.5%,
4 respectively for a concentration of 49.2 g/L (714 $\mu\text{mol/L}$).

5 Free estradiol (fE2) concentrations were estimated using a validated algorithm, based on the
6 equations of Södergard et al. (32) and Vermeulen et al. (33) and using the measured total
7 estradiol and testosterone, SHBG, and albumin concentrations, and affinity constants of SHBG
8 and albumin for sex hormones. This method has been shown to have high validity (34).

9 D. Estrogen receptor genetic polymorphisms

10 DNA was extracted from white blood cells (Puregene kit, QIAGEN, France) and stored at -
11 80°C. Genotyping of ER single-nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed by
12 Kbiosciences (Hoddesdon Herts, UK) using a competitive allele-specific PCR genotyping
13 system (KASPar). Fluorescence scanning in a BMG Labtech Pherastar scanner analyzed the
14 amplified PCR products, and the results were interpreted with KlusterCaller 1.1 software (LGC
15 Group). The error rate for the KASPar assay system is less than 0.3%.

16 We genotyped the two most commonly studied *ESR1* SNPs: rs2234693 and rs9340799 located
17 at position 397 and 351 of intron 1, respectively. Three SNPs in the *ESR2* gene were also
18 genotyped: rs1256049, rs4986938, and rs1271572, located at position 1082 of exon 5, at
19 position 1730 of the 3-untranslated region of exon 8, and in the promoter region, respectively.

20 E. Covariates

21 Body-mass index (BMI) was calculated by dividing weight in kg by height in meters squared.
22 Smoking status and alcohol consumption were considered in 3 categories (never, past, current).
23 Education level was divided into 3 categories (no education or primary school, secondary
24 school, high-school or university degree). Hypertension was defined according to the World

1 Health Organization criteria by systolic blood pressure ≥ 140 mmHg or diastolic blood pressure
 2 ≥ 90 mmHg and/or blood-pressure-lowering therapy. Hypercholesterolemia was defined as total
 3 cholesterol ≥ 6.2 mmol/L and/or cholesterol-lowering therapy, and diabetes as fasting blood
 4 glucose ≥ 7 mmol/L and/or treatment for diabetes.

5 F. Statistical analysis

6 The baseline characteristics of the study population were expressed as means $\pm$ standard
 7 deviation (SD) for normally distributed continuous variables, otherwise as medians
 8 (interquartile range) and as numbers (percentages) for categorical variables. Their distributions
 9 according to vital status and tertiles of estradiol were compared using the chi-square test for
 10 categorical variables and Student's t-test or ANOVA for continuous variables after
 11 normalization through log-transformation where appropriate. We assessed whether the
 12 genotypes of each SNP were in Hardy-Weinberg equilibrium using a chi-square test (one
 13 degree of freedom).

14 Hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (95% CI) were estimated with Cox
 15 proportional hazards models and age as the time scale, for all-cause and cause-specific
 16 mortality (35). For all-cause mortality, participants were followed-up until death from any
 17 cause or the date of censoring (date of last news alive); for cause-specific mortality,
 18 participants were followed-up until death from a specific cause or the date of censoring (death
 19 of another cause, date of last news alive). Schoenfeld residuals and log-minus-log-plots were
 20 examined to confirm the proportional hazards assumption. No major violations were observed
 21 in any model.

22 To model the association between estradiol (tE2, fE2) and mortality, we categorized estradiol
 23 level into tertiles; as there was evidence in favour of a non-linear relation with all-cause
 24 mortality, we used the middle tertile as the reference group, and tested for a quadratic
 25 association using orthogonal polynomial contrasts. We then used multivariate restricted cubic

spline (RCS) with three knots placed at the 10th, 50th, and 90th percentiles of the estradiol distribution to provide a graphical presentation when the quadratic association was verified in tertiles analysis (36). Splines allowed us to test whether there was a significant departure from a linear association; if yes, we tested the overall effect of the spline transformations.

Three models are presented: the first model was adjusted for age (time scale) and center; the second was further adjusted for variables associated either with mortality or estradiol level at $p \leq 0.10$ (personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, SHBG); the final model was further adjusted for other traditional risk factors (smoking status, BMI, hypercholesterolemia). For these analyses, we created extra categories for covariates with missing values in order to keep the same number of subjects in the analyses. For each variable included in the models, the interaction with estradiol level on all-cause and cause-specific mortality was tested. None was significant.

We tested multiplicative interactions between each *ESR1* and *ESR2* SNP and tertiles of estradiol on the risk of all-cause mortality under codominant and additive models. We used a Bonferroni correction to account for multiple testing: interactions were considered significant at $p \leq 0.005$ (0.05 divided by 5×2 , corresponding to the number of SNPs and genetic models examined). We did not investigate interactions between SNPs and estradiol on cause-specific mortality due to an insufficient number of events.

Analyses were weighted using stabilized inverse-probability-weighting (IPW) to take into account the fact that estradiol was measured in a random sub-cohort (37). Weights were calculated for each individual based on data on all 3,650 men from the cohort. The probability of being included in the sub-cohort was estimated based on sociodemographic characteristics (age, education, height, occupational position, marital status), health behaviors (smoking, alcohol consumption, fruit and vegetable consumption), cardiometabolic risk factors (BMI, hypertension, diabetes, cholesterol), chronic conditions (coronary heart disease, stroke), and

1 cognitive function (Mini Mental Scale scores) from study baseline and mortality until the end
2 of follow-up.

3 Different sensitivity analyses were performed as described below. First, we estimated the risk
4 of all-cause and cause-specific mortality in relation to estradiol after exclusion of participants
5 who died during the first four years of follow-up. Second, to examine whether the association
6 of estradiol with mortality could partly reflect the role of testosterone, we further adjusted
7 model 3 for this hormone (model 4, supplementary data); in this model, we also included
8 significant interactions of testosterone with diabetes and hypertension. Finally, we used a case-
9 only design to assess the interaction between estrogen receptor polymorphism and estradiol;
10 under the assumption that both factors are independent in controls, this approach allows to
11 increase statistical power (38). We examined associations between estrogen receptor
12 polymorphism and tertiles of estradiol among cases (men who died during the 12 year follow-
13 up) and controls (those who remained alive) using the chi-square test.

14 Statistical analyses were performed using SAS 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

15

3. Results

Figure 1 shows the selection of the study sample. The sub-cohort of 495 men represents a random subsample of all men ($n=3650$); men included in the sub-cohort were similar to the 3155 men not included, except for personal history of coronary heart disease and triglyceride levels (Supplemental Table 1). To validate the random sampling and the adequacy of the IPW procedure, we compared the association of cardiometabolic risk factors (diabetes, hypertension) and medical history (coronary heart disease, stroke) with 12-year mortality in the overall cohort and in the sub-cohort (with and without IPW; Supplemental Table 2). These results support the adequacy of the IPW procedure.

One man from the sub-cohort without estradiol data and 22 men who used treatments that might change estradiol levels were excluded. They did not differ from the others in term of age, socio-demographic characteristics, and risk factors. The remaining 472 subjects constitute the sample for our analysis (Figure 1). Their baseline characteristics are presented in Table 1.

Over 12 years of follow-up, 183 men died (38.8%); 44 died from CVD, 57 from cancer, and 82 from others causes. Compared to survivors, those who died were significantly older at baseline (Table 1); after adjustment for age, they were also more likely than others to be current daily alcohol drinkers and diabetic, and to have a personal history of stroke. Overall, mean concentrations of tE2 and fE2 were 19.8 pg/mL and 0.7 pg/mL, respectively. Mean tE2 tended to be higher in those who died compared to those who remained alive, and the difference was statistically significant for fE2.

There was a strong positive correlation between tE2 and fE2 ($r=0.99$; $p<0.001$); we therefore report here results for tE2 and provide those for fE2 in supplementary material.

1 The baseline characteristics of participants according to tertiles of **tE2** are presented in Table 2
 2 (**supplemental Table 3 for fE2**). Clinical and biological characteristics did not differ according
 3 to tertiles of **tE2**, except for hypertension whose prevalence significantly increased with
 4 estradiol level.

5 Associations of baseline endogenous **tE2** level with all-cause and cause-specific mortality are
 6 presented in Table 3 and Figure 2. There was a significant quadratic relation (model 3, p -
 7 quadratic=0.04) between **tE2** and all-cause mortality, with a higher hazard of death for
 8 participants in the bottom and top tertiles compared to those in the middle one; analyses using
 9 splines confirmed that there was a significant departure from a linear association ($p < 0.01$) and
 10 the graphical representation of the relation is consistent with a quadratic relation. The
 11 association between **tE2** and all-cause mortality was significant for the top tertile (model 3, p =
 12 0.05); it was not significant for the bottom tertile (model 3, p = 0.12), but there was no
 13 significant difference between the top and bottom tertiles (model 3, p = 0.51).

14 This pattern depended on the cause of death (p -heterogeneity < 0.05). The quadratic association
 15 was even more pronounced for CVD mortality (model 3, p -quadratic=0.01, p -departure from
 16 linearity=0.05), with a strong association for the top tertile compared to the middle one (model
 17 3, HR=3.50, 95% CI=1.55-7.90, $p < 0.01$); the association was not significant for the bottom
 18 tertile (model 3, HR=2.05, 95% CI=0.86-4.89, p = 0.10), but there was no significant difference
 19 between the top and bottom tertiles (model 3, p = 0.21). There was no significant association of
 20 **tE2** level with cancer mortality and other cause of mortality.

21 Analysis based on **fE2** lead to similar conclusions (**supplemental Table 4, and supplemental**
 22 **Figure 1 for fE2**).

23 The genotypic frequencies of the SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium. They were
 24 associated neither with mortality nor with estradiol level (Supplemental Tables 5-6). Table 4
 25 shows the association between tertiles of **tE2** and all-cause mortality stratified by the genotypes

1 (supplemental Table 7 for fE2). There were no significant interactions between tE2 and none of
2 the SNPs on all cause-mortality.

3 In sensitivity analyses, we excluded participants who died during the first four years of follow-
4 up (n=41) and found very similar findings (supplemental Table 8). Results were unchanged in
5 models adjusted for testosterone (supplemental Table 9). The case-only design confirmed the
6 lack of interaction by showing no significant association of ER SNP with tertiles of estradiol
7 among cases; the independence assumption was verified in controls (Supplemental Tables 10
8 and 11 for tE2 and fE2, respectively).

1 **4. Discussion**

2 As part of the 3C prospective cohort study in aging men, we showed a quadratic association
3 between the baseline concentration of endogenous estradiol (tE2 and fE2) and all-cause
4 mortality over a 12-year follow-up that was independent of age, personal history of coronary
5 disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, **smoking, BMI,**
6 **hypercholesterolemia, and SHBG.** This pattern was explained by CVD mortality, while there
7 was no association with cancer mortality. There was no evidence of interactions between SNPs
8 in ER genes and endogenous estradiol for all-cause mortality.

9 To our knowledge, our study is the first to show a significant quadratic association of estradiol
10 with all-cause mortality among elderly men from the general population. They are, however, in
11 line with an association of low and high estradiol level, compared to middle values, with
12 increased all-cause mortality among men with chronic heart failure (39). Other studies reported
13 that either low estradiol levels (16,19), or high estradiol levels (15,17) were associated with
14 increased mortality. There are also studies showing no association between endogenous
15 estradiol and all-cause mortality (11-14). Possible explanations for these inconsistencies might
16 be differences in subjects' characteristics, numbers of events, and adjustment for different
17 covariates. Negative results tended to be more frequently observed in studies based on middle-
18 aged men (11,12,14); biological effects of estradiol might be more prominent in older men, or
19 low mortality rates in middle-aged men may have led to insufficient statistical power.

20 The quadratic association of estradiol with mortality was stronger for CVD mortality. Current
21 knowledge on the relation between endogenous estradiol and cardiovascular risk in men is
22 limited and controversial. Some studies reported no association of endogenous estradiol with
23 CVD mortality (11,12,17), but one recent study showed that lower estradiol levels were
24 associated with increased CVD mortality (19). With respect to incident CVD, one meta-
25 analysis showed no conclusive results on the relation between endogenous estradiol and CVD

1 risk among men (40). In the Framingham Heart Study, low estradiol levels were associated
2 with an increased risk of atrial fibrillation (19,41). Another prospective study showed that high
3 levels of endogenous estradiol levels predicted incident stroke (42).

4 We found no association of estradiol with cancer mortality, in agreement with previous studies
5 (11,43,44). We cannot exclude that associations may exist for specific cancers, but there were
6 too few cases to perform cancer-specific analysis.

7 Previous studies have examined marginal associations between ER SNPs and several outcomes
8 in men, and some reported significant associations with Alzheimer's disease, prostate cancer,
9 chronic hepatitis B, and CVD (25,27,45,46). However, no previous study examined whether
10 ER SNPs modified the association of endogenous estradiol with clinical outcomes or death and
11 we found no evidence in favour of this hypothesis. Our study may suffer from insufficient
12 statistical power; however, our findings were confirmed using a case-only approach that is
13 more powerful to detect gene-environment interactions than a traditional analysis.

14 Several biological mechanisms could explain the association of endogenous estradiol with
15 CVD mortality. First, high or low endogenous estradiol could be associated with a worse
16 profile of traditional cardiovascular risk factors, including obesity, diabetes, and
17 hypercholesterolemia. In our analysis, adjustment for diabetes did not attenuate the association
18 of estradiol with all-cause mortality and reinforced the relation with CVD mortality. Further
19 adjustment for well-known cardiovascular risk factor such as hypercholesterolemia, BMI and
20 smoking status did not change the results. There may be, however, residual confounding, in
21 particular for obesity, as BMI may not be the best way to capture fat mass. Second, the
22 relationship between estradiol and CVD mortality could be driven by other mechanisms
23 involved in atherothrombosis, such as inflammation and hypercoagulability. Additional data
24 would be needed to examine whether these mechanisms mediate the association between
25 estradiol and mortality. **Third, since estradiol and testosterone levels are correlated, association**

1 of estradiol with mortality may partly reflect the role of testosterone (47). Indeed, both low and
2 high testosterone levels may be associated with mortality in older men (13). In our study, the
3 correlation between tE2 and testosterone was $r=0.35$; $p<0.0001$. However, further adjustment
4 for testosterone did not change the results. Finally, reverse causation could explain the
5 increased risk of death for the low or high estradiol levels. However, exclusion of deaths
6 occurring during the first four years of follow-up yielded similar results, and does not support
7 this hypothesis.

8 Our study presents several strengths. We used data from a large multicenter population-based
9 prospective French cohort study with a long-follow-up. Sensitivity analyses confirmed our
10 main findings and suggest that the associations that we identified are robust. Estradiol
11 measurements were conducted without knowledge of vital status and with an ultrasensitive
12 method that yielded no values under the detectable concentrations.

13 Our study also has limitations. First, our analyses are based on a random stratified sub-cohort
14 of men, rather than on the whole cohort. We used IPW to take into account the sampling of the
15 sub-cohort and to correct for the small differences observed between men from the sub-cohort
16 and other men. Therefore, although this approach led to less precise estimates (compared to
17 using the whole cohort), the random sampling is unlikely to lead to biased estimates.
18 Nevertheless, the reduced sample may have led to insufficient power for some analyses,
19 especially for analyses of gene-environment interactions. Second, estradiol measurement was
20 measured using RIA rather than by the state-of-the-art gas chromatography mass spectrometry
21 method (48). A validation study compared values of tE2 measured by gas chromatography-
22 tandem mass spectrometry and those obtained by the specific direct RIA used in our study and
23 showed an excellent correlation between both methods for ranges of concentrations similar to
24 those we observed ($r = 0.969$; $p < 0.0001$) (49). Therefore, use of this ultrasensitive direct RIA
25 is adequate for estradiol assessment in large epidemiological investigations in which population

1 level inferences are of greater interest than subject-specific ones. In addition, residual error
2 measurement for the RIA method would lead to underestimate true associations. **Third, our**
3 **analyses are based on a single measurement of estradiol that does not take into account within-**
4 **subject variability of sex hormones. However, blood samples were all collected in the morning**
5 **from fasting men and there is no diurnal variation for estradiol, especially in elderly men (50).**
6 Finally, this study is based on older men, and, therefore, our findings may not be generalized to
7 men younger than 65 years.

8

9 **5. Conclusion**

10 In conclusion, we identified a quadratic association between tE2, fE2 level and all-cause
11 mortality that seemed to be not modified by SNPs in ER genes. These quadratic associations
12 were explained by CVD deaths, and did not exist for cancer mortality. These results could help
13 improve our understanding of the role of estradiol in men's health. The mechanisms underlying
14 these associations remain to be elucidated.

15

16 **6. Acknowledgments**

17 The Three-City Study is conducted under a partnership agreement between the Institut National
18 de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Victor Segalen-Bordeaux II
19 University, and Sanofi-Aventis. We thank Julie Setia, Bicêtre Hospital, for her excellent
20 technical assistance.

21

22 **Author contributions**

23 NL: substantial contributions to analysis and interpretation of data, drafting the article or
24 revising it critically to important intellectual content. SBT: substantial contributions to

1 acquisition of data, drafting the article or revising it critically to important intellectual content.
 2 CH: substantial contributions to conception and design and acquisition of data, drafting the
 3 article or revising it critically to important intellectual content. MLA: substantial contributions
 4 to conception and design and acquisition of data, drafting the article or revising it critically to
 5 important intellectual content. CT: substantial contributions to conception and design and
 6 acquisition of data, drafting the article or revising it critically to important intellectual content.
 7 AE: substantial contributions to analysis and interpretation of data, drafting the article or
 8 revising it critically to important intellectual content. AGM: substantial contributions to
 9 acquisition of data, drafting the article or revising it critically to important intellectual content.
 10 MC: substantial contributions to conception and design, acquisition of data, analysis and
 11 interpretation of data, drafting the article or revising it critically to important intellectual
 12 content. All authors approved the final version. MC is the guarantor of this work and, as such,
 13 had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data
 14 and the accuracy of the data analysis.

15

16 **Source of funding**

17 The Fondation pour la Recherche Médicale funded preparation and initiation of the study. The
 18 Three-City Study is also supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladie des
 19 Travailleurs Salariés, Direction Générale de la Santé, MGEN, Institut de la Longévité, Conseils
 20 Régionaux of Aquitaine and Bourgogne, Fondation de France, Ministry of Research-INSERM
 21 Programme "Cohortes et collections de données biologiques", Agence Nationale de la
 22 Recherche (ANR PNRA 2006 and LongVie 2007), the "Fondation Plan Alzheimer" (FCS
 23 2009-2012), and the Caisse Nationale de Solidarité pour l'Autonomie (CNSA). The
 24 experiments comply with the current laws of the country in which they were performed.
 25 Biological assays regarding haemostatic and hormones parameters were supported by a grant

1 from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2007-LVIE-005-01, PI: Pierre-Yves
2 Scarabin).

3

4 **Ethical approval**

5 In the present study all procedures involving human participants were in accordance with the
6 ethical standards of the institutional and/or national research committee's and with the 1964
7 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

8

9 **Informed consent**

10 Informed consent was obtained from all individual participants included in the present study.

7. References

1. Orwoll E, Lambert LC, Marshall LM, Phipps K, Blank J, Barrett-Connor E, Cauley J, Ensrud K, Cummings S. Testosterone and estradiol among older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1336-1344
2. MacDonald PC, Madden JD, Brenner PF, Wilson JD, Siiteri PK. Origin of estrogen in normal men and in women with testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 49:905-916
3. Vermeulen A, Kaufman JM, Goemaere S, van Pottelberg I. Estradiol in elderly men. *Aging Male* 2002; 5:98-102
4. Finkelstein JS, Lee H, Burnett-Bowie SA, Pallais JC, Yu EW, Borges LF, Jones BF, Barry CV, Wulczyn KE, Thomas BJ, Leder BZ. Gonadal steroids and body composition, strength, and sexual function in men. *N Engl J Med* 2013; 369:1011-1022
5. Barrett-Connor E, Mueller JE, von Muhlen DG, Laughlin GA, Schneider DL, Sartoris DJ. Low levels of estradiol are associated with vertebral fractures in older men, but not women: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:219-223
6. Khosla S, Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM. Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3555-3561
7. McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999; 20:279-307
8. Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997; 390:509-512
9. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, Bandinelli S, Ruggiero C, Guralnik JM, Metter EJ, Ling SM, Paolisso G, Valenti G, Cappola AR, Ferrucci L. Relationship between higher estradiol levels and 9-year mortality in older women: the Invecchiare in Chianti study. *J Am Geriatr Soc* 2009; 57:1810-1815
10. Dossett LA, Swenson BR, Heffernan D, Bonatti H, Metzger R, Sawyer RG, May AK. High levels of endogenous estrogens are associated with death in the critically injured adult. *J Trauma* 2008; 64:580-585
11. Menke A, Guallar E, Rohrmann S, Nelson WG, Rifai N, Kanarek N, Feinleib M, Michos ED, Dobs A, Platz EA. Sex steroid hormone concentrations and risk of death in US men. *Am J Epidemiol* 2010; 171:583-592
12. 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. *Eur J Endocrinol* 2009; 161:435-442
13. Yeap BB, Alfonso H, Chubb SA, Handelsman DJ, Hankey GJ, Almeida OP, Golledge J, Norman PE, Flicker L. In older men an optimal plasma testosterone is associated with reduced all-cause mortality and higher dihydrotestosterone with reduced ischemic heart disease mortality, while estradiol levels do not predict mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:E9-18
14. Chan YX, Knuiman MW, Hung J, Divitini ML, Beilby JP, Handelsman DJ, Beilin J, McQuillan B, Yeap BB. Neutral associations of testosterone, dihydrotestosterone and estradiol with fatal and non-fatal cardiovascular events, and mortality in men aged 17-97 years. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016; 85:575-582
15. Szulc P, Claustat B, Delmas PD. Serum concentrations of 17beta-E2 and 25-hydroxycholecalciferol (25OHD) in relation to all-cause mortality in older men--the MINOS study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71:594-602
16. Tivesten A, Vandenput L, Labrie F, Karlsson MK, Ljunggren O, Mellstrom D, Ohlsson C. Low serum testosterone and estradiol predict mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:2482-2488
17. Holmboe SA, Vradi E, Jensen TK, Linneberg A, Husemoen LL, Scheike T, Skakkebaek NE, Juul A, Andersson AM. The Association of Reproductive Hormone Levels and All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality in Men. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:4472-4480

18. Lerchbaum E, Pilz S, Grammer TB, Boehm BO, Marz W, Obermayer-Pietsch B. High estradiol levels are associated with increased mortality in older men referred to coronary angiography. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011; 119:490-496
19. Hsu B, Cumming RG, Naganathan V, Blyth FM, Le Couteur DG, Hirani V, Waite LM, Seibel MJ, Handelsman DJ. Temporal Changes in Androgens and Estrogens Are Associated With All-Cause and Cause-Specific Mortality in Older Men. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:2201-2210
20. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:5925-5930
21. Panno ML, Salerno M, Pezzi V, Sisci D, Maggiolini M, Mauro L, Morrone EG, Ando S. Effect of oestradiol and insulin on the proliferative pattern and on oestrogen and progesterone receptor contents in MCF-7 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122:745-749
22. Kjaergaard AD, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Axelsson CK, Gronholdt ML, Grande P, Jensen GB, Nordestgaard BG. Estrogen receptor alpha polymorphism and risk of cardiovascular disease, cancer, and hip fracture: cross-sectional, cohort, and case-control studies and a meta-analysis. *Circulation* 2007; 115:861-871
23. Rexrode KM, Ridker PM, Hegener HH, Buring JE, Manson JE, Zee RY. Polymorphisms and haplotypes of the estrogen receptor-beta gene (ESR2) and cardiovascular disease in men and women. *Clin Chem* 2007; 53:1749-1756
24. Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL, Meyers DA, Bleecker ER. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation* 2002; 105:1879-1882
25. Scarabin-Carre V, Brailly-Tabard S, Ancelin ML, Maubaret C, Guiochon-Mantel A, Canonico M, Scarabin PY. Plasma estrogen levels, estrogen receptor gene variation, and ischemic arterial disease in postmenopausal women: the three-city prospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:E1539-1546
26. Onland-Moret NC, van Gils CH, Roest M, Grobbee DE, Peeters PH. The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control* 2005; 16:1195-1202
27. Pan Y, Li Y, Shen H. Meta-analysis of the association between polymorphisms of estrogen receptor alpha genes rs9340799 and rs2234693 and Alzheimer's disease: evidence from 23 articles. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2014; 29:704-711
28. Lluis-Ganella C, Lucas G, Subirana I, Escurriol V, Tomas M, Senti M, Sala J, Marrugat J, Elosua R. Qualitative assessment of previous evidence and an updated meta-analysis confirms lack of association between the ESR1 rs2234693 (PvuII) variant and coronary heart disease in men and women. *Atherosclerosis* 2009; 207:480-486
29. Gu Z, Wang G, Chen W. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis involving 18 studies. *Tumour Biol* 2014; 35:5921-5930
30. Group CS. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology* 2003; 22:316-325
31. Laouali N, Brailly-Tabard S, Helmer C, Ancelin ML, Tzourio C, Singh-Manoux A, Dugravot A, Elbaz A, Guiochon-Mantel A, Canonico M. Testosterone and All-Cause Mortality in Older Men: The Role of Metabolic Syndrome. *J Endocr Soc* 2018; 2:322-335
32. Södergard R, Backstrom T, Shanbhag V, Carstensen H. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 beta to human plasma proteins at body temperature. *J Steroid Biochem* 1982; 16:801-810
33. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3666-3672
34. Rinaldi S, Geay A, Dechaud H, Biessy C, Zeleniuch-Jacquotte A, Akhmedkhanov A, Shore RE, Riboli E, Toniolo P, Kaaks R. Validity of free testosterone and free estradiol determinations in serum samples from postmenopausal women by theoretical calculations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:1065-1071
35. Lau B, Cole SR, Gange SJ. Competing risk regression models for epidemiologic data. *Am J Epidemiol* 2009; 170:244-256

36. Harrell F. Regression Modeling Strategies With Applications to Linear Models, Logistic Regression, and Survival Analysis. New York, NY: Springer 2001;
37. Cole SR, Hernan MA. Constructing inverse probability weights for marginal structural models. *Am J Epidemiol* 2008; 168:656-664
38. Khoury MJ, Flanders WD. Nontraditional epidemiologic approaches in the analysis of gene-environment interaction: case-control studies with no controls! *Am J Epidemiol* 1996; 144:207-213
39. Jankowska EA, Rozentryt P, Ponikowska B, Hartmann O, Kustrzycka-Kratochwil D, Reczuch K, Nowak J, Borodulin-Nadzieja L, Polonski L, Banasiak W, Poole-Wilson PA, Anker SD, Ponikowski P. Circulating estradiol and mortality in men with systolic chronic heart failure. *JAMA* 2009; 301:1892-1901
40. Vandenplas G, De Bacquer D, Calders P, Fiers T, Kaufman JM, Ouwens DM, Ruige JB. Endogenous oestradiol and cardiovascular disease in healthy men: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Heart* 2012; 98:1478-1482
41. Magnani JW, Moser CB, Murabito JM, Sullivan LM, Wang N, Ellinor PT, Vasan RS, Benjamin EJ, Coviello AD. Association of sex hormones, aging, and atrial fibrillation in men: the Framingham Heart Study. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2014; 7:307-312
42. Abbott RD, Launer LJ, Rodriguez BL, Ross GW, Wilson PW, Masaki KH, Strozyk D, Curb JD, Yano K, Popper JS, Petrovitch H. Serum estradiol and risk of stroke in elderly men. *Neurology* 2007; 68:563-568
43. Chan YX, Alfonso H, Chubb SA, Handelsman DJ, Fegan PG, Hankey GJ, Golledge J, Flicker L, Yeap BB. Higher Dihydrotestosterone Is Associated with the Incidence of Lung Cancer in Older Men. *Horm Cancer* 2017; 8:119-126
44. Daniels NA, Nielson CM, Hoffman AR, Bauer DC, Osteoporotic Fractures In Men Study G. Sex hormones and the risk of incident prostate cancer. *Urology* 2010; 76:1034-1040
45. Casazza K, Page GP, Fernandez JR. The association between the rs2234693 and rs9340799 estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk factors for cardiovascular disease: a review. *Biol Res Nurs* 2010; 12:84-97
46. Liu Y, Liu Y, Huang X, Sui J, Mo C, Wang J, Peng Q, Deng Y, Huang L, Li S, Qin X. Association of PvuII and XbaI polymorphisms in estrogen receptor alpha gene with the risk of hepatitis B virus infection in the Guangxi Zhuang population. *Infect Genet Evol* 2014; 27:69-76
47. Huhtaniemi IT, Tajar A, Lee DM, O'Neill TW, Finn JD, Bartfai G, Boonen S, Casanueva FF, Giwercman A, Han TS, Kula K, Labrie F, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Vanderschueren D, Forti G, Wu FC, Group E. Comparison of serum testosterone and estradiol measurements in 3174 European men using platform immunoassay and mass spectrometry; relevance for the diagnostics in aging men. *Eur J Endocrinol* 2012; 166:983-991
48. Stanczyk FZ, Clarke NJ. Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121:491-495
49. Trabado S, Maione L, Salenave S, Baron S, Galland F, Bry-Gauillard H, Guiochon-Mantel A, Chanson P, Pitteloud N, Sinisi AA, Brailly-Tabard S, Young J. Estradiol levels in men with congenital hypogonadotropic hypogonadism and the effects of different modalities of hormonal treatment. *Fertil Steril* 2011; 95:2324-2329, 2329 e2321-2323
50. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:907-913

Legends for Figures and Tables

Table 1: Baseline characteristics of men according to the vital status after a 12 year follow-up in the 3C cohort study.

Notes: Data are expressed as n (%), means (SD), or medians (IQR).

^a p-value from t-test or chi-square tests.

^b p-value based on Cochran-Mantel-Haenszel statistic or analysis of variance adjusted for age.

Abbreviations: n, numbers; SD, standard deviation; %, percentage; BMI, body-mass index; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; **SHBG**, Sex Hormone-Binding Globulin; **tE2**, total estradiol; **FE2**, free estradiol.

Missing data: [§]=1; [#]=8; [§] = 3.

Table 2: Baseline characteristics of men according to the tertile of total estradiol.

Notes: Data are expressed as n (%), means (SD), or medians (IQR).

Abbreviations: T, tertile of total estradiol (cut-off in pg/mL); n, Numbers; SD, Standard deviation; %, percentage; BMI, body mass index; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; **SHBG**, Sex Hormone-Binding Globulin; **FE2**, free estradiol.

Missing data: [§]=1; [#]=8; [§] = 3.

Table 3: All-cause and cause-specific mortality according to baseline total estradiol concentration after a 12 year follow-up in the 3C cohort study[§].

Notes: [§]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Model 1: adjusted for age and center; model 2: model 1 + personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, and sex hormone-binding globulin; model 3: model 2 + smoking, BMI and hypercholesterolemia.

Abbreviations: T, tertiles of total estradiol.

Table 4: All-cause mortality according to baseline total estradiol concentration by ER Polymorphisms in the 3C cohort study[§].

Notes: [§]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Models were adjusted for age, center, personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, sex hormone-binding globulin, smoking, BMI, and hypercholesterolemia.

Abbreviations: T, tertiles of total estradiol (cut-off in pg/mL); ^a, interaction for additive model; ^β, interaction for codominant model.

Missing: [§]=24; [#]=15; [§] = 21.

Figure 1: Flowchart representing the constitution of the study sample.

Figure 2: Relationship between total estradiol level and hazard of all-cause (A) and CVD (B) mortality fitted with restricted cubic splines (3 knots placed at the 10th, 50th, and 90th percentiles).

Notes: Risk estimates are adjusted for age, center, personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, sex hormone-binding globulin, smoking, BMI, and hypercholesterolemia.

Reference value for log hazard ratios: 50th percentile (18.69 pg/mL); the solid blue line represents the log hazard ratio and the dashed lines the lower and upper 95% confidence interval.

Table 1: Baseline characteristics of men according to the vital status after a 12 year follow-up in the 3C cohort study.

Characteristics	Whole sample (n=472)	Alive (n=289)	Died (n=183)	p-value ^a	p-value ^b
Sociodemographic					
Age (years)	73.9 (5.4)	71.8 (4.4)	77.1 (5.4)	<0.001	-
Center				0.442	0.594
Bordeaux	96 (20.3)	54 (18.7)	42 (23.0)		
Dijon	246 (52.1)	151 (52.3)	95 (51.9)		
Montpellier	130 (27.6)	84 (29.0)	46 (25.1)		
Education level [§]				0.159	0.337
No education or primary school	129 (27.4)	76 (26.3)	53 (29.1)		
Secondary school	138 (29.3)	78 (27.0)	60 (33.0)		
High-school or university degree	204 (43.3)	135 (46.7)	69 (37.9)		
Cardiovascular risk factors					
BMI (kg/m ²)	26.1 (3.2)	26.2 (3.1)	26.4 (3.4)	0.670	0.722
Smoking				0.137	0.117
Never	146 (31.0)	93 (32.2)	53 (29.0)		
Past	291 (61.7)	180 (62.3)	111 (60.7)		
Current	35 (7.4)	16 (5.5)	19 (10.4)		
Daily alcohol consumption				0.037	0.017
Never	442 (93.6)	276 (95.5)	166 (90.7)		
Past	16 (3.4)	9 (3.1)	7 (3.8)		
Current	14 (3.0)	4 (1.4)	10 (5.5)		
Hypertension	369 (78.2)	218 (75.4)	151 (82.5)	0.007	0.826
Hypercholesterolemia	204 (43.2)	137 (47.4)	67 (36.6)	0.021	0.285
Diabetes [§]	54 (11.5)	27 (9.4)	27 (14.8)	0.074	0.033
Personal history					
Coronary heart disease	60 (12.7)	29 (10.0)	31 (16.9)	0.028	0.101
Stroke [#]	26 (5.6)	8 (2.8)	18 (10.1)	0.001	0.037
Biological parameters					
Total cholesterol (mmol/L)	5.6 (0.9)	5.6 (0.9)	5.5 (0.9)	0.247	0.692
LDL-C (mmol/L) [§]	3.6 (0.8)	3.6 (0.8)	3.5 (0.8)	0.206	0.825
HDL-C (mmol/L)	1.4 (0.3)	1.5 (0.3)	1.4 (0.3)	0.678	0.827
Triglycerides (mmol/L)	1.1 (0.9-1.5)	1.1 (0.9-1.5)	1.2 (0.9-1.5)	0.571	0.270
Glucose (g/L) [§]	5.0 (4.7-5.5)	5.0 (4.7-5.5)	5.0 (4.6-5.5)	0.865	0.643
Total testosterone (nmol/L)	17.4 (6.2)	17.5 (5.7)	17.2 (6.9)	0.610	0.598
Albumin (g/L)	44.2 (4.6)	44.2 (4.5)	44.1 (4.7)	0.896	0.154
SHBG (nmol/L)	24.4 (18.2-32.9)	23.4 (17.8-30.6)	26.4 (19.0-36.8)	0.011	0.638
Measured tE2 (pg/mL)	19.8 (9.2)	18.9 (9.2)	20.8 (9.0)	0.062	0.057
Calculated fE2 (pg/mL)	0.7 (0.3)	0.6 (0.3)	0.7 (0.3)	0.011	0.007

Notes: Data are expressed as n (%), means (SD), or medians (IQR).

^ap-value from t-test or chi-square tests.

^bp-value based on Cochran-Mantel-Haenszel statistic or analysis of variance adjusted for age.

Abbreviations: n, numbers; SD, standard deviation; %, percentage; BMI, body-mass index; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; SHBG, Sex Hormone-Binding Globulin; tE2, total estradiol; fE2, free estradiol.

Missing data: [§]=1; [#]=8; [§]=3.

Table 2: Baseline characteristics of men according to the tertile of **total** estradiol.

Characteristics	T1 (<15.36) (n=157)	T2 (15.36-21.66) (n=158)	T3 (≥21.67) (n=157)	p-trend
Sociodemographic				
Age (years)	73.6 (5.6)	74.0 (5.3)	74.0 (5.4)	0.462
Center				0.336
Bordeaux	26 (27.1)	38 (39.6)	32 (33.3)	
Dijon	86 (34.9)	74 (30.1)	86 (34.9)	
Montpellier	45 (34.6)	46 (35.4)	39 (30.0)	
Education level [§]				0.672
No education or primary school	39 (30.2)	48 (37.2)	42 (32.6)	
Secondary school	54 (39.1)	41 (29.7)	43 (31.2)	
High-school or university degree	64 (31.4)	68 (33.3)	72 (35.3)	
Cardiovascular risk factors				
BMI (kg/m ²)	25.8 (3.1)	26.3 (3.2)	26.2 (3.4)	0.195
Smoking				0.442
Never	49 (33.6)	50 (34.3)	47 (32.2)	
Past	98 (33.7)	100 (34.4)	93 (32.0)	
Current	10 (28.6)	8 (22.9)	17 (48.6)	
Daily alcohol consumption				0.338
Never	148 (33.5)	150 (33.9)	144 (32.6)	
Past	5 (31.3)	6 (37.5)	5 (31.3)	
Current	4 (28.6)	2 (14.3)	8 (57.1)	
Hypertension	117 (31.0)	125 (33.2)	135 (35.8)	0.012
Hypercholesterolemia	72 (35.3)	72 (35.3)	60 (29.4)	0.172
Diabetes [§]	25 (46.3)	14 (25.9)	15 (27.8)	0.079
Personal history				
Coronary heart disease	21 (35.0)	20 (33.3)	19 (31.7)	0.090
Stroke [#]	10 (38.5)	13 (50.0)	3 (11.5)	0.735
Biological parameters				
Total cholesterol (mmol/L)	5.5 (0.8)	5.5 (0.9)	5.6 (0.9)	0.352
LDL-C (mmol/L) [§]	3.5 (0.7)	3.5 (0.8)	3.6 (0.8)	0.330
HDL-C (mmol/L)	1.5 (0.3)	1.4 (0.3)	1.4 (0.3)	0.333
Triglycerides (mmol/L)	1.1 (0.8-1.5)	1.1 (0.9-1.5)	1.2 (0.9-1.5)	0.494
Glucose (g/L) [§]	5.1 (4.7-5.6)	4.9 (4.7-5.4)	4.9 (4.6-5.3)	0.102
Albumin (g/L)	44.2 (4.6)	44.0 (4.6)	44.3 (4.6)	0.917
SHBG (nmol/L)	23.9 (17.1-31.9)	24.1 (18.3-32.4)	25.6 (19.1-34.0)	0.059
Calculated fE2 (pg/mL)	0.4 (0.1)	0.6 (0.1)	1.0 (0.3)	<0.01

Notes: Data are expressed as n (%), means (SD), or medians (IQR).

Abbreviations: T, tertile of **total** estradiol (cut-off in pg/mL); n, Numbers; SD, Standard deviation; %, percentage; BMI, body mass index; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; **SHBG**, Sex Hormone-Binding Globulin; **fE2**, free estradiol.

Missing data: [§]=1; [#]=8; [§] = 3.

Table 3: All-cause and cause-specific mortality according to baseline **total** estradiol concentration after a 12 year follow-up in the 3C cohort study[‡].

Total estradiol (pg/mL)	Events	Model 1 (n= 472)		Model 2 (n= 472)		Model 3 (n= 472)	
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
All-cause mortality	183						
T1 (<15.35)	57	1.34 (0.93-1.92)	0.11	1.33 (0.92-1.91)	0.13	1.34 (0.93-1.94)	0.12
T2 (15.35-21.66)	55	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--
T3 (≥21.67)	71	1.53 (1.08-2.16)	0.02	1.45 (1.01-2.08)	0.04	1.44 (1.00-2.07)	0.05
p-quadratic			0.02		0.04		0.04
Cardiovascular mortality	44						
T1 (<15.35)	12	1.89 (0.83-4.29)	0.13	1.92 (0.83-4.43)	0.13	2.05 (0.86-4.89)	0.10
T2 (15.35-21.66)	10	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--
T3 (≥21.67)	22	2.89 (1.36-6.13)	0.01	3.18 (1.45-6.99)	<0.01	3.50 (1.55-7.90)	<0.01
p-quadratic			0.02		0.02		0.01
Cancer mortality	57						
T1 (<15.35)	16	0.88 (0.46-1.67)	0.69	0.86 (0.45-1.63)	0.64	0.84 (0.44-1.61)	0.60
T2 (15.35-21.66)	18	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--
T3 (≥21.67)	23	1.32 (0.74-2.35)	0.35	1.13 (0.62-2.07)	0.69	1.08 (0.58-1.99)	0.81
p-quadratic			0.79		0.95		0.86
Other causes of mortality	82						
T1 (<15.35)	29	1.53 (0.91-2.59)	0.11	1.59 (0.93-2.72)	0.09	1.57 (0.92-2.69)	0.10
T2 (15.35-21.66)	27	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--
T3 (≥21.67)	26	1.20 (0.70-2.06)	0.50	1.15 (0.64-2.04)	0.64	1.10 (0.62-1.97)	0.75
p-quadratic			0.20		0.23		0.27

Notes: [‡]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Model 1: adjusted for age and center; model 2: model 1 + personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, and sex hormone-binding globulin; model 3: model 2 + smoking, BMI and hypercholesterolemia.

Abbreviations: T, tertiles of **total** estradiol.

Table 4: All-cause mortality according to baseline **total** estradiol concentration by ER Polymorphisms in the 3C cohort study[§].

	Events	HR (95% CI)	Events	HR (95% CI)	Events	HR (95% CI)	p _α	p _β
ESRα								
rs2234693[§]		CC (n = 98)		CT (n = 222)		TT (n = 128)		
T1 (<15.35)	10	0.99 (0.33-2.91)	26	1.30 (0.74-2.27)	19	2.28 (1.08-4.81)	0.55	0.87
T2 (15.35-21.66)	12	1.00 (reference)	26	1.00 (reference)	15	1.00 (reference)		
T3 (≥21.67)	12	1.47 (0.52-4.11)	32	1.48 (0.85-2.55)	22	1.94 (0.92-4.12)		
p-quadratic		0.678		0.190		0.029		
rs9340799[§]		AA (n = 175)		AG (n = 218)		GG (n = 55)		
T1 (<15.35)	25	1.78 (0.96-3.26)	22	1.12 (0.61-2.05)	8	1.72 (0.35-8.48)	0.65	0.45
T2 (15.35-21.66)	21	1.00 (reference)	26	1.00 (reference)	6	1.00 (reference)		
T3 (≥21.67)	28	1.83 (0.96-3.48)	36	1.62 (0.93-2.82)	5	1.08 (0.21-5.64)		
p-quadratic		0.040		0.255		0.645		
ESRβ								
rs1256049[#]		AA (n = 2)		AG (n = 39)		GG (n = 416)		
T1 (<15.35)	0	NA	5	1.27 (0.18-9.09)	51	1.31 (0.89-1.93)	0.96	0.96
T2 (15.35-21.66)	0	NA	6	1.00 (reference)	49	1.00 (reference)		
T3 (≥21.67)	0	NA	7	1.28 (0.30-5.46)	63	1.39 (0.95-2.05)		
p-quadratic		NA		0.754		0.082		
rs4986938[§]		AA (n = 70)		AG (n = 219)		GG (n = 162)		
T1 (<15.35)	10	7.11 (0.97-52.07)	26	1.74 (1.00-3.03)	19	1.02 (0.54-1.93)	0.40	0.50
T2 (15.35-21.66)	3	1.00 (reference)	26	1.00 (reference)	23	1.00 (reference)		
T3 (≥21.67)	15	8.20 (1.37-49.26)	32	1.47 (0.83-2.60)	23	1.82 (0.99-3.34)		
p-quadratic		0.029		0.061		0.257		
rs1271572[§]		GG (n = 141)		GT (n = 233)		TT (n = 77)		
T1 (<15.35)	17	1.40 (0.59-3.33)	28	1.32 (0.78-2.21)	11	1.82 (0.64-5.14)	0.81	0.89
T2 (15.35-21.66)	10	1.00 (reference)	32	1.00 (reference)	11	1.00 (reference)		
T3 (≥21.67)	27	1.71 (0.74-3.97)	25	1.25 (0.70-2.24)	16	2.33 (0.94-5.81)		
p-quadratic		0.275		0.300		0.098		

Notes: [§]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Models were adjusted for age, center, personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, **sex hormone-binding globulin, smoking, BMI, and hypercholesterolemia**.

Abbreviations: T, tertiles of **total** estradiol (cut-off in pg/mL); ^α, interaction for additive model; ^β, interaction for codominant model.

Missing: [§] = 24; [#] = 15; [§] = 21.

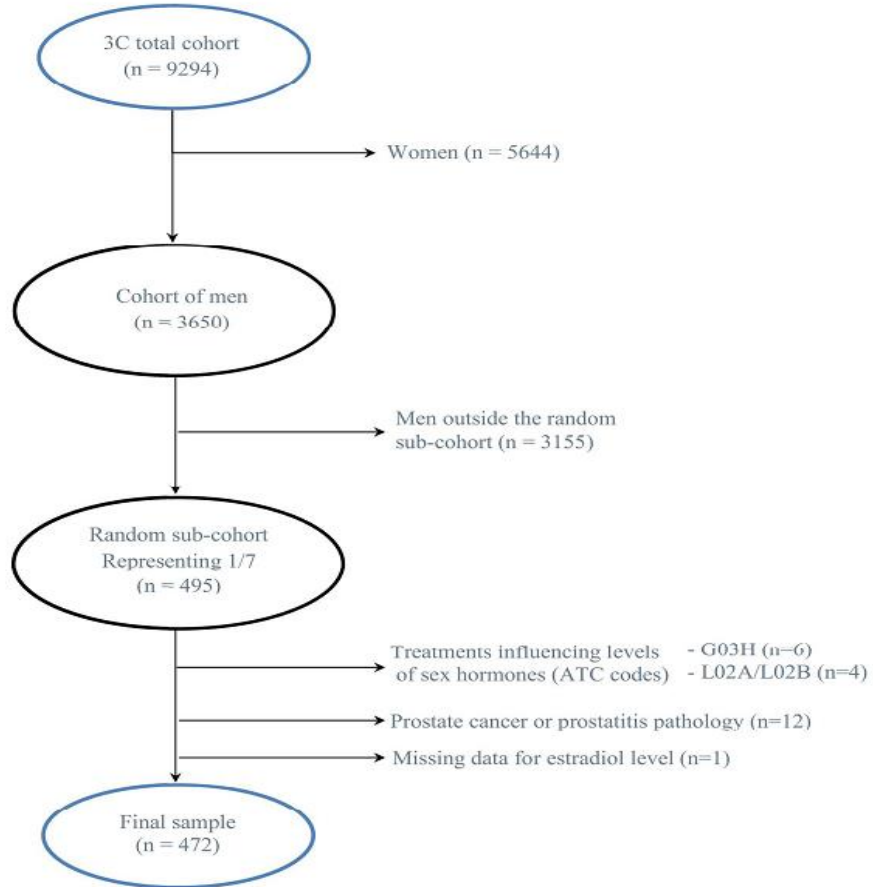


Figure 1: Flowchart representing the constitution of the study sample.

192x226mm (300 x 300 DPI)

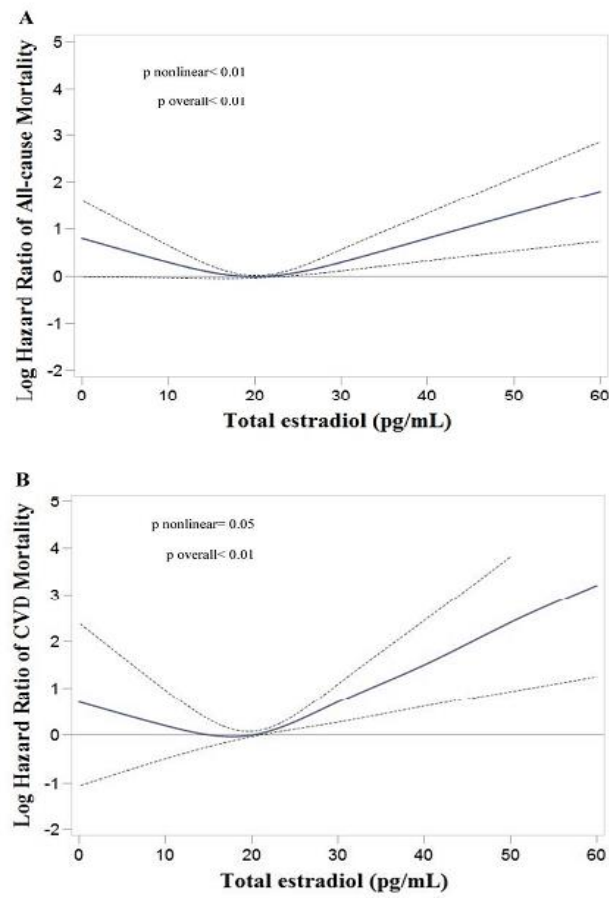


Figure 2: Relationship between total estradiol level and hazard of all-cause (A) and CVD (B) mortality fitted with restricted cubic splines (3 knots placed at the 10th, 50th, and 90th percentiles).

193x312mm (300 x 300 DPI)

Supplementary tables

Table S1: Comparison of baseline characteristics of men in and out of the sub-cohort.

Characteristics	Not in the sub-cohort (n=3155)	Sub-cohort (n=495)	p
Sociodemographic			
Age (years)	74.2 (5.6)	73.9 (5.4)	0.381
Center			0.745
Bordeaux	709 (22.5)	107 (21.6)	
Dijon	1635 (51.8)	253 (51.1)	
Montpellier	811 (25.7)	135 (27.3)	
Education level ^{\$}			0.397
No education or primary school	931 (29.5)	135 (27.3)	
Secondary school	817 (25.9)	141 (28.5)	
High-school or university degree	1404 (44.5)	218 (44.1)	
Anthropometric measures			
BMI (kg/m ²)	26.2 (3.4)	26.1 (3.2)	0.690
Waist (cm)	96.1 (10.2)	96.0 (9.8)	0.779
Waist/Hip	0.94 (0.9-1.0)	0.95 (0.9-1.0)	0.294
Cardiovascular risk factors			
Smoking [£]			0.737
Never	961 (30.5)	149 (30.1)	
Former	1933 (61.3)	310 (62.6)	
Current	259 (8.2)	36 (7.3)	
Daily alcohol consumption ^{\$}			0.052
Never	2870 (91.1)	464 (93.7)	
Former	195 (6.2)	17 (3.4)	
Current	86 (2.7)	14 (2.8)	
Hypertension ^α	2643 (83.8)	398 (80.4)	0.062
Hypercholesterolemia ^α	1425 (47.2)	215 (43.4)	0.121
Diabetes [#]	427 (14.4)	59 (11.9)	0.150
Personal history			
Coronary heart disease [£]	555 (17.6)	64 (12.9)	0.010
Stroke [¥]	186 (5.9)	27 (5.5)	0.710
Mental health			
MMS scores ^β			0.488
Low level	272 (8.7)	35 (7.1)	
Medium level	296 (9.5)	49 (10.0)	
Normal level	2577 (81.8)	408 (82.9)	
Biological parameters			
Total cholesterol (mmol/L)	5.5 (0.9)	5.6 (0.9)	0.379
LDL-C (mmol/L) ^{\$}	3.5 (0.8)	3.6 (0.8)	0.162
HDL-C (mmol/L)	1.4 (0.4)	1.4 (0.3)	0.090
Triglycerides (mmol/L)	1.2 (0.9-1.6)	1.1 (0.9-1.5)	0.034
Glucose (g/L) [#]	5.1 (4.7-5.6)	4.9 (4.7-5.5)	0.200
Died (12 years follow-up)	1256 (39.8)	195 (39.4)	0.861

Data are expressed as n (%), means (SD), or medians (IQR).

IQR = interquartile range.

p value from T-test or Chi2.

Missing data: ^{\$} =4; [£] = 2; [¥] = 48; ^α = 135; ^β = 33; [§] =3; [#] =185.

MMS=Mini Mental Scale.

Table S2: All-cause mortality related to baseline diabetes, hypertension, and history of stroke or coronary heart disease in the overall cohort and in the sub-cohort of men, with or without inverse probability weighting.

	Cohort of men (n= 3650)			Sub-cohort of men (n= 495)				
	No. of events	HR (95% CI)	p	No. of events	HR (95% CI)	p	HR (95% CI) [¥]	p
Diabetes	1445	1.52 (1.32-1.75)	< 0.010	195	1.54 (1.04-2.29)	0.032	1.52 (1.02-2.26)	0.039
Hypertension	1445	1.43 (1.22-1.66)	< 0.010	195	1.56 (1.05-2.31)	0.028	1.56 (1.09-2.24)	0.015
Personal history of stroke	1445	2.27 (1.90-2.71)	< 0.010	195	2.19 (1.35-3.56)	0.002	2.27 (1.43-3.61)	0.001
Personal history of coronary heart disease	1445	1.63 (1.44-1.84)	< 0.010	195	1.60 (1.13-2.39)	0.009	1.64 (1.06-2.41)	0.026

Crude analyses.

¥: Inversely probability weighted Cox models.

Table S3: Baseline characteristics of men according to the tertile of free estradiol.

Characteristics	T1 (<0.54) (n=157)	T2 (0.54-0.76) (n=158)	T3 (≥0.77) (n=157)	p-trend
Sociodemographic				
Age (years)	73.6 (5.7)	74.0 (5.3)	74.0 (5.4)	0.469
Center				0.368
Bordeaux	27 (28.1)	37 (38.6)	32 (33.3)	
Dijon	85 (34.6)	75 (30.5)	86 (34.9)	
Montpellier	45 (34.6)	46 (35.4)	39 (30.0)	
Education level [§]				0.633
No education or primary school	40 (31.0)	47 (36.4)	42 (32.6)	
Secondary school	54 (39.1)	41 (29.7)	43 (31.2)	
High-school or university degree	63 (30.9)	69 (33.8)	72 (35.3)	
Cardiovascular risk factors				
BMI (kg/m ²)	25.7(3.1)	26.4 (3.2)	26.2 (3.4)	0.157
Smoking				0.376
Never	49 (33.6)	50 (34.3)	47 (32.2)	
Past	98 (33.7)	100 (34.3)	93 (32.0)	
Current	10 (28.6)	8 (22.9)	17 (48.6)	
Daily alcohol consumption				0.234
Never	148 (33.5)	150 (33.9)	144 (32.6)	
Past	5 (31.3)	6 (37.5)	5 (31.2)	
Current	4 (28.6)	2 (14.3)	8 (57.1)	
Hypertension	118 (31.3)	124 (32.9)	135 (35.8)	0.017
Hypercholesterolemia	72 (35.3)	72 (35.3)	60 (29.4)	0.172
Diabetes [§]	25 (46.3)	14 (25.9)	15 (27.8)	0.079
Personal history				
Coronary heart disease	21 (35.0)	20 (33.3)	19 (31.7)	0.090
Stroke [#]	10 (38.5)	13 (50.0)	3 (11.5)	0.735
Biological parameters				
Total cholesterol (mmol/L)	5.6 (0.8)	5.5 (0.9)	5.6 (0.9)	0.447
LDL-C (mmol/L) [§]	3.5 (0.7)	3.5 (0.8)	3.6 (0.8)	0.397
HDL-C (mmol/L)	1.5 (0.3)	1.4 (0.3)	1.4 (0.3)	0.236
Triglycerides (mmol/L)	1.1 (0.8-1.5)	1.1 (0.9-1.5)	1.2 (0.9-1.5)	0.118
Glucose (g/L) [§]	5.0 (4.7-5.6)	4.9 (4.7-5.4)	4.9 (4.6-5.3)	0.112
Albumin (g/L)	44.3 (4.6)	43.9 (4.6)	44.2 (4.5)	0.860
SHBG (nmol/L)	24.3 (17.4-32.3)	23.4 (18.2-31.8)	25.6 (19.1-34.0)	0.101
Measured tE2 (pg/mL)	11.8 (2.8)	18.5 (1.9)	28.5 (6.1)	<0.01

Notes: Data are expressed as n (%), means (SD), or medians (IQR).

Abbreviations: T, tertile of free estradiol (cut-off in pg/mL); n, Numbers; SD, Standard deviation; %, percentage; BMI, body mass index; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; SHBG, Sex Hormone-Binding Globulin.

Missing data: [§]=1; [#]=8; [§] = 3.

Table S4: All-cause and cause-specific mortality according to baseline free estradiol concentration after a 12 year follow-up in the 3C cohort study[‡].

Free estradiol (pg/mL)	Events	Model 1 (n= 472)		Model 2 (n= 472)		Model 3 (n= 472)	
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
All-cause mortality	183						
T1 (<0.54)	57	1.33 (0.92-1.91)	0.67	1.31 (0.91-1.90)	0.15	1.33 (0.92-1.92)	0.13
T2 (0.54-0.76)	55	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--
T3 (≥0.77)	71	1.52 (1.08-2.15)	0.02	1.44 (1.00-2.07)	0.05	1.43 (1.00-2.06)	0.05
p-quadratic			0.03		0.05		0.05
Cardiovascular mortality	44						
T1 (<0.54)	12	1.85 (0.81-4.20)	0.14	1.88 (0.82-4.34)	0.14	1.88 (0.81-4.37)	0.14
T2 (0.54-0.76)	10	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--
T3 (≥0.77)	22	2.86 (1.35-6.08)	<0.01	3.16 (1.44-6.94)	<0.01	3.10 (1.42-6.81)	<0.01
p-quadratic			0.02		0.02		0.02
Cancer mortality	57						
T1 (<0.54)	16	0.89 (0.47-1.69)	0.71	0.86 (0.45-1.65)	0.66	0.85 (0.45-1.63)	0.63
T2 (0.54-0.76)	18	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--
T3 (≥0.77)	23	1.33 (0.74-2.37)	0.34	1.13 (0.62-2.08)	0.69	1.09 (0.59-2.00)	0.79
p-quadratic			0.76		0.97		0.89
Other causes of mortality	82						
T1 (<0.54)	29	1.52 (0.90-2.57)	0.12	1.56 (0.91-2.67)	0.11	1.58 (0.92-2.72)	0.10
T2 (0.54-0.76)	27	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--	1.00 (reference)	--
T3 (≥0.77)	26	1.20 (0.70-2.05)	0.51	1.14 (0.64-2.03)	0.66	1.14 (0.64-2.04)	0.65
p-quadratic			0.21		0.25		0.24

Notes: [‡]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Model 1: adjusted for age and center; model 2: model 1 + personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, and sex hormone-binding globulin; model 3: model 2 + smoking, BMI, and hypercholesterolemia.

Abbreviations: T, tertiles of free estradiol (cut-off in pg/mL).

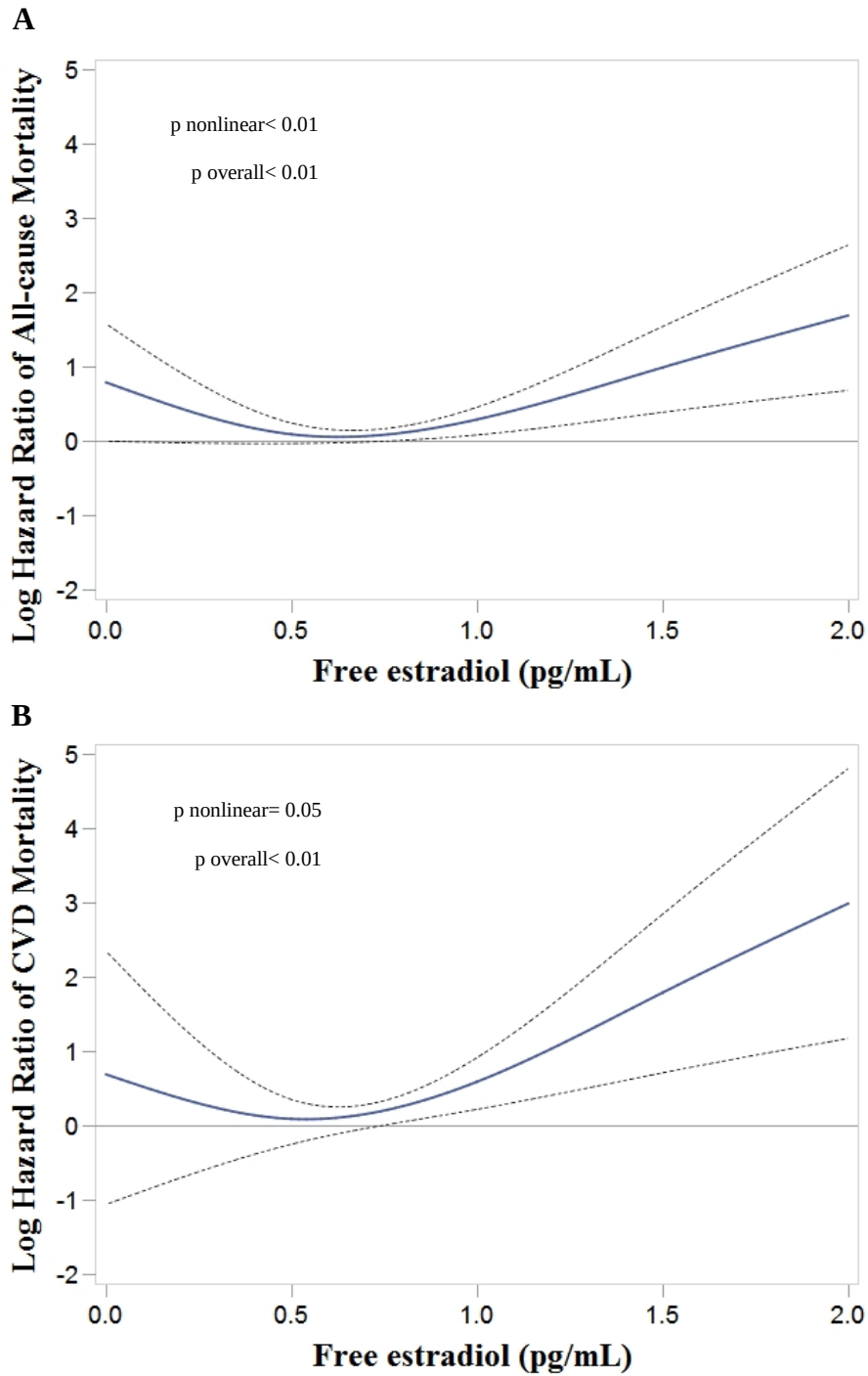


Figure S1: Relationship between free estradiol level and hazard of all-cause (A) and CVD (B) mortality fitted with restricted cubic splines (3 knots placed at the 10th, 50th, and the 90th percentiles).

Notes: Risk estimates are adjusted for age, center, personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, sex hormone-binding globulin, smoking, BMI, and hypercholesterolemia. Reference value for log hazard ratios: 50th percentile (0.65 pg/mL); the solid blue line represents the log hazard ratio and the dashed lines the lower and upper 95% confidence interval.

Table S5: The distribution of *ESR1* and *ESR2* genotypes in the sub-cohort according to vital status and marginal associations between SNPs in estrogen receptor genes and all-cause mortality after a 12 year follow-up in the 3C cohort study[‡].

	Estrogen Receptor	Whole sample (n=472)	HWE	Alive (n=289)	Died (n=183)	p	Model 1 (n= 472)			Model 2 (n= 472)		
							HR (95% CI)	p ^a	p ^b	HR (95% CI)	p ^a	p ^b
<i>ESRα</i>	rs2234693^a											
	CC	98 (21.9)		64 (23.4)	34 (19.5)		1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	CT	222 (49.6)	0.96	138 (50.4)	84 (48.3)	0.35	1.19 (0.80-1.76)	0.15	0.36	1.18 (0.79-1.75)	0.31	0.57
	TT	128 (28.6)		72 (26.2)	56 (32.2)		1.35 (0.89-2.05)			1.25 (0.82-1.91)		
	rs9340799^a											
	AA	55 (12.3)		36 (13.3)	19 (10.7)		1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	AG	218 (48.7)	0.28	134 (49.5)	84 (47.5)	0.54	1.41 (0.86-2.32)	0.07	0.18	1.41 (0.85-2.34)	0.14	0.27
	GG	175 (39.1)		101 (37.3)	74 (41.8)		1.60 (0.97-2.64)			1.52 (0.91-2.52)		
	rs1256049^b											
	AA	2 (0.4)		2 (0.7)	0 (0.0)		-			-		
<i>ESRβ</i>	AG	39 (8.5)	0.33	21 (7.6)	18 (9.9)	0.45	1.00 (reference)	-	-	1.00 (reference)	-	-
	GG	416 (91.0)		253 (91.7)	163 (90.1)		0.78 (0.48-1.26)			1.12 (0.82-1.53)		
	rs4986938^c											
	AA	70 (15.5)		42 (15.3)	28 (15.8)		1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	AG	219 (48.6)	0.74	135 (49.3)	84 (47.5)	0.92	1.07 (0.71-1.63)	0.67	0.75	1.09 (0.72-1.66)	0.61	0.64
	GG	162 (35.9)		97 (35.4)	65 (36.7)		0.95 (0.61-1.47)			0.94 (0.60-1.46)		
	rs1271572^c											
	GG	77 (17.0)		39 (14.2)	38 (21.5)		1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	GT	233 (51.7)	0.26	148 (54.0)	85 (48.0)	0.13	0.75 (0.52-1.10)	0.98	0.22	0.76 (0.52-1.12)	0.86	0.22
	TT	141 (31.3)		87 (31.8)	54 (30.5)		0.95 (0.63-1.43)			0.99 (0.65-1.48)		

Data are expressed as n (%).

n = numbers; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium test; p: p-value from chi-square test;

[‡]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Model 1: adjusted for age and center; model 2: model 1 + personal history of stroke, daily alcohol consumption, and diabetes.

^a p-value from additive model; ^b p-value from codominant model. Tests were considered significant at p≤0.005 after Bonferroni correction to account for multiple testing: (0.05 divided by 5×2, corresponding to the number of SNPs and genetic models tested).

Missing: ^a =24; ^b =15; ^c = 21.

Table S6: The distribution of *ESR1* and *ESR2* genotypes in the sub-cohort according to the tertile of total and free estradiol.

		Total estradiol				Free estradiol			
Estrogen Receptor		T1	T2	T3	p	T1	T2	T3	p
		(<15.36)	(15.36-21.66)	(≥21.67)	trend	(<0.54)	(0.54-0.76)	(≥0.77)	trend
		(n=157)	(n=158)	(n=157)		(n=157)	(n=158)	(n=157)	
<i>ESRα</i>	rs2234693^a								
	CC	31 (20.8)	35 (23.2)	32 (21.6)	0.80	30 (20.3)	36 (23.7)	32 (21.6)	0.68
	CT	74 (49.7)	74 (49.0)	74 (50.0)		73 (49.3)	75 (49.3)	74 (50.0)	
	TT	44 (29.5)	42 (27.8)	42 (28.4)		45 (30.4)	41 (27.0)	42 (28.4)	
	rs9340799^a								
	AA	18 (12.2)	20 (13.4)	17 (11.3)	0.73	18 (12.2)	20 (13.3)	17 (11.3)	0.72
	AG	68 (46.3)	74 (49.3)	76 (50.3)		67 (45.6)	75 (50.0)	76 (50.3)	
	GG	61 (41.5)	56 (37.3)	58 (38.4)		62 (42.2)	55 (36.7)	58 (38.4)	
	<i>ESRβ</i>								
	rs1256049^b								
	AA	0 (0.0)	1 (0.7)	1 (0.7)	0.86	0 (0.0)	1 (0.7)	1 (0.7)	0.86
	AG	14 (9.3)	13 (8.4)	12 (7.9)		14 (9.3)	13 (8.4)	12 (7.9)	
	GG	137 (90.7)	141 (90.9)	138 (91.4)		137 (90.7)	141 (90.9)	138 (91.4)	
	rs4986938^c								
	AA	21 (14.1)	18 (11.9)	31 (20.5)	0.07	21 (14.1)	18 (11.9)	31 (20.5)	0.07
	AG	69 (46.3)	76 (50.3)	74 (49.0)		69 (46.3)	76 (50.3)	74 (49.0)	
	GG	59 (39.6)	57 (37.8)	46 (30.5)		59 (39.6)	57 (37.8)	46 (30.5)	
	rs1271572^c								
	GG	25 (16.6)	25 (16.3)	27 (18.4)	0.51	24 (15.9)	26 (16.9)	27 (18.4)	0.69
	GT	80 (52.9)	87 (56.9)	66 (44.9)		80 (52.9)	87 (56.9)	66 (44.9)	
	TT	46 (30.5)	41 (26.8)	54 (36.7)		47 (31.2)	40 (26.2)	54 (36.7)	

Data are expressed as n (%).

n = numbers; T: tertiles of estradiol (cut-off in pg/mL).

p: p-value from chi-square test; Missing: ^a =24; ^b =15; ^c = 21.

Table S7: All-cause mortality according to baseline free estradiol concentration by ER Polymorphisms in the 3C cohort study[¥].

	Events	HR (95% CI)	Events	HR (95% CI)	Events	HR (95% CI)	p ^α	p ^β
ESRα								
rs2234693^a		CC (n = 98)		CT (n = 222)		TT (n = 128)		
T1 (<0.54)	10	1.01 (0.34-3.00)	26	1.32 (0.75-2.30)	19	2.27 (1.08-4.80)	0.59	0.90
T2 (0.54-0.76)	12	1.00 (reference)	26	1.00 (reference)	15	1.00 (reference)		
T3 (≥0.77)	12	1.48 (0.53-4.14)	32	1.48 (0.86-2.56)	22	1.94 (0.92-4.12)		
p-quadratic		0.650		0.178		0.031		
rs9340799^a		AA (n = 175)		AG (n = 218)		GG (n = 55)		
T1 (<0.54)	25	1.76 (0.95-3.25)	22	1.10 (0.60-2.01)	8	1.72 (0.35-8.48)	0.67	0.45
T2 (0.54-0.76)	21	1.00 (reference)	26	1.00 (reference)	6	1.00 (reference)		
T3 (≥0.77)	28	1.83 (0.96-3.47)	36	1.60 (0.92-2.79)	5	1.08 (0.21-5.64)		
p-quadratic		0.041		0.280		0.645		
ESRβ								
rs1256049^b		AA (n = 2)		AG (n = 39)		GG (n = 416)		
T1 (<0.54)	0	NA	5	1.27 (0.18-9.09)	51	1.29 (0.88-1.91)	0.95	0.96
T2 (0.54-0.76)	0	NA	6	1.00 (reference)	49	1.00 (reference)		
T3 (≥0.77)	0	NA	7	1.28 (0.30-5.46)	63	1.39 (0.94-2.04)		
p-quadratic		NA		0.754		0.091		
rs4986938^c		AA (n = 70)		AG (n = 219)		GG (n = 162)		
T1 (<0.54)	10	7.11 (0.97-52.07)	26	1.72 (0.99-3.00)	19	1.03 (0.54-1.95)	0.46	0.57
T2 (0.54-0.76)	3	1.00 (reference)	26	1.00 (reference)	23	1.00 (reference)		
T3 (≥0.77)	15	8.20 (1.37-49.26)	32	1.47 (0.82-2.60)	23	1.83 (0.99-3.35)		
p-quadratic		0.029		0.066		0.248		
rs1271572^c		GG (n = 141)		GT (n = 233)		TT (n = 77)		
T1 (<0.54)	17	1.37 (0.57-3.25)	28	1.29 (0.77-2.18)	11	1.86 (0.66-5.23)	0.96	0.88
T2 (0.54-0.76)	10	1.00 (reference)	32	1.00 (reference)	11	1.00 (reference)		
T3 (≥0.77)	27	1.69 (0.73-3.91)	25	1.24 (0.70-2.22)	16	2.34 (0.94-5.83)		
p-quadratic		0.298		0.324		0.091		

Notes: [¥]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Models were adjusted for age, center, personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes, sex hormone-binding globulin, smoking, BMI, and hypercholesterolemia.

Abbreviations: T, tertiles of free estradiol (cut-off in pg/mL); ^α, interaction for additive model; ^β, interaction for codominant model.

Missing: ^a=24; ^b=15; ^c=21.

Table S8: All-cause and cause-specific mortality according to baseline total and free estradiol concentration after excluding participants who died during the first four years of follow-up (n=41)[‡].

Estradiol (pg/mL)	Total estradiol				Free estradiol	
	Events	Model 3 (n= 431)		p	Model 3 (n= 431)	
		HR (95% CI)			HR (95% CI)	p
All-cause mortality	144					
T1	42	1.38 (0.90-2.10)	0.14		1.37 (0.90-2.09)	0.15
T2	42	1.00 (reference)	--		1.00 (reference)	--
T3	60	1.68 (1.12-2.52)	0.01		1.67 (1.11-2.52)	0.01
p-quadratic			0.02			0.03
Cardiovascular mortality	37					
T1	10	1.81 (0.74-4.46)	0.20		1.77 (0.72-4.36)	0.21
T2	9	1.00 (reference)	--		1.00 (reference)	--
T3	18	2.95 (1.27-6.86)	0.01		2.93 (1.26-6.82)	0.01
p-quadratic			0.04			0.04
Cancer mortality	44					
T1	12	0.90 (0.43-1.90)	0.78		0.92 (0.44-1.94)	0.82
T2	13	1.00 (reference)	--		1.00 (reference)	--
T3	19	1.35 (0.68-2.70)	0.39		1.37 (0.68-2.73)	0.38
p-quadratic			0.76			0.72
Other causes of mortality	63					
T1	20	1.72 (0.90-3.30)	0.10		1.69 (0.88-3.24)	0.12
T2	20	1.00 (reference)	--		1.00 (reference)	--
T3	23	1.43 (0.74-2.77)	0.29		1.42 (0.74-2.75)	0.30
p-quadratic			0.12			0.14

Notes: [‡]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Model 4: adjusted for age, center, personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes and sex hormone-binding globulin, smoking, BMI, Hypercholesterolemia, testosterone, and interactions of testosterone with diabetes and hypertension.

Abbreviations: T, tertiles of hormone (cut-off in pg/mL): free estradiol [T1 (<0.54), T2 (0.54-0.76), T3 (≥0.77)], total estradiol [T1 (<15.35), T2 (15.35-21.66), T3 (≥21.67)].

Table S9: All-cause and cause-specific mortality according to baseline total and free estradiol concentration after a 12 year follow-up in the 3C cohort study; models were further adjusted for testosterone level[¥].

Estradiol (pg/mL)	Total estradiol				Free estradiol	
	Events	Model 4 (n= 472)		p	Model 4 (n= 472)	
		HR (95% CI)			HR (95% CI)	p
All-cause mortality	183					
T1	57	1.38 (0.95-2.01)	0.09		1.37 (0.94-1.99)	0.10
T2	55	1.00 (reference)	--		1.00 (reference)	--
T3	71	1.52 (1.04-2.20)	0.03		1.51 (1.04-2.19)	0.03
p-quadratic			0.03			0.03
Cardiovascular mortality	44					
T1	12	2.46 (1.04-5.83)	0.04		2.44 (1.02-5.79)	0.04
T2	10	1.00 (reference)	--		1.00 (reference)	--
T3	22	3.18 (1.42-7.12)	<0.01		3.17 (1.41-7.09)	<0.01
p-quadratic			<0.01			<0.01
Cancer mortality	57					
T1	16	0.82 (0.42-1.58)	0.55		0.82 (0.42-1.58)	0.55
T2	18	1.00 (reference)	--		1.00 (reference)	--
T3	23	1.18 (0.63-2.22)	0.35		1.18 (0.63-2.22)	0.61
p-quadratic			0.95			0.95
Other causes of mortality	82					
T1	29	1.57 (0.90-2.73)	0.11		1.54 (0.88-2.68)	0.13
T2	27	1.00 (reference)	--		1.00 (reference)	--
T3	26	1.21 (0.67-2.20)	0.53		1.20 (0.66-2.17)	0.55
p-quadratic			0.22			0.22

Notes: [¥]: Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) computed using inverse probability weighted Cox models.

Model 4: adjusted for age, center, personal history of coronary disease and stroke, daily alcohol consumption, hypertension, diabetes and sex hormone-binding globulin, smoking, BMI, Hypercholesterolemia, testosterone, and interactions of testosterone with diabetes and hypertension.

Abbreviations: T, tertiles of hormone (cut-off in pg/mL): free estradiol [T1 (<0.54), T2 (0.54-0.76), T3 (≥0.77)], total estradiol [T1 (<15.35), T2 (15.35-21.66), T3 (≥21.67)].

Table S10: Comparison between total estradiol levels and estrogen receptor polymorphism by vital status after a 12 year follow-up in the 3C cohort study.

		Cases				Controls			
	Estrogen receptor	T1 (<15.36) (n=57)	T2 (15.36-21.66) (n=55)	T3 (≥21.67) (n=71)	p	T1 (<15.36) (n=94)	T2 (15.36-21.66) (n=98)	T3 (≥21.67) (n=82)	p
<i>ESRα</i>	rs2234693^a				0.94				0.98
	CC	10 (18.2)	12 (22.6)	12 (18.2)		21 (22.3)	23 (23.5)	20 (24.4)	
	CT	26 (47.3)	26 (49.1)	32 (48.5)		48 (51.1)	48 (49.0)	42 (51.2)	
	TT	19 (34.5)	15 (28.3)	22 (33.3)		25 (26.6)	27 (27.5)	20 (24.4)	
	rs9340799^a				0.59				0.94
	AA	25 (45.5)	21 (39.6)	28 (40.6)		36 (39.1)	35 (36.1)	30 (36.6)	
	AG	22 (40.0)	26 (49.1)	36 (52.2)		46 (50.0)	48 (49.5)	40 (48.8)	
	GG	8 (14.5)	6 (11.4)	5 (7.3)		10 (10.9)	14 (14.4)	12 (14.6)	
<i>ESRβ</i>	rs1256049^b				0.95				0.80
	AA	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (1.0)	1 (1.2)	
	AG	5 (8.9)	6 (10.9)	7 (10.0)		9 (9.5)	7 (7.0)	5 (6.2)	
	GG	51 (91.1)	49 (89.1)	63 (90.0)		86 (90.5)	92 (92.0)	75 (92.6)	
	rs4986938^c				0.19				0.32
	AA	10 (18.2)	3 (5.8)	15 (21.4)		11 (11.7)	15 (15.2)	16 (19.8)	
	AG	26 (47.3)	26 (50.0)	32 (45.7)		43 (45.7)	50 (50.5)	42 (51.9)	
	GG	19 (34.6)	23 (44.2)	23 (32.9)		40 (42.6)	34 (34.3)	23 (28.4)	
	rs1271572^c				0.10				0.98
	GG	17 (30.4)	10 (18.9)	27 (39.7)		29 (30.5)	31 (31.0)	27 (34.2)	
	GT	28 (50.0)	32 (60.4)	25 (36.8)		52 (54.7)	55 (55.0)	41 (51.9)	
	TT	11 (19.6)	11 (20.8)	16 (23.5)		14 (14.7)	14 (14.0)	11 (13.9)	

T: tertiles of total estradiol (cut-off in pg/mL).

p for Chi-square test.

Missing: ^a =24; ^b =15; ^c =21.

Table S11: Comparison between free estradiol levels and estrogen receptor polymorphism by vital status after a 12 year follow-up in the 3C cohort study.

		Cases			p	Controls			p
Estrogen receptor		T1 (<0.54) (n=57)	T2 (0.54-0.76) (n=55)	T3 (≥0.77) (n=71)		T1 (<0.54) (n=94)	T2 (0.54-0.76) (n=98)	T3 (≥0.77) (n=82)	
<i>ESRα</i>	rs2234693^a				0.94				0.98
	CC	10 (18.2)	12 (22.6)	12 (18.2)		20 (21.5)	24 (24.2)	20 (24.4)	
	CT	26 (47.3)	26 (49.1)	32 (48.5)		47 (50.5)	49 (49.5)	42 (51.2)	
	TT	19 (34.5)	15 (28.3)	22 (33.3)		26 (28.0)	26 (26.3)	20 (24.4)	
	rs9340799^a				0.59				0.91
	AA	25 (45.5)	21 (39.6)	28 (40.6)		37 (40.2)	34 (35.1)	30 (36.6)	
	AG	22 (40.0)	26 (49.1)	36 (52.2)		45 (48.9)	49 (50.5)	40 (48.8)	
	GG	8 (14.5)	6 (11.4)	5 (7.3)		10 (10.9)	14 (14.4)	12 (14.6)	
<i>ESRβ</i>	rs1256049^b				0.95				0.80
	AA	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (1.0)	1 (1.2)	
	AG	5 (8.9)	6 (10.9)	7 (10.0)		9 (9.5)	7 (7.0)	5 (6.2)	
	GG	51 (91.1)	49 (89.1)	63 (90.0)		86 (90.5)	92 (92.0)	75 (92.6)	
	rs4986938^c				0.19				0.32
	AA	10 (18.2)	3 (5.8)	15 (21.4)		11 (11.7)	15 (15.2)	16 (19.8)	
	AG	26 (47.3)	26 (50.0)	32 (45.7)		43 (45.7)	50 (50.5)	42 (51.9)	
	GG	19 (34.6)	23 (44.2)	23 (32.9)		40 (42.6)	34 (34.3)	23 (28.4)	
	rs1271572^c				0.10				0.98
	GG	17 (30.4)	10 (18.9)	27 (39.7)		30 (31.6)	30 (30.0)	27 (34.2)	
	GT	28 (50.0)	32 (60.4)	25 (36.8)		52 (54.7)	55 (55.0)	41 (51.9)	
	TT	11 (19.6)	11 (20.8)	16 (23.5)		13 (13.7)	15 (15.0)	11 (13.9)	

T: tertiles of free estradiol (cut-off in pg/mL).

p for Chi-square test.

Missing: ^a =24; ^b =15; ^c =21.

Titre : Hormones sexuelles et mortalité chez les hommes au cours du vieillissement dans l'étude de cohorte des Trois Cités.

Mots clés : épidémiologie, hormones, syndrome métabolique, récepteurs aux estrogènes, mortalité, hommes.

Résumé : Malgré de nombreuses études concernant le rôle des hormones sexuelles endogènes sur la mortalité chez les hommes, les résultats demeurent à ce jour contradictoires et pourraient dépendre des caractéristiques des sujets ainsi que des causes de décès. A partir de l'étude prospective de cohorte des Trois Cités réalisée en France, nous avons évalué le rôle de la testostérone et de l'estradiol endogènes sur le risque de mortalité après 12 ans de suivi chez les hommes de plus de 65 ans, en prenant en compte le contexte clinique et génétique des sujets ainsi que les causes spécifiques de décès. Tout d'abord, nous avons mis en évidence une interaction significative entre les concentrations de testostérone et la présence du syndrome métabolique (SM) sur la mortalité. Les taux bas d'hormone étaient associés à une augmentation du risque de mortalité chez les hommes présentant un SM alors qu'aucune relation entre la testostérone et le décès n'a été observée chez les sujets sains. De plus, des analyses réalisées exclusivement chez les hommes sains ont montré que les taux élevés de testostérone

étaient associés à un risque de mortalité cardiovasculaire mais pas de mortalité par cancers ou par autres causes. Enfin, nous avons mis en évidence une association quadratique entre les niveaux d'estrogène et le risque de mortalité toutes causes. Cette relation n'était pas modifiée par les polymorphismes génétiques des récepteurs aux estrogènes mais dépendait en revanche des causes de décès. Une relation quadratique plus marquée a été mise en évidence avec la mortalité cardiovasculaire alors qu'aucune association n'a été trouvée entre les niveaux d'estradiol et le risque de mortalité par cancers et par autres causes. En conclusion, ce travail a confirmé les liens complexes entre les hormones endogènes et le risque de mortalité chez les hommes et a permis de comprendre en partie la divergence des résultats de la littérature. Ces résultats pourraient permettre l'identification de sous-groupes à haut risque et d'améliorer la prise en charge clinique et thérapeutique des hommes au cours du vieillissement.

Title: Sex steroid hormones and mortality in elderly men from the Three-City cohort study.

Keywords: epidemiology, hormones, metabolic syndrome, estrogen receptors, mortality, men.

Abstract: Despite a number of studies regarding the association of endogenous sex steroid hormones with mortality in men, the results remain controversial and could depend on the characteristics of the subjects and the cause of death. Using the data from the prospective Three-City cohort study set-up in France, we investigated the role of endogenous testosterone and estradiol on 12-year mortality in men over 65 years, taking into account the clinical and genetic background, as well as the cause-specific of death. Firstly, we found a significant interaction of testosterone with metabolic syndrome (MetS) on mortality. Low levels of testosterone were associated with an increased risk of mortality among men suffering from MetS while there was no association of hormone with death in healthy subjects. Then, analyses restricted to healthy men showed that high levels of testosterone increased

the risk of death from cardiovascular disease but not from cancer or other cause. Finally, we highlighted a quadratic association between endogenous estradiol and all-cause mortality. This relationship was not modified by genetic polymorphisms of estrogen receptors but could depend on the cause of death. A stronger quadratic association was found with cardiovascular disease mortality but estradiol did not influence the risk of cancer or other cause of mortality. In conclusion, this thesis confirmed the complex role of endogenous sex steroid hormones on mortality in men and allowed to better understand previous controversial results. If confirmed, these results could help identifying subgroups at high risk, improving the clinical and therapeutic management of men during aging.