

Prix Alain Depierre 2019

Polymorphisme **CCSP** et récurrence dans l'étude IFCT-0302

Dr Solenn Brosseau

Etudiante en thèse de sciences, INSERM U830, Institut Curie

PHU en disponibilité, service d'oncologie thoracique, Hôpital Bichat - APHP, Université de Paris
solenn.brosseau@aphp.fr

Rationnel

Le cancer bronchique non à petites cellules

Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) reste la première cause de mortalité par cancer dans les pays développés (Mao, 2016). Les formes localisées (stade I) à localement avancées (stade III) peuvent bénéficier d'une prise en charge multimodale incluant la chirurgie, et permettant d'obtenir une survie prolongée au-delà de 5 ans chez 36% (pN2) à 75% (pN0) des patients (Asamura, 2015). Si la moitié des patients décèdent de cause extérieure au cancer bronchique (Meyer, 2018), un nombre important de patients opérés va présenter une nouvelle maladie tumorale, soit sous la forme d'une récurrence de la première tumeur, soit sous la forme d'un second cancer, justifiant la réalisation d'une surveillance postopératoire. Cependant, jusqu'en 2005, il n'existait aucun essai randomisé évaluant le mode optimal de surveillance après résection complète d'un CBNPC (Westeel, 2007).

L'essai IFCT 0302

L'IFCT a donc mené un essai comparant une surveillance minimale (examen clinique, radiographie thoracique) à une surveillance scannographique (scanner thoraco-abdominal injecté, éventuellement associé à une fibroscopie bronchique pour les histologies épidermoïdes), chez les patients ayant bénéficié de la résection chirurgicale complète d'un CBNPC de stade I à IIIA. L'objectif principal était de montrer une amélioration de la survie globale chez les patients ayant bénéficié d'une surveillance scannographique. Entre janvier 2005 et novembre 2012, 1775 patients ont été randomisés (hommes 76%, âge médian 63 ans, carcinomes épidermoïdes et à grandes cellules 39%, stades I 68%, stades II 13%, stade III 18%, lobectomie ou bilobectomie 86%, radiothérapie 8%, chimiothérapie 45%). Après un suivi médian de 8.7 ans, la survie globale n'était pas significativement différente entre les deux groupes (HR = 0.92, IC95%: 0.8-1.07; p = 0.27). La survie médiane était de 8.2 ans (IC95%: 7.4-9.6) en cas de surveillance minimale et de 10.3 ans (IC95%: 8.5-non atteinte) en cas de surveillance scannographique (Westeel, 2017). L'essai IFCT0302 n'a donc pas atteint son objectif principal, mais des analyses à plus long terme seront menées, et la collection biologique associée à l'étude permet d'envisager l'analyse de facteurs de risque de récurrence dans le plasma et l'ADN des patients.

La protéine CCSP

Les cellules Club sont des cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire, capables de se multiplier, mais également de se différencier en cellules ciliées ou en pneumocytes de type II. Les cellules Club sécrètent la protéine Club Cell Secretory Protein (CCSP), également dénommée Secretoglobin family 1A member 1 (SCGB1A1) ou Club Cell protein (CC10 ou CC16). La protéine CCSP est sécrétée par les cellules Club sous forme d'un homodimère de 15.8 kDa composé de 70 acides aminés. La protéine CCSP est présente en abondance dans les voies aériennes humaines, où elle peut être quantifiée dans un lavage bronchio-alvéolaire (LBA), mais également dans le sang périphérique, où elle peut être quantifiée dans le sérum. La protéine CCSP présente un rôle anti-inflammatoire et immunomodulateur par inhibition de PLA2, des prostaglandines pro-inflammatoire, du chemotactisme, et de la production de cytokine (Boers, 1999).

Les concentrations de protéine CCSP sont modifiées dans les pathologies pulmonaires associées à des altérations épithéliales. La concentration de CCSP est ainsi diminuée dans le sérum et le LBA des patients atteints de BPCO, alors qu'elle est augmentée chez les patients atteints de sarcoïdose et de fibrose pulmonaire idiopathique. De même, les agressions pulmonaires liées aux infections, inhalation, barotraumatisme, ou inflammation systémique entraînent également des modifications de la concentration de CCSP, qui est diminuée chez les fumeurs, et augmentée chez les patients sous ventilation mécanique ou présentant une atteinte pulmonaire dans le cadre d'un syndrome de défaillance multi-viscérale (Laucho-Contreras, 2015).

Le polymorphisme CCSP G38A

Chez l'homme, le gène codant pour la protéine CCSP est situé sur le chromosome 11 au locus 11q12.3-13.1 et à proximité d'autres gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et immunitaire. Ce gène mesure 4.1 kb réparties en 3 exons et 2 introns. In vitro, la transcription de ce gène est régulée par des facteurs de transcription comme Nkx2.1 ou p53, mais également par les fumées du tabac ou les lipopolysaccharides des bactéries. Dans la population générale, ce gène est le siège d'un polymorphisme unique (single nucleotide polymorphism dbSNP rs3741240) situé 38 bp en aval du site d'initiation de la transcription au sein de la région non codante de l'exon 1 du gène CCSP. Ce polymorphisme entraîne une substitution G38A et sera donc dénommé CCSP G38A dans la suite du projet.

En clinique, l'allèle A est porté par 34% de la population générale et associé à une diminution de 25% de la concentration de protéine CCSP dans les voies aériennes et dans le sang des individus concernés (Zhang, 1997). La diminution de la protéine anti-inflammatoire CCSP associée à l'allèle A pourrait être associée à un risque de développer une sarcoïdose à la suite d'un trigger inconnu, une BPCO en cas de tabagisme, ou encore une dysfonction chronique du greffon en cas de transplantation pulmonaire (Wong, 2009).

In vitro, l'interaction entre le polymorphisme CCSP et l'environnement n'a été que récemment étudiée. Par rapport à l'allèle G majoritaire, l'allèle A est associé à une augmentation de la répression du gène en réponse à la fumée du tabac mais pas en réponse aux lipopolysaccharides des bactéries. L'allèle A est également associé à une perte de la répression du gène en réponse à la protéine p53. Ainsi, des données suggèrent que les cellules porteuses de l'allèle G présentent une concentration de protéine considérée comme normale mais qui diminue en cas d'activation de p53, alors que les cellules porteuses de l'allèle A présentent une concentration de protéine CCSP diminuée à l'état de base mais qui reste stable en cas d'activation de p53 (Knabe, 2016).

Notre équipe a étudié le lien entre la présence d'un allèle A chez le donneur et le risque de dysfonction primaire du greffon après transplantation pulmonaire. De façon intéressante, l'allèle A était associé à une diminution du risque de dysfonction primaire du greffon, possiblement par le biais de la résistance à la protéine p53 décrit plus haut (Hin, 2018). Ce premier travail positif sur l'interaction entre le polymorphisme CCSP et l'environnement auquel est soumis le poumon nous a donné l'idée de nous intéresser à l'interaction entre polymorphisme CCSP, tabagisme, et survenu d'un cancer.

CCSP et cancer

En préclinique, l'action de la protéine CCSP sur les lignées tumorales a été étudiée *in vitro* et *in vivo*. In vitro, l'expression de CCSP dans des lignées tumorales peut reverser leurs phénotypes d'invasion et de croissance indépendante de la surface à la condition que les cellules expriment le récepteur de la protéine CCSP (Zhang, 1999). In vivo, les souris CCSP-KO exposées à des carcinogènes du tabac présentent une incidence plus élevée de mutation KRAS, d'activation des MAPKineses, d'hyperplasie épithéliale, et d'adénome bronchique que les souris contrôle (Yang, 2004).

Alors que la protéine CCSP joue un rôle important dans l'inflammation et le remodelage de l'épithélium pulmonaire, il n'y a que peu de travaux portant sur l'expression de la protéine chez les

patients atteints de CBNPC. Comme annoncé plus haut, la concentration de protéine CCSP est plus faible dans le sang et le LBA chez les sujets fumeurs et BPCO que chez les sujets contrôles. La concentration de protéine CCSP dans le LBA a été associée à la régression de dysplasies épithéliales chez des patients fumeurs à haut risque de cancer bronchique (Chen, 2008).

Une étude plus récente a cherché à analyser le lien entre la concentration plasmatique de protéine CCSP d'une part, et la mortalité toutes causes ou la mortalité par cancer d'autre part, au sein d'une cohorte de patients dont la santé respiratoire est suivie prospectivement depuis 1972. L'étude a inclus 1086 patients âgés de 21 à 70 ans, dont 60% étaient décédés en 2011. Après ajustement sur le sexe, l'âge, le niveau d'éducation, l'indice de masse corporelle, le tabagisme, et les EFR, la concentration plasmatique de protéine CCSP était inversement corrélée à la mortalité toutes causes, à la mortalité par cancer et à la mortalité par cancer bronchique (Guerra, 2013). A notre connaissance, aucun travail n'a porté sur risque de survenue d'un CBNPC en fonction du polymorphisme *CCSP* G38A ou de la concentration plasmatique de protéine CCSP.

Objectifs

L'objectif principal de cette étude est d'analyser le lien entre la présence d'un polymorphisme *CCSP*G38A d'une part, et le risque de récurrence ou de second cancer bronchique d'autre part, chez les patients ayant bénéficié de la résection complète d'un cancer bronchique de stade I à IIIA dans le cadre de l'essai IFCT0302.

Chez les mêmes patients et dans le même cadre, les objectifs secondaires sont:

- d'analyser le lien entre la concentration plasmatique de protéine CCSP et le risque de récurrence ou de second cancer bronchique ;
- d'analyser le lien entre la présence d'un polymorphisme *CCSP* G38A et la concentration plasmatique de protéine CCSP ;
- d'analyser le lien entre ces deux variables et la survenue d'un cancer quelqu'il soit ;
- d'analyser le lien entre ces deux variables et la survie sans récurrence ;
- d'analyser le lien entre ces deux variables et la survie sans second cancer bronchique ;
- d'analyser le lien entre ces deux variables et la survie sans second d'un cancer quelqu'il soit ;
- d'analyser le lien entre ces deux variables et la survie globale.

Polymorphisme *CCSP* et récurrence dans l'étude IFCT0302

Approches méthodologiques

Patients

Nous proposons de réaliser une étude ancillaire sur la biocollection associée à l'essai IFCT0302. L'essai IFCT0302 a inclus 1775 patients entre janvier 2005 et novembre 2012. Les données démographiques, les comorbidités médicales, les caractéristiques tumorales, et le devenir des patients sont disponibles. Le suivi médian est de 8.7 ans. La survie médiane est de 8.2 ans.

Prélèvements

A l'inclusion dans l'étude, les patients ont bénéficié de prélèvements sanguins ayant permis la séparation du plasma et l'extraction de l'ADN constitutionnel, actuellement conservés au Centre d'Etude des Polymorphismes Humains (CEPH) de l'Hôpital St Louis à Paris.

Evaluation du polymorphisme *CCSP* G38A (rs3741240)

Etudes exploratoires en Sanger. L'évaluation du polymorphisme *CCSP* G38A en technique Sanger a déjà été utilisée dans notre équipe et décrite en totalité dans une précédente publication (Hin, 2018). Brièvement, une amplification PCR du gène *SCGB1A1* codant pour la protéine CCSP est réalisé avec des primers déterminés avec Primer3 puis vérifiés sur BLAST et SNPCheck version3.2.1,

Reference Genome Build version:37.1 et dbSNP Build version:141. Les primers utilisés sont 5' - TCCCTTCACTGCCTCCAG - 3' (forward: 18nt) et 5' - CTCCTCCCTCCAGGCTATTC - 3' (reverse: 20nt). Le produit de la PCR est ensuite visualisé sur Caliper® (Labchip), nettoyé sur Exostar®, positionné sur une plaque de séquençage, et séquencé sur 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life technologies). Les résultats des séquences forward et reverse sont lus sur Chromas® 1.4 et SeqScape®, permettant de déterminer le polymorphisme G38A par comparaison à des séquences de référence (Hin, 2018). En utilisant cette méthode, une analyse exploratoire de faisabilité a été réalisée sur 10 prélèvements, permettant la détermination du statut de polymorphisme *CCSP* de l'ensemble des patients testés. Les résultats de cette analyse exploratoire sont résumés dans la

Figure 1. De façon intéressante, on notera que la fréquence du polymorphisme correspond à la fréquence attendue dans la population générale.

Figure 1. Détermination du polymorphisme CCSP sur 10 patients de l'essai IFCT0302.

Numéro de prélèvement	Sexe	Résultat CCSP rs3741240
00165	M	G/G
00289	F	A/A
00317	M	G/G
00401	M	G/G
00445	M	G/A
00448	M	G/G
00597	M	G/A
00654	F	G/G
00700	F	G/G
00819	F	G/G

Etude principale en PCR Taqman®. Pour analyser le polymorphisme CCSP sur l'ensemble des patients inclus dans l'essai IFCT0302, nous utiliserons la technique de PCR Taqman®, technique de PCR en temps réel adaptée à l'analyse de polymorphismes notamment de SNP. Cette technique repose sur l'utilisation de 2 sondes oligonucléotidiques fluorescentes, complémentaires de la séquence encadrant le SNP d'intérêt. Chaque sonde spécifique d'un variant allélique comporte un rapporteur fluorescent à l'extrémité 5' (dans le cadre de cette étude la 6-carboxy-fluorescéine (FAM) pour l'allèle T et la 2-chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescéine (VIC) pour l'allèle G) et un extincteur appelé quencher à l'extrémité 3'. Ce quencher a pour but d'absorber la fluorescence du rapporteur. Durant la PCR, la Taq polymérase rencontre la sonde appariée spécifiquement à son brin complémentaire, clive partiellement cette dernière libérant le rapporteur du quencher et levant l'inhibition de fluorescence. La fluorescence émise est une mesure de la sonde appariée à un allèle spécifique. En pratique, un mélange de 9 µl est réparti dans chaque puit comportant : 5 µl de TaqPath ProAmp Master Mix (Thermofisher©) contenant une Taq polymérase, 0.3 µl de Taqman SNP Assay rs3741240 (Thermofisher©) contenant les sondes fluorescentes ainsi que des amorces et 3.7µl d'eau. 1µl d'ADN normalisé à 20 ng/l est distribué par puit. Afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification et de l'absence de contamination, un témoin négatif est réalisé comportant un mélange sans ADN. L'amplification par PCR sur le thermocycleur FAST 7500 (Thermofisher©) comporte les étapes suivantes : une phase initiale de dénaturation à 95°C pendant 5 min puis 40 cycles comportant 15 secondes à 95°C de dénaturation suivi de 60 secondes à 60°C d'extension.

Dosage de la concentration plasmatique de protéine CCSP

La technique de dosage de la concentration plasmatique de protéine CCSP a déjà été utilisée dans notre équipe et décrite en totalité dans une précédente publication (Hin, 2018). Brièvement, après décongélation des plasmas cryopréservés, la concentration de protéine CCSP sera déterminée en utilisant le kit Human Uteroglobin (CCSP) DuoSet ELISA (R&D Systems). Les résultats sont exprimés en ng/mL.

Critères de jugement

Le critère de jugement principal est la survenue d'une récurrence ou d'un second cancer bronchique quelque soit le délai. Les critères de jugement secondaires sont les délais jusqu'à survenue d'une récurrence, d'un second cancer bronchique, d'un second cancer quelqu'il soit, du décès, ou la dernière visite de suivi. Ces délais sont définis comme les délais entre la date de l'intervention chirurgicale et la date de l'événement d'intérêt.

Analyses statistiques

Les variables continues ayant des distributions normales seront rapportées en moyenne et écart type, et comparées en utilisant le test t de Student. Les variables continues ayant une distribution non-normale seront rapportées en moyenne, médiane, et interquartile, et comparées en utilisant le test de Mann Whitney. Les variables catégorielles seront rapportées en nombres et proportions, et comparées en utilisant les tests de Fisher ou du Chi-2 en fonction des effectifs. Des courbes de survie actuarielle seront estimées par la méthode de Kaplan-Meier, et comparées en utilisant le test du logrank.

Des modèles de Cox seront utilisés pour analyser le lien entre les variables d'intérêt et la survie sans récurrence, sans second cancer bronchique, sans second cancer quelqu'il soit, ou globale.

Les résultats du polymorphisme sont exprimés en GG, AG, ou AA. Le polymorphisme est considéré comme dominant, autorisant la comparaison du groupe GG au groupe AG+AA (Hin, 2018). Des analyses spécifiques seront menées pour prendre en compte d'éventuelles interactions entre le tabagisme et la concentration plasmatique de protéine CCSP. Toutes les analyses statistiques seront réalisées en utilisant des tests bilatéraux. Une valeur de $p < 0.05$ sera considérée comme significative. Les analyses statistiques seront réalisées sur Prism (GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) et R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, www.r-project.org).

Aspects éthiques et réglementaires.

L'étude IFCT0302 a reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes le 07/11/03, et a été déclarée à la Direction Générale de la Santé le 12/02/04. Les patients inclus dans l'étude IFCT0302 ont signé un consentement à l'inclusion dans un protocole de recherche interventionnelle, avec un consentement spécifique autorisant les recherches biologiques sur le plasma et sur l'ADN constitutionnel. L'étude actuelle sera soumise au Conseil Scientifique et au Conseil d'administration de l'IFCT. Une demande spécifique sera également soumise au Comité de Protection des Personnes.

Résultats attendus en termes d'avancées scientifiques

L'essai IFCT0302 n'a pas montré de différence entre une surveillance radiologique et une surveillance scannographique après résection complète d'un cancer bronchique de stade I à IIIA. En plus du risque de récurrence du premier cancer, le risque cumulé de présenter un second cancer bronchique reste élevé. Il a récemment été estimé à 20.2% à 10 ans (IC95 : 15.3-23.2) et 25.2% à 14 ans (CI95: 19.4-31.3 ; Leroy, 2019).

Après un premier cancer, la recherche de nouveaux facteurs de risque de récurrence et de développement de second cancer est donc primordiale afin d'adapter les protocoles de surveillance

au risque individuel de chaque patient. Si la présence d'un polymorphisme *CCSP* ou la concentration de protéine *CCSP* recherchées au moment de la prise en charge du premier cancer sont liées à la survenue d'une récidive ou d'un second cancer, les protocoles de surveillance dans un premier temps, puis de traitements adjuvants dans un second temps, pourraient être individualisés. De façon plus large, la recherche de facteurs de risque de cancer bronchique en lien avec le tabagisme permet d'envisager une adaptation des protocoles de dépistage du cancer bronchique dans la population générale. Malgré une accumulation de preuves scientifiques de haut niveau (NLST, 2011 ; De Koning, 2018), la mise en place des programmes de dépistage est toujours retardée par leur coût et par leur faible rendement. Au delà du tabagisme, l'identification d'un nouveau facteur de risque de développer un cancer bronchique constituerait une avancée majeure. Cette identification permettrait de resserrer le dépistage du cancer bronchique sur les patients fumeurs les plus à risque de développer un cancer à cause d'une sensibilité génétique individuelle liée au polymorphisme *CCSP*.

Bibliographie

1. Mao Y, Yang D, He J, Krasna MJ. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016;25(3):439-45.
2. Asamura H, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Rusch VW, Vansteenkiste JF, Watanabe H, Wu YL, Zielinski M, Ball D, Rami-Porta R; International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Board Members, and Participating Institutions. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N Descriptors in the Forthcoming 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(12):1675-84.
3. Meyer G, Besse B, Doubre H, Charles-Nelson A, Aquilanti S, Izadifar A, Azarian R, Monnet I, Lamour C, Descourt R1, Oliviero G1, Taillade L, Chouaid C, Giraud F, Falcoz PE, Revel MP, Westeel V, Dixmier A, Tredaniel J, Dehette S, Decroisette C, Prevost A, Pichon E, Fabre E, Soria JC, Friard S, Stern JB, Jabot L, Dennewald G, Pavy G, Petitpretz P, Tourani JM, Alifano M, Chatellier G, Girard P. Anti-tumour effect of low molecular weight heparin in localised lung cancer: a phase III clinical trial. *Eur Respir J*. 2018;52(4).
4. Westeel V, Lebitasy MP, Mercier M, Girard P, Barlesi F, Blanchon F, Tredaniel J, Bonnette P, Woronoff-Lemsi MC, Breton JL, Azarian R, Falcoz PE, Friard S, Geriniere L, Laporte S, Lemarie E, Quoix E, Zalcmán G, Guigay J, Morin F, Milleron B, Depierre A; Intergroupe Francophone de Cancerologie Thoracique (IFCT). [IFCT-0302 trial: randomised study comparing two follow-up schedules in completely resected non-small cell lung cancer]. *Rev Mal Respir*. 2007;24(5):645-52.
5. Westeel V, Barlesi F, Foucher P, Lafitte JJ, Domas J, Girard P, Tredaniel J, Wislez M, Dumont P, Quoix E, Raffy O, Braun D, Derollez M, Goupil F, Hermann J, Devin E, Pichon E, Gury JP, Morin F, Souquet PJ. Results of the phase III IFCT-0302 trial assessing minimal versus CT-scan-based follow-up for completely resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* 2017; 28 (5) 2017, mdx378.012.
6. Boers JE, Ambergen AV and Thunnissen FB. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1585-1591.
7. Laucho-Contreras ME, Polverino F, Gupta K, Taylor KL, Kelly E, Pinto-Plata V, Divo M, Ashfaq N, Petersen H, Stripp B, Pilon AL, Tesfaigzi Y, Celli BR, Owen CA. Protective role for club cell secretory protein-16 (CC16) in the development of COPD. *Eur Respir J*. 2015;45(6):1519-20.
8. Zhang Z, Zimonjic DB, Popescu NC, Wang N, Gerhard DS, Stone EM, Arbour NC, De Vries HG, Scheffer H, Gerritsen J, Colle'e JM, Ten Kate LP, Mukherjee AB. Human uteroglobin gene: structure, subchromosomal localization, and polymorphism. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 73-83.
9. Knabe L, Varilh J, Bergougnoux A, Gamez AS, Bonini J, Pommier A, Petit A, Molinari N, Vachier I, Taulan-Cadars M, Bourdin A. *CCSP G38A* polymorphism-environment interactions regulate *CCSP* levels differentially in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 ; 311: 696-703.
10. Wong AP, Keating A, Waddell TK. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein

and the cells that express it. *Cytotherapy* 2009; 6 (11): 676–687.

11. Hin A, Kannengiesser C, Roussel A, Renaud-Picard B, Roux A, Reynaud-Gaubert M, Claustre J, Tissot A, Guillemain R, Mornex JF, Mussot S, Dromer C, Dahan M, Brugière O, Mercier O, Borie R, Pretolani M, Castier Y, Mordant P; COLT Consortium. Donor Club Cell Secretory Protein G38A Polymorphism Is Associated With a Decreased Risk of Primary Graft Dysfunction in the French Cohort in Lung Transplantation. *Transplantation*. 2018;102(8):1382-1390.

Polymorphisme *CCSP* et récurrence dans l'étude IFCT0302

9

12. Zhang Z, Kundu GC, Panda D, Mandal AK, Mantile-Selvaggi G, Peri A, Yuan CJ, Mukherjee AB. Loss of transformed phenotype in cancer cells by overexpression of the uteroglobin gene. *PNAS* 1999; 96 (7): 3963-3968.

13. Yang Y, Zhang Z, Mukherjee AB, Linnoila RI. Increased susceptibility of mice lacking Clara cell 10-kDa protein to lung tumorigenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a potent carcinogen in cigarette smoke. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29336-40.

14. Chen J, Lam S, Pilon A, McWilliams A, Macaulay C, Szabo E. Higher levels of the anti-inflammatory protein CC10 are associated with improvement in bronchial dysplasia and sputum cytometric assessment in individuals at high risk for lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1590-7.

15. Guerra S, Vasquez MM, Spangenberg A, Halonen M, Martinez FD. Serum concentrations of club cell secretory protein (Clara) and cancer mortality in adults: a population-based, prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2013;1(10):779-85.

16. Leroy T, Monnet E, Guertzler S, Jacoulet P, De Bari B, Falcoz PE, Gainet-Brun M, Lahourcade J, Alfreijat F, Almotlak H, Adotevi O, Pernet D, Polio JC, Desmarests M, Woronoff AS, Westeel V. Let us not underestimate the long-term risk of SPLC after surgical resection of NSCLC. *Lung Cancer*. 2019;137:23-30.

17. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011;365(5):395-409.

18. De Koning H, Van Der Aalst C, Ten Haaf K, Oudkerk M. Effects of volume CT lung cancer screening: mortality results of the NELSON randomized-controlled population based trial. Abstract PL02.05, World Congress on Lung Cancer, Toronto, September 2018.