

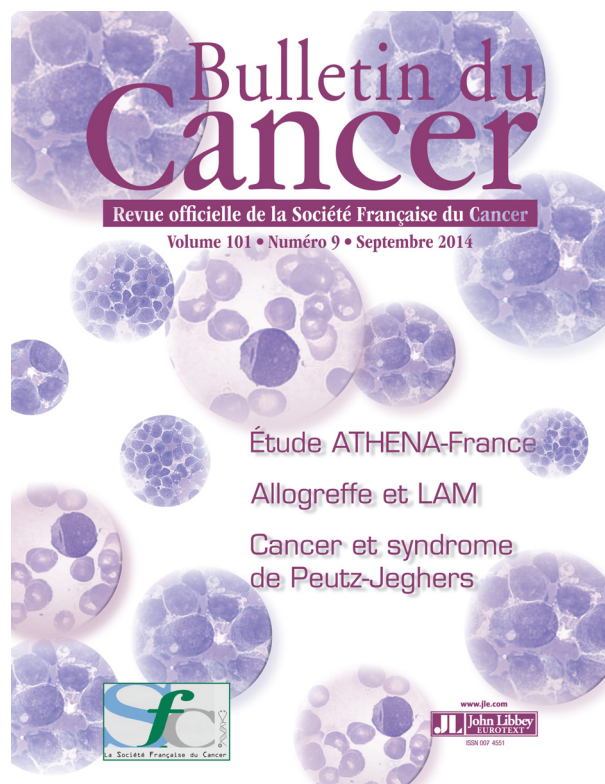


L'essentiel de l'information  
scientifique et médicale

[www.jle.com](http://www.jle.com)

**Le sommaire de ce numéro**

<http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/medecine/bdc/sommaire.md?type=text.html>



**Montrouge, le 27-09-2014**

Samia Dorgham

**Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article au format électronique (pdf) :**

Association des polymorphismes du gène *méthylène-tétrahydrofolate réductase* avec la leucémie myéloïde chronique

**paru dans**

Bulletin du Cancer, 2014, Volume 101, Numéro 9

**John Libbey Eurotext**

*Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire. Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.*

© John Libbey Eurotext, 2014

# Association des polymorphismes du gène méthylène-tétrahydrofolate réductase avec la leucémie myéloïde chronique

## Association between methylene-tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and chronic myeloid leukemia

Samia Dorgham<sup>1</sup>, Meriem Aberkane<sup>1,2</sup>, Wefa Boughrara<sup>1</sup>, Badra Antar Soltan<sup>3</sup>, Nemra Mehalhal<sup>4</sup>, Hadj Touhami<sup>2</sup>, Noureddine Sidimansour<sup>5</sup>, Nadia Merad Boudia<sup>6</sup>, Lotfi Louhibi<sup>1</sup>, Abdallah Boudjema<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université des sciences et de la technologie d'Oran, Mohamed-Boudiaf (USTO-MB), Laboratoire de génétique moléculaire et cellulaire, BO 1505 El-Mnaouer, 31000 Oran, Algérie

<dorghsam@gmail.com>

<sup>2</sup> Établissement hospitalier universitaire d'Oran, Service de biologie moléculaire et cytogénétique, Oran, Algérie

<sup>3</sup> Établissement hospitalo-universitaire d'Oran, Service d'hématologie, Oran, Algérie

<sup>4</sup> Centre hospitalo-universitaire de Mascara, Service d'hématologie, Mascara, Algérie

<sup>5</sup> Centre hospitalo-universitaire Constantine, Service d'hématologie, Constantine, Algérie

<sup>6</sup> Centre hospitalo-universitaire de Tlemcen, Service d'hémodiagnostic et de transfusions sanguines, Tlemcen, Algérie

Pour citer cet article : Dorgham S, Aberkane M, Boughrara W, Antar Soltan B, Mehalhal N, Touhami H, Sidimansour N, Merad Boudia N, Louhibi L, Boudjema A. Association des polymorphismes du gène méthylène-tétrahydrofolate réductase avec la leucémie myéloïde chronique. *Bull Cancer* 2014 ; 101 : 803-7.

doi : 10.1684/bdc.2014.1953.

Article reçu le 24 septembre 2014,  
accepté le 21 février 2014  
Tirés à part. : S. Dorgham

**Résumé.** MTHFR est une enzyme clé du métabolisme des folates. Peu d'études ont été rapportées à propos de sa corrélation avec le risque de leucémie myéloïde chronique (LMC). Dans le but de rechercher l'association entre les polymorphismes C677T et A1298C du gène *MTHFR* et la LMC, nous avons mené une étude cas-témoins dans un échantillon de 90 cas et 100 témoins originaires d'Algérie. Le génotypage a été réalisé par discrimination allélique TaqMan<sup>®</sup>, les résultats obtenus sont analysés par le test  $\chi^2$ . Les fréquences de l'allèle 677T et des génotypes 677TT et 677CT étaient significativement plus élevées chez les cas par rapport aux contrôles (respectivement  $p=1E-6$  ; OR=6,77 et  $p=1E-6$  ; OR=10,38). De même, a été observé pour les fréquences de l'allèle 1298C et des génotypes 1298AC et 1298CC (respectivement  $p=9 E-6$  ; OR=2,65 et  $p=0,008$  ; OR=2,22). Nous avons également observé une association significative des haplotypes 677T/1298A et 677T/1298C avec la LMC (respectivement  $p=0,007$  ; OR=2,57 et  $p=5 E-6$ , OR=6,91). Nos résultats démontrent, que les allèles 677T et 1298C sont associés à un risque accru de LMC en Algérie. ▲

**Abstract.** Methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme of folate metabolism. Few studies were reported about its relationship with chronic myeloid leukemia (CML). We conducted a case-control study analyzing the prevalence of the polymorphisms MTHFR C677T and MTHFR A1298C in Algerians CML patients. Using TaqMan<sup>®</sup> allelic discrimination assay, we investigate MTHFR C677T and A1298C polymorphism distribution in 90 cases of CML and 100 healthy subjects. The frequencies of 677T alleles and genotypes 677TT and 677CT were significantly higher in cases than in control ( $P=1E-6$ ; OR=6.77 [4.22-10.86]) and ( $P=1E-6$ ; OR=10.38 [4.56-23.6]) respectively. Also, the frequencies of 1298C alleles and genotypes 1298CC and 1298AC were higher in cases ( $P=9 E-6$ ; OR=2.65 [1.71-4.10]) and ( $P=0.008$ ; OR=2.22 [1.21-4.06]) respectively. We report also the higher significance of the haplotype 677T/1298A and 677T/1298C in cases ( $P=0.007$ ; OR=2.57 [1.26-5.24]) and ( $P=5 E-6$ , OR=6.91 [2.7646-17.2899]) respectively. Our results demonstrate that 677T and 1298C alleles are both associated with an increased risk of CML in Algeria. ▲

**Mots clés:** MTHFR, LMC, Algérie

**Key words:** MTHFR, CML, Algeria

## Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif monoclonal, évoluant en trois phases : chronique, accélérée, et blastique ; durant cette transformation, les cellules clonales deviennent moins différenciées

et acquièrent des aberrations chromosomiques [1]. La LMC est associée à un marqueur chromosomique spécifique, le chromosome philadelphie qui résulte de la translocation des chromosomes 9 et 22 [t(9 ; 22) (q34 ; q11)], cette translocation induit la fusion du proto-oncogène c-abl sur le

chromosome 9 et le gène *bcr* sur le chromosome 21, engendrant ainsi le gène hybride *Bcr-Abl* qui code une protéine à activité tyrosine kinase constitutivement active [2].

Même si l'aspect clinique et biologique de la LMC est bien connu, peu de travaux ont exploré la susceptibilité individuelle de cette maladie [3] ; des études d'association ont été menées afin d'identifier les variants génétiques associés au risque de la LMC, parmi lesquels, le gène *méthylène-tétrahydrofolate réductase* (MTHFR) [4]. Enzyme clé du cycle des folates, MTHFR converti le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (5,10-méthylène THF) en 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-méthyl THF), élément principal dans la conversion de l'homocystéine en méthionine dans la voie de méthylation de l'ADN ; le 5-méthyl THF favorise aussi la provision des nucléotides puriques et pyrimidiques pour la synthèse de l'ADN [5].

Deux polymorphismes génétiques connus sur le gène *MTHFR*, le C677T et le A1298C ont été rapportés comme étant corrélés à une diminution de l'activité enzymatique de l'enzyme. Le premier polymorphisme réside au niveau de l'exon 4 (ALA 222 VAL), altérant ainsi la base du site de fixation de la flavine adénine dinucléotide (FAD) cofacteur du MTHFR. Le second polymorphisme siège au niveau de l'exon 7 (GLU 429 ALA) ; il est situé dans le domaine S-adenosyl-méthionine-régulateur de l'enzyme [6]. La baisse de l'activité de MTHFR engendre une disponibilité importante du substrat 5,10-méthylène THF, permettant par conséquent une synthèse adéquate des pyrimidines et des purines. Cependant, cette même diminution pourrait engendrer des altérations oncogéniques potentielles dans la méthylation de l'ADN menant ainsi à un processus carcinogène [7].

Des études précédentes ont décrit les polymorphismes du gène *MTHFR* comme étant associés à un risque élevé de développement du cancer du sein [8], du cancer colorectal [9], endométrial [10], cervical [11], et gastrique [12]. Des associations ont été rapportées entre les polymorphismes génétiques de MTHFR et le risque de développer une leucémie, mais la plupart concernait la leucémie lymphoblastique aiguë [13] ; et celles qui ont été menées sur la LMC étaient contradictoires [14-17]. Notre but était de rechercher par le biais d'une étude cas-témoin une éventuelle association entre les variants du gène *MTHFR* et le risque de survenue de la LMC dans la population algérienne.

## Patients et méthodes

### Population d'étude

Cette présente étude a concerné 100 témoins sains (homme/femme : 1,15 âge moyen 47,3 ; S.D ± 15,3), et 90 patients atteints de LMC (homme/femme : 1,23 âge moyen 45,9 ; S.D ± 14,7), tous d'origine algérienne. Les patients suivis dans des services d'hématologie de différents hôpitaux algériens (Établissement hospitalier d'Oran, Centre hospitalo-universitaire d'Oran, Centre hospitalo-universitaire de Constantine, Centre hospitalo-universitaire de Mascara, Centre hospitalo-universitaire de Tlemcen), ont été diagnos-

tiqués en phase chronique de la LMC selon les critères cytologiques et hématologiques de l'Organisation mondiale de la santé (OMS 2008). Un consentement éclairé pour la participation à cette étude a été recueilli au préalable auprès de chacun des patients.

### Extraction d'ADN et génotypage

L'ADN génomique a été extrait à partir des leucocytes du sang périphérique par la technique *Salting out* [18]. Le génotypage a été réalisé par discrimination allélique TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### Analyse statistique

Dans cette étude, la signification de la distribution des génotypes et des allèles, a été évaluée par Chi<sup>2</sup> en utilisant le programme CONTING Version 2.80 ; l'analyse des distributions des fréquences des haplotypes chez les cas par rapport aux témoins a été réalisée par le logiciel THESIAS [19] ; l'odds ratio a été calculé avec un intervalle de confiance de 95 %.

## Résultats

L'étude de distribution des fréquences alléliques des deux polymorphismes C677T et A1298C a montré une forte augmentation de la fréquence des allèles 677T et 1298C chez les patients par rapport aux témoins (69,27 % *versus* 24,71 % ;  $p = 1E-6$  ; OR = 6,77 [4,22-10,86]) et (49,40 % *versus* 26,80 % ;  $p = 9 E-6$  ; OR = 2,65 [1,71-4,10]) respectivement. Cette même augmentation chez les cas a été retrouvée dans la distribution des fréquences des génotypes comportant l'allèle 677T (677TT et 677CT) (90,36 % *versus* 46,06 % ;  $p = 1E-6$  ; OR = 10,38 [4,56-23,6]), et des génotypes comportant l'allèle 1298C (1298CC et 1298AC) (67,85 % *versus* 48,45 % ;  $p = 0,008$  ; OR = 2,22).

Cette étude a montré également une augmentation significative des fréquences des haplotypes 677T/1298A ( $p = 0,007$  ; OR = 2,57 [1,26-5,24]) et 677T/1298C ( $p = 5 E-6$ , OR = 6,91 [2,76-17,28]). Cependant, on remarque aussi une hausse significative de la fréquence de l'haplotype portant les allèles 677C et 1298A chez les témoins par rapport au cas ( $p = 1E-6$  ; OR = 0,14 [0,06-0,30]).

Les distributions des fréquences des allèles, génotypes et haplotypes sont calculées et rapportées dans le *tableau 1*.

Il est à noter que nous n'avons pas obtenu de résultats pour sept cas et 11 témoins dans le génotypage du polymorphisme C677T, et six cas et trois témoins dans le génotypage du polymorphisme A1298C.

## Discussion

Selon nos résultats, la présence de l'allèle 677T à 24,71 % chez les témoins suggère que celui-ci représente l'allèle mineur dans la population algérienne, résultats similaires à ceux caractérisant d'autres populations comme le Maroc 26,5 % [20] et la Turquie 25,37 % [21]. En revanche, la fréquence de cet allèle varie entre 26,5 % et 46 % en Italie, 25,7 % au Moyen-Orient et 44,2 % en Chine [22].

**Tableau 1.** Distribution des fréquences alléliques, génotypiques et haplotypiques des polymorphismes C677T et A1298C du gène *MTHFR* chez les groupes de patients LMC et les témoins

Polymorphismes	Allèles Génotypes Haplotypes	LMC n (%)	Témoins n (%)	p (Valeur)	odd ratio (% CI)
C677T	C	51 (30,72)	134 (75,25)	1 E-6	6,77 [4,22-10,86]
	T	115 (69,27)	44 (24,71)		
	Total	166	178		
	CC	8 (9,63)	48 (53,93)	1 E-6	10,38 [4,56-23,6]
	CT + TT	75 (90,36)	41 (46,06)		
	Total	83	89		
A1298C	A	85 (50,59)	142 (73,19)	9 E-6	2,65 [1,71-4,10]
	C	83 (49,40)	52 (26,80)		
	Total	168	194		
	AA	27 (32,14)	50 (51,54)	0,008	2,22 [1,21-4,06]
	AC + CC	57 (67,85)	47 (48,45)		
	Total	84	97		
Haplotypes	677C/1298A	12 (14,63)	48 (47,79)	1 E-6	0,14 [0,06-0,30]
	677C/1298C	12 (14,63)	18 (18,2)	0,3	
	677T/1298A	29 (35,36)	15 (15,2)	0,007	2,57 [1,26-5,24]
	677T/1298C	29 (35,36)	6 (5,79)	5 E-6	6,91 [2,76-28]

LMC : leucémie myéloïde chronique ; n : nombre ; CI : intervalle de confiance.

Concernant le polymorphisme A1298C, l'allèle 1298C a été retrouvé minoritaire (26,80 %) dans la population témoins de notre étude. Ce pourcentage reste relativement proche de celui caractérisant la population marocaine ou turque 24,42 % [23] et 24,26 % [21] respectivement. Pendant qu'elle varie entre 28,1 % en Italie, 35,7 % en France [24] et 55 % au Pakistan [25]. Cela pourrait résulter de la différence ethnique et de la localisation géographique de chaque population.

Nos résultats montrent une association claire entre les deux polymorphismes du gène *MTHFR* et la survenue de la LMC chez notre population d'étude. L'association s'est avérée être significative pour les allèles mineurs des deux polymorphismes C677T et A1298C, avec une plus forte association de l'allèle 677T par rapport à l'allèle 1298A. Cela a été parallèlement confirmé par l'analyse de distribution des haplotypes ; nos résultats font également ressortir le fait que pour les haplotypes portant l'allèle 677T, le risque de développer une LMC est plus élevé en comparaison aux haplotypes ne portant pas cet allèle. Cette étude est la première étude d'association entre polymorphismes génétiques et risque de survenue de la LMC dans la population algérienne ; elle est aussi une des rares études à rapporter une association significative entre les polymorphismes explorés et cette pathologie. La taille de notre cohorte est suffisamment importante pour extrapoler nos résultats à toute la population algérienne puisque notre recrutement a été entrepris dans des Services d'hématologie de différents centres hospitaliers algériens (Établissement hospitalier d'Oran, Centre

hospitalo-universitaire d'Oran, Centre hospitalo-universitaire de Constantine, Centre hospitalo-universitaire de Mascara, Centre hospitalo-universitaire de Tlemcen). Ce large échantillonnage a été ainsi envisagé afin de limiter le risque éventuel de biais dans les résultats.

Dans les études précédentes, Smail *et al.* ont été les seuls à retrouver cette même association entre les deux polymorphismes C677T et A1298C et la LMC chez la population jordanienne [26]. Par ailleurs, deux études menées en Corée ont rapporté des résultats contradictoires concernant le polymorphisme A1298C ; En effet, Moon *et al.* ont démontré une association entre le génotype homozygote de l'allèle muté 1298CC et la LMC [15], alors que Hur *et al.* ont observé un effet protecteur pour le génotype hétérozygote de l'allèle muté 1298AC [14]. Deux autres études venues du Brésil se contredisent aussi sur l'implication du polymorphisme A1298C ; une première étude confirme la non-association du polymorphisme [16] alors qu'une étude plus récente rapporte que le génotype 1298AA augmenterait le risque de survenue de la LMC [17].

Parallèlement, Hussain *et al.* avaient établi une corrélation entre le génotype homozygote de l'allèle muté du polymorphisme C677T (677TT) et la LMC en Inde [27]. D'autres études menées sur des populations serbe [28], iranienne [29], et turque [30] confirment que le gène *MTHFR* n'exerce aucun effet sur le risque de développer une LMC. De telles contradictions dans les résultats pourraient être dues à la taille assez réduite de l'échantillon exploré dans certaines études

d'où l'absence de significativité statistique dans les résultats. D'autres interprétations de ces conclusions contradictoires seraient la variabilité ethnique et raciale des populations d'études et les facteurs environnementaux tels que l'apport de folate alimentaire.

Notre étude suggère que l'altération de la distribution intracellulaire des métabolites du folate induit par les différentes formes de MTHFR pourrait jouer un rôle dans le risque de survenue de la LMC. Des études diverses ont associé MTHFR à différents type de cancer tel que ceux cités précédemment. Actuellement, il semblerait qu'un déséquilibre au niveau du cycle du folate pourrait affecter la stabilité de l'ADN par les deux voies dans lesquelles il intervient. Le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate est un donneur de groupes méthyle pour l'uracile afin que celui-ci soit converti en thymine, utilisé alors pour la synthèse et la réparation de l'ADN. Si le taux de folate est limité, un déséquilibre dans le panel des précurseurs de l'ADN pourrait mener à l'incorporation de l'uracile à la place du thymine au niveau de l'ADN, ce qui pourrait par conséquent engendrer des cassures dans les deux brins de l'ADN ; cela pourrait être à l'origine des dommages chromosomiques et du cancer. D'un autre côté, le folate affecte l'expression des gènes par la régulation cellulaire de S-adenosyl-méthionine (SAM). Le 5-méthyl-tétrahydrofolate est un donneur de méthyle pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, qui a son tour est converti en SAM. Le SAM méthyle des cytosines spécifiques au niveau de l'ADN, régulant ainsi la transcription des gènes. Par conséquent, une diminution cellulaire de SAM, suite à une défaillance au niveau du folate, induirait une hypométhylation de l'ADN et potentiellement l'expression de proto-oncogènes responsables de la survenue du cancer [31]. Mais il semblerait que les polymorphismes C677T et A1298C réduisent l'activité de MTHFR ; cela pourrait exercer un rôle protecteur contre l'incorporation de l'uracile mais favoriserait l'hypométhylation de l'ADN. De ce fait, il semblerait que l'impact du métabolisme des folates dans le risque de survenue de la LMC pourrait varier suite aux interactions spécifiques gène-environnement, essentiellement due à cette influence de l'apport en folates sur la régulation des gènes impliqués dans ce même métabolisme. Cet impact pourrait également être la conséquence de certaines interactions gène-gène. En effet, des variations dans d'autres protéines impliquées dans la médiation de la voie de métabolisation des folates, comme la méthionine synthase, thymidylate synthase, serine hydroxy-méthyltransférase et dihydrofolate réductase pourraient elles aussi contribuer dans le risque de l'instabilité de l'ADN et dans la survenue du cancer [6]. De plus, le rôle des polymorphismes du gène *MTHFR* dans la carcinogenèse semble dépendre des types de cellules et d'organes impliqués (leucémie chronique *versus* leucémie aiguë, hémopathies malignes *versus* tumeurs solides) et de son interaction avec d'autres gènes intervenant dans la carcinogenèse [28]. Ces différentes interactions gène-environnement et gène-gène, pourraient expliquer le cas des patients qui ne possèdent pas les allèles causaux des polymorphismes C677T et A1298C du gène *MTHFR* et qui ont toutefois développé une LMC. Il serait

donc intéressant qu'une étude explorant cette influence des interactions environnementales et génétiques sur la survenue de la LMC dans notre contexte, soit entreprise pour confirmer cette association retrouvée. De plus, des études plus approfondies sur MTHFR et d'autres gènes associés à la même voie métabolique seraient souhaitables pour mieux comprendre le rôle exact des folates et de MTHFR dans l'hématopoïèse et les transformations malignes.

En conclusion, notre étude est la première à établir une association entre les polymorphismes C677T et A1298C et la susceptibilité à la LMC dans la population algérienne. Cependant, il reste indispensable d'élargir les échantillons des cas et des témoins pour confirmer ces résultats. Il est également intéressant d'étudier des gènes intervenant dans la méthylation de l'ADN pour mettre en évidence la part de l'intervention du gène *MTHFR* dans ce processus. ▼

**Remerciements.** Cette étude a été financée par PCI/USTO-MB (projet espagnol de collaboration internationale, Université des sciences et de la technologie, Oran). Nous remercions le Dr Baba Ahmed Bey (Département de biotechnologie de l'Université d'Oran, Algérie) pour nous avoir fourni le support technique afin de mener cette étude, nous tenons également à remercier l'ensemble des patients et leurs familles, les volontaires témoins, et les hématologues pour leur aimable collaboration à ce travail.

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

## Références

1. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2002 ; 107 : 7.
2. Quintas-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2006 ; 81 : 973-88.
3. Miranda-Vilela AL, Lordelo GS. Role of methylenetetrahydrofolate reductase (*Mthfr*), glutathione S-transferases (*Gsts M1* and *T1*) and haptoglobin (*Hp*) gene polymorphisms in susceptibility to chronic myeloid leukemia (*Cml*). *J Hematol Thromb Dis* 2013 ; 1 : 1000103.
4. Lordelo GS, Miranda-Vilela AL, Akimoto AK, et al. Association between methylene tetrahydrofolate reductase and glutathione S-transferase *M1* gene polymorphisms and chronic myeloid leukemia in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 2012 ; 2 : 1013-26.
5. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 ; 94 : 3290-5.
6. Robien K, Ulrich CM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a huge mini review. *Am J Epidemiol* 2003 ; 157 : 571-82.
7. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, et al. Colorectal adenomas and the C677T *MTHFR* polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999 ; 8 : 659-68.
8. Semenza JC, Delfino RJ, Ziogas A, Anton-Culver H. Breast cancer risk and methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism. *Breast Cancer Res Treat* 2003 ; 7 : 217-23.
9. Ryan BM, Weir DG. Relevance of folate metabolism in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Lab Clin Med* 2001 ; 138 : 164-76.
10. Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J, Reventos J. Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1997 ; 18 : 2307-11.

11. Piyathilake CJ, Macaluso M, Johanning GL, Whiteside M, Heimburger DC, Giuliano A. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res* 2000; 20: 1751-7.
12. Shen H, Xu Y, Zheng Y, et al. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate methylenereductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. *Int J Cancer* 2001; 95: 332-6.
13. Skibola CF, Smith MT, Kane E, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 22: 12810-5.
14. Hur M, Park JY, Cho HC, Lee KM, Shin HY, Cho HI. Methylenetetrahydrofolate reductase A1298C genotypes are associated with the risks of acute lymphoblastic leukaemia and chronic myelogenous leukaemia in the Korean population. *Clin Lab Haematol* 2006; 28: 154-9.
15. Moon HW, Kim TY, Oh BR, et al. MTHFR 677CC/1298CC genotypes are highly associated with chronic myelogenous leukemia: a case-control study in Korea. *Leuk Res* 2007; 31: 1213-7.
16. Barbosa CG, Souza CL, Pereira de Moura Neto J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in myeloid leukemia patients from North Eastern Brazil. *Gen Mol Biol* 2008; 31: 29-32.
17. Lordelo GS, Miranda-Vilela AL, Akimoto AK, et al. Association between methylene tetrahydrofolate reductase and glutathione S-transferase M1 gene polymorphisms and chronic myeloid leukemia in a Brazilian population. *Gen Mol Res* 2012; 2: 1013-26.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 3: 1215.
19. Tregouet DA, Tiret L. Cox proportional hazards survival regression in haplotype-based association analysis using the Stochastic-EM algorithm. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 971-4.
20. Paluku They-They T, Hamzi K, Mazabraud A, Nadifi S. Fréquence du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les populations arabe et berbère du Maroc. *Antropology* 2009; 20: 11-7.
21. Karaa I, Sazcib A, Ergulb E, Kayaa G, Kilic G. Association of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with migraine risk. *Mol Brain Res* 2003; 111: 84-90.
22. Almawi WY, Finan RR, Tamim H, Daccache JL, Irani-Hakime N. Differences in the frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene among the Lebanese population. *Am J Hematol* 2004; 76: 85-7.
23. Eloualid A, Abid O, Charif M, et al. Association of the MTHFR A1298C variant with unexplained severe male infertility. *Plos One* 2012; 3: e34111.
24. Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debard R, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 701-7.
25. Yakub M, Moti N, Parveen S, Chaudhry B, Azam I, Iqbal MP. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a pakistani population. *Plos One* 2012; 3: e33222.
26. Ismail SI, Ababneh NA, Awidi A. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotype association with the risk of chronic myelogenous leukemia. *J Med J* 2009; 1: 8-14.
27. Hussain SR, Naqvi H, Raza ST, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genetic polymorphisms and risk of leukaemia among the North Indian population. *Cancer Epidemiol* 2012; 36: 227-31.
28. Jakovljevic K, Malisic E, Cavic M, Radulovic S, Jankovic R. Association between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and risk of chronic myeloid leukemia in Serbian population. *Leuk Lymphom* 2012; 7: 1327-30.
29. Vahid P, Farnaz R, Zaker F, Farzaneh A, Parisa R. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and risk of myeloid leukemia. *Lab Med* 2010; 8: 490-4.
30. Deligezer U, Akisik E, Dalay N. Genotyping of the MTHFR gene polymorphism C677T in patients with leukemia by melting curve analysis. *Mol Diagn* 2004; 3: 181-5.
31. Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inherit Metab Dis* 2011; 1: 101-9.