



EVALUATION DES INDICATEURS BIOLOGIQUES D'EXPOSITION AUX PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES ET LA FONCTION HEPATIQUE DES AGRICULTEURS DE LA COMMUNE DE GOGOUNOU AU NORD-EST DU BENIN

Hinson Antoine Vikkey¹, Mama Cissé Ibrahim¹, Lawin Hervé¹, Dossou Fidèl¹, Gounongbé Fabien², Ayelo Paul¹, Benjamin FAYOMI¹

1= Unité d'Enseignement et de Recherches en Santé au Travail et Environnement, Faculté des Sciences de la santé de Cotonou (UAC)

2= Faculté de médecine de l'Université de Parakou

Auteur correspondant : E-mail: hinsvikkey@yahoo.fr Tél : (00229)97 09 91 54

RESUME

Introduction : L'utilisation des pesticides organophosphorés est très répandue au Bénin. La méconnaissance de ses effets sur la santé humaine et la mauvaise utilisation sont à l'origine des nombreuses intoxications aiguës observées dans les pays en voie de développement en général et au Bénin en particulier. L'objectif de cette étude a été de rechercher les indices biologiques (par dosage de l'Acétylcholinestérase: AChE et de marqueurs d'hépatite) de l'intoxication aux pesticides OP en vue d'une action préventive.

Méthodologie : il s'agit d'une étude descriptive transversale ayant concerné 41 producteurs de coton de la commune de Gogounou sélectionnés après un échantillonnage aléatoire systématique.

Résultats: La quasi-totalité de notre échantillon est de sexe masculin (97,6%) avec une moyenne d'âge de 32,38± 9,38 ans. Les pesticides organophosphorés manipulés sont de la classe II (classification de l'Organisation Mondiale de la Santé : OMS). La moyenne d'AChE en pré-exposition n'est pas différente de celle de post-exposition ($p > 0,05$). Toutefois on a noté une baisse de l'AChE par rapport au niveau de base: la pré-exposition chez 51,2% de notre échantillon. Il a été démontré une certaine relation entre l'exposition aux pesticides et la survenue de carcinomes hépatocellulaires et par ricochet avec les hépatites. 17,1% des sujets de notre échantillon ont été diagnostiqués positifs aux marqueurs des hépatites B et C. Chez ces derniers on a noté une baisse importante de la moyenne d'AChE de post-exposition par rapport à la pré-exposition ($p < 0,05$).

Conclusion : une surveillance épidémiologique et biologique des utilisateurs de pesticides assurerait à coup sûr une amélioration de l'état de santé de nos braves paysans en les épargnant de ces impacts dus à l'utilisation massive de pesticides. La présente étude mérite d'être approfondie notamment sur un échantillon beaucoup plus large en vue de pouvoir faire des inférences.

ABSTRACT

Introduction: the use of organophosphate pesticides is very wide-spread in Benin. The misunderstanding of its effects on the human health and the misuse are at the origin of the numerous poisonings aiguës observed in developing countries generally and in Benin in particular. The objective of this study was to look for the biological indications (by dosage of Acétylcholinestérase and markers of hepatitis) of the poisoning in pesticides OP with the aim of a preventive action.

Method: it is about a transverse descriptive study having concerned 41 cotton producers of the municipality of Gogounou selected after a systematic random sampling. Results: Almost our entire sample is male (97.6 %) with a mean age of 32.38 ± 9.38 years. All the organophosphate pesticides used belong to the class II (classification of the WHO). The average of AChE in pre-exposure is not different from that of the post-exposure ($p > 0.05$). However we noted a reduction in AChE with regard to the base level: the pre-exposure to 51.2 % of our sample. A certain relation between the exposure to pesticides and arisen of hépatocellulaires carcinomas and on the rebound with hepatitis was demonstrated. 17.1 % of the subjects of our sample were diagnosed positive in the markers of hepatitis B and C, to the latter we noted an important reduction in the average of AChE of post-exposure compared with the pre-exposure ($p = 0.05$).

Conclusion: An epidemiological and biological surveillance of the users of pesticides would assure certainly an improvement of the health of our nice farmers in saver of these impacts due to the massive use of pesticides. The present study deserves to be gone deeper into in particular on a much wider sample to being able to make inferences.

INTRODUCTION

L'intensification des pratiques agricoles depuis les années 50 s'est accompagnée de l'avènement de l'usage à grande échelle des

pesticides organiques et de synthèse [1]. Dans les pays développés, de véritables entreprises agricoles ont vu le jour. Dans les pays en développement, les exploitations agricoles sont

restées des entités familiales de subsistance non structurées. La nécessité d'accroître les rendements agricoles pour faire face aux besoins d'une population sans cesse croissante, s'est accommodée de l'usage des pesticides sur toutes les spéculations dans les pays africains.

Mais cette utilisation à grand échelle des pesticides n'est pas sans conséquence pour la santé des hommes et des écosystèmes [2]. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), « il y aurait chaque année 1,5 millions de cas d'empoisonnement aux pesticides entraînant la mort de plusieurs milliers de travailleurs agricoles dont les enfants dans les pays du sud. Bien que les pays africains importent moins de 10% des pesticides utilisés dans le monde, ils totalisent la moitié des empoisonnements accidentels et plus de 75% des cas mortel » [3].

D'après la convention de Rotterdam un à deux millions de préparations chimiques sont en vente dans le monde [4]. De plus on enregistre dans ces pays 99% de décès dus à ces intoxications alors qu'ils n'utilisent que 25 % des pesticides mis sur le marché mondial [5].

Dans une étude publiée en 2009, Badarou S et Coppieters ont enregistré entre mai 2007 et Juillet 2008 au Bénin, 105 cas d'intoxication dont 9 décès dus à l'endosulfan [6]. Des études menées par plusieurs auteurs au Bénin, ont révélé une contamination des écosystèmes à des concentrations en produits phytosanitaires parfois supérieures à la norme béninoise et à la norme de l'OMS [7, 8, 9]. Ezzat S. et al dans leur étude en Egypte ont estimé que les expositions aux organophosphorés et carbamate seraient des facteurs de risque additifs aux infections virales d'hépatite B et C [10].

Aussi des études ont abordé la possibilité d'accroissement du risque de carcinomes hépatocellulaires lorsque l'on est exposé aux pesticides [11]. La positivité pour l'antigène de surface d'hépatite B (AgHBs) est un facteur de risque principal pour le carcinome hépatocellulaire [12].

Vu ce qui précède, l'intoxication aux pesticides constitue un grave problème de santé publique dans les pays en voie de développement dont le nôtre où il n'existe aucune politique sanitaire bien définie pour s'occuper des paysans. La recherche d'une approche diagnostique et préventive à ces intoxications nous ont conduit à choisir le thème suivant : «Evaluation des indicateurs biologiques d'exposition aux pesti-

cides organophosphorés et la fonction hépatique des agriculteurs de la commune de Gogounou au nord-est du Bénin».

CADRE D'ETUDE ET METHODOLOGIE

Notre étude s'est déroulée dans la commune de Gogounou une des communes productrice de coton dans le département de l'Alibori. Elle s'est déroulée dans la période du 27 Juin au 04 Août 2012.

Nous avons procédé à une étude descriptive transversale. Sur une population d'étude de 88 producteurs de coton (liste fournie par l'agent CERPA de la commune), nous avons grâce à un échantillonnage aléatoire systématique avec un pas de sondage de 2, sélectionné 44 agriculteurs. Seuls 41 de ces agriculteurs répondant à nos critères d'inclusion que sont: être agriculteur des deux sexes, ayant manipulé des pesticides organophosphorés au moins les cinq dernières années et avoir donné son consentement, ont été pris en compte dans l'échantillon final.

La collecte des données a été faite essentiellement par le dosage de l'Ache et des marqueurs des hépatites B (Ag HBs) et C (anticorps anti-VHC) pour explorer l'impact sur la fonction hépatique.

Pour le dosage de l'hépatite: Le statut d'infection à virus de l'hépatite B a été testé par le dosage de l'antigène de surface d'hépatite B (Ag HBs) via radioimmuno-essai [13]. Le test a été fait au moment des prélèvements pour le dosage des cholinestérases.

Pour la mesure de l'Ache, un contrôle de qualité a été pratiqué une fois par semaine sur un même individu ; une variation intra individuelle considérée comme normale (moins de 5%) a été retrouvée.

L'activité de l'acétylcholinestérase érythrocytaire (AChE) a été mesurée par la méthode d'Ellman modifiée utilisant un appareil standardisé : le Test Mate®. La mesure a été rapportée au taux d'hémoglobine également donné par l'appareil donnant ainsi une unité de mesure en Unité par gramme d'Hémoglobine (U/g d'Hb). Afin de considérer chaque individu comme son propre témoin comme le recommande la procédure de dosage de l'AChE, cette mesure de l'AChE a été faite en deux temps chez le même individu : avant la période de pulvérisation et un mois après la pulvérisation.

Analyse des données

Les données ont été entrées et analysées avec le logiciel SPSS 17.0. Une analyse descriptive des différents groupes a été faite en utilisant la moyenne et la déviation standard pour les variables continues ayant une distribution normale. Les variables catégorielles sont décrites en utilisant les fréquences. Les moyennes ont été comparées par le test t de Student. Le test de Levene a permis d'évaluer l'égalité des variances. Quand il est supérieur à 0,10 nous avons considéré que les variances sont égales. Le test de chi-carré a été utilisé pour comparer les proportions dans les deux groupes. Lorsque les conditions pour le khi-deux ne le permettent pas, test exact de Fisher a été utilisé. Le seuil de significativité est fixé à 0,05.

RESULTATS

Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude

Tableau 1: Répartition de la population selon l'âge et le sexe

Para-mètres		Effec-tif	Pourcen-tage
Sexe	Masculin	40	97,6
	Féminin	1	2,4
Total		41	100
Classes d'âge (ans)	15-25	12	29,3
	26-35	11	26,8
	36-45	15	36,6
	46-55	3	7,3
Total		41	100

La grande majorité de la population est de sexe masculin (97,6%). 56,1% de la population a au plus 35 ans d'âge.

La moyenne d'âge est de $32,38 \pm 9,38$ ans avec des extrêmes allant de 18 à 55 ans. Le poids moyen est de $63,63 \pm 12,24$ Kg avec des extrêmes allant de 43 à 103 Kg.

Les pesticides organophosphorés utilisés à Gogounou dans la période d'étude par les paysans de notre population d'étude ont pour noms commerciaux : calfos, fanga, profenet, tenor et le calife. Leur principe actif est le Pro-fenofos: c'est un insecticide de classe II selon la classification de l'OMS.

Marqueurs de l'hépatite

Tableau 2 : Répartition de la population selon l'infection virale hépatique

		Nombre	Pourcentage
Hépatite B (AgHBs)	Positif	6	14,6
	Négatif	35	85,4
Hépatite C (Anticorps anti-VHC)	Positif	1	2,4
	Négatif	40	97,6

14,6% des utilisateurs de pesticides sont infectés par le virus de l'hépatite B et 2,4% par celui du C.

Dosage de l'activité cholinestérasique

Tableau 3: Activité cholinestérasique des érythrocytes des agriculteurs

Paramètres	AChE pré- exposition	AChE post-exposition
n	41	41
Moyenne (Ulg/Hb)	2,9151	2,9332
Déviati on standard	0,51742	0,53101
Min -max	1,93 - 4,64	1,82 – 4,08
Intervalle de confiance à 95%	[2,75 ; 3,07]	[2,76 ; 3,10]

p= 0,855 (test t de student)

La moyenne d'AChE en pré-exposition n'est pas statistiquement différente de celle de la période post-exposition ($p > 0,05$).

Evolution de l'activité cholinesthésique par rapport à la période de pulvérisation

Tableau 4: Répartition de la variation de l'activité cholinesthésique

Variation de la moyenne d'AChE entre les deux périodes de prélèvement :		Fréquence	Pourcentage
Δ AChE= (AChE après - AChE avant)			
Baisse d'Ache	Oui	21	51,2
	Non	20	48,8

51,2% de nos enquêtés ont une baisse de leur activité cholinesthésique après la pulvérisation par rapport à avant la pulvérisation.

Le niveau de la baisse d'Ache se répartit comme suit pour ces 21 enquêtés :

-] 0 à 30% [= 10/41 soit 24,39% de la population d'étude
- [30% à 50% [= 5/41 soit 12,19% de la population d'étude
- ≥50% = 6/41 soit 14,63% de la population d'étude

Tableau 5: Variation de l'AChE (U/ml) chez les individus AgHBs positif.

	Moyenne (Ulg/Hb)	Déviati on standard	p
Avant exposition	3,15	0,38	p<0,05
Après exposition	2,89	0,43	

Les sujets dont l'AgHBs est positif ont eu leur taux d'AChE diminué de façon significative après exposition aux OP (p<0,05).

DISCUSSION

Les intoxications aiguës aux pesticides organophosphorés constituent un problème majeur santé publique sur le plan mondial vu les milliers de morts y afférant et enregistrés chaque année. La plupart des intoxications surviennent dans les pays en voie de développement dont le Bénin. Contrairement aux intoxications aiguës, on en sait très peu sur l'effet sur la santé humaine des intoxications chroniques dues à des expositions à petites doses de pesticides à long terme alors que 80% de la population est dans les zones rurales et sont fréquemment confrontées à ces intoxications. C'est dans ce cadre que la présente étude a été menée.

La presque quasi-totalité des enquêtés étaient des hommes: 97,6%. Ce qui ne reflète pas réellement le profil de la population rurale béninoise. Cette situation pourrait s'expliquer par les survivances culturelles à l'origine de la difficulté pour la femme bariba ou peulh de se prononcer sur les activités et la vie du couple sans l'autorisation du mari. Les hommes

étaient alors tout indiqués pour se prêter à une telle étude. Cette tendance exclusivement masculine est retrouvée dans l'étude de Passiani 99,1% [14] et par d'autres auteurs brésiliens [15,16,17]. Mais dans leur cas ces résultats confirmeraient le profil de la population rurale brésilienne. Une étude chinoise en population générale retrouve cependant une tendance inverse où les femmes étaient majoritairement représentées [18].

La population est jeune : la moyenne d'âge est de 32,38 ± 9,38 ans est similaire à celui trouvé en 2012 par Passiani et al : 37,7ans ± 12,5 au Brésil [14], mais est supérieur à celui retrouvé en Thaïlande dans une enquête CAP portant sur des travailleuses de sexe féminin et qui était de 26,0 ±6,8 ans.

On ne note pas de pesticide de la classe I (la : extrêmement dangereux et Ib : très dangereux) de la classification de l'OMS. Tous les pesticides répertoriés sont de la classe II (modérément dangereux). Ces résultats sont sem-

blables d'une part à ceux de Lafia et d'Affedjou au Bénin [19,20] et d'autre part à ceux de Cissé [21], Houéto [22], Rama [23] signalés respectivement au Mali, au Sénégal, et en Afrique du sud. Ce n'était pas le cas au Brésil où 46.5% des pesticides enregistrés étaient de classe I [14].

De notre étude on retient que la valeur moyenne d'AChE dans notre étude est de 2,91 UI/g pour la pré-exposition et 2,93 UI/g pour la post-exposition sans différence significative entre les deux périodes ($p > 0,05$). Notre moyenne d'AChE est inférieure à celle trouvée en pré-exposition : $3,63 \pm 0,6$ U/ml par Abdou Mamadou et al au Niger en 2008 [24] et à celle trouvée par Loko et al au Bénin en 2007 : 24,05U/g Hb [25]. Notons que Loko et al ont obtenu ce taux avec des agriculteurs en dehors de la période de pulvérisation.

L'OMS recommande la surveillance des travailleurs exposés aux pesticides par un dosage périodique des cholinestérases. Chez un individu donné, le taux de cholinestérase au repos constitue la valeur de pré-exposition ou valeur de base [26].

Notre étude a le mérite d'une des rares études où les dosages pré-exposition et post-exposition ont été faits en vue d'avoir une valeur de base pour que l'individu soit son propre témoin lors de l'interprétation du dosage d'AChE. Une diminution de 30 à 50 % de l'activité cholinestérasique moyenne par rapport au niveau de base en l'absence de signes cliniques nécessite une surveillance du salarié.

Une diminution de 50 % et plus ou la présence de signes cliniques nécessite le retrait temporaire du poste de travail. Le retour à la normale des pseudo-cholinestérases se fait en 30 jours environ et celui des acétylcholinestérases se fait en 100 jours environ. Une réexposition

n'est autorisée que lorsque l'activité atteint au moins 80 % du niveau de base [26].

Toutefois nous avons noté que 51,2% de nos enquêtés ont une baisse de leur activité cholinestérasique après la pulvérisation par rapport à avant la pulvérisation. Parmi ces baisses 14,63% (soit 6 paysans) ont une baisse d'au moins plus de 50% et devraient selon les recommandations de l'OMS, nécessiter le retrait temporaire de l'activité de pulvérisation de pesticides OP.

Cette baisse est encore plus importante quand on considère les sujets ayant une positivité de leur AgHBs avec une différence statistique significative avec la moyenne d'AChE entre la post-exposition et la pré-exposition ($p < 0,05$). En effet l'exposition aux pesticides est un facteur de risque supplémentaire pour la survenue des carcinomes hépatocellulaires qui eux même sont amplifiés lorsqu'il y a une infection virale par le virus de l'hépatite B et ou C [10]. Cette étude a donc suggéré que les expositions aux pesticides organophosphorés et carbamate soient des facteurs de risque additifs aux actuelles infections au virus de l'hépatite C et de celui du B au sein des populations rurales [27].

CONCLUSION

L'utilisation des pesticides dans les champs de coton permet une amélioration du rendement. Ainsi le coton étant la première culture d'exportation de notre pays, l'utilisation des pesticides est devenue trop importantes ces dernières années. Malheureusement cette utilisation est source de problème de santé grave si on y prend garde. Une meilleure surveillance épidémiologique et biologique des utilisateurs de pesticide pourrait assurer une amélioration de l'état de santé de la population rurale, véritable acteur de la croissance du Produit Intérieur Brut (PIB) de tout pays en voie de développement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Merhi Maysaloun : Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin: Thèse de doctorat de l'université de Toulouse (2008) : 249 pages
<http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000732/01/merhi.pdf> consulté le 15/11/2014
- 2- Alavadja MC, Hoppin JA, Kamel F. Health effect of chronic pesticide exposure: Cancer and neurotoxicity. *Ann. Rev. Publ. Health* 2004, 25:155-197.
- 3- OMS/PNE. Multiplication des cas d'intoxications alimentaires au Bénin
<http://www.agrobenin.com/multiplication-des-cas-dintoxications-alimentaires-au-benin/> consulté le 17/11/2014
- 4- -PNUE –FAO –OMS. Convention de ROTTERDAM sur la procédure de consentement préalable en connaissance de cause applicable à certains produits chimiques et pesticides dangereux qui font l'objet d'un commerce international-Rotterdam, 2003,127p

- 5- PNUE-FAO-OMS. Les enfants sont exposés à des risques élevés d'intoxication par les pesticides Genève, 2004,141p
- 6- Badarou S; Coppieters Y. Intoxication alimentaire dues à l'endosulfan: mise en place d'un système de notification et de prise en charge au Bénin. *Environnement risques & santé*2009 ; 8(2) :133.-136.
- 7- Pazou Eya. Les résidus de pesticides chimiques de synthèse dans les eaux, les sédiments et les espèces aquatiques du bassin versant du fleuve Ouémé et du lac Nokoué. Thèse de doctorat unique en chimie. Abomey-Calavi: Université d'Abomey-Calavi, 2005, 217p.
- 8- Adam A., Marzuki A., Abdul R. H. and Abdul A. M. The oral and intratracheal toxicities of roundup and its components to rats. *Vet Hum Toxicol*1997; 39:147-151.
- 9- IFEN. Les pesticides dans les eaux: collecte et traitement des données. Paris: Etude et travaux1998; 19, 188p.
- 10- Ezzat S, Abdel-Hamid M, Eissa SA, Mokhtar N, Labib NA, El-Ghorory L, Mikhail NN, Abdel-Hamid A, Hifnawy T, Strickland GT, Loffredo CA. : Associations of pesticides, HCV, HBV, and hepatocellular carcinoma in Egypt. *Int J Hyg Environ Health*. 2005; 208(5):329-39.
- 11- Zhao B, Shen H, Liu F, Liu S, Niu J, Guo F, Sun X. Exposure to organochlorine pesticides is an independent risk factor of hepatocellular carcinoma: a case-control study. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2012 Nov; 22(6):541-8
- 12- Cordier S, Le TB, Verger P, Bard D, Le CD, Larouze B, Dazza MC, Hoang TQ, Abenheim L. : Viral infections and chemical exposures as risk factors for hepatocellular carcinoma in Vietnam. *Int J Cancer*. 1993 Sep 9;55(2):196-201.
- 13- Evans AA, Chen G, Ross EA, Shen FM, Lin WY, London WT. Eight-year follow-up of the 90,000-person Haimen City cohort: I. Hepatocellular carcinoma mortality, risk factors, and gender differences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Apr; 11(4):369–376.
- 14- PassianiJO,Torres P, Silva JR, Diniz BZ, Caldas ED. Knowledge, Attitudes and Practices and Biomonitoring of farmers and Residents Exposed to Pesticides in Brazil. *Int.J. Environ.res.Public Health* 2012,9:3051-3068
- 15- Faria NMX, Rosa JAR, Facchini LA. Poisoning by pesticides among family fruit farmers. Southern Brazil. *Rev. Saud publ* 2009,43:335-344
- 16- Recena MCP, Caldas ED, Pires DX, Pontes ERJC. Pesticides exposure in culturama, Brazil- Knowledge, attitude and practices (2006) *Environ Res* 102(2): 230-236.
- 17- Waichman AV, Ebeb E, Nina NCS. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in Brazilian Amazon. *Crop. Pot.* 2007,26:576-583.
- 18- Zhang X, Zhao W, Jing R, Wheeler K, Smith GA, Stallones L et al. Work-related pesticide poisoning among farmer in two villages of Southern China: A cross-sectional survey. *BMC Public Health* 2011, 11:429-436.
- 19- Lafia E. Facteurs de risques et taux d'acétylcholinestérase chez les utilisateurs de pesticides dans la commune de BANIKOARA (R.B). These Med. Cot, 1996 .n°661,93p
- 20- Affedjou B .S. Niveau cholinestérasique et état de santé des enfants exposés aux pesticides dans la commune d'APLAHOUE (R. B) .Thèse Med. Cot 1999
- 21- *INRA, Cemagref* Pesticides, agricultures, environnement : Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux: Rapport d'expertise 2005 : 68p
http://www.observatoire-pesticides.fr/upload/bibliotheque/704624261252893935317453066156/pesticides_synthese_inra_cemagref.pdf consulté le 16/11/2014
- 22- Van Der Werf H. Assessing the impact on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*1996; 60:81-96.
- 23- Janhong K, Lohachit C, Butraporn P, Pansuwan P. Health promotion program for the safe use of pesticides in Thai farmers. *S.E Asian J. Trop. Med* 2005,36(suppl4): 258-261.
- 24- Abdou Mamadou, Ali Doumma, Ahmed Mazih and Baba Moussa Coulibaly. Exposition aux organophosphorés en milieu rural nigérien : étude de l'activité enzymatique érythrocytaire des cholinestérases comme indicateur biologique. *Vertigo* - la revue électronique en sciences de l'environnement [Online], Volume 8 Numéro 3, décembre 2008 : 1-8
<https://vertigo.revues.org/5401> ou <http://id.erudit.org/iderudit/039592ar>; Consulté le 17/11/2014.
- 25- Loko F.; Amouzou E. K.; Yovo Kokou S.; Adjoko N.; Gandonou N ; Zohoun I. Détermination des activités acétyl cholinestérase et butyryl cholinestérase sanguines de base chez les travailleurs agricoles en milieu cotonnier au Bénin. *J. Sci.*Vol.7, N°1 (2007) 21-24
- 26- Organisation Mondiale de la Santé : Le dépistage précoce des maladies professionnelles ; Genève ,1989 .286p
- 27- Manal A Hamed, Sanaa A Al : Non-viral factors contributing to hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2013 June 27; 5(6): 311-322