

Analyse comparative des techniques de détection du glyphosate dans l'urine et dans l'eau

Christian Vélot^{1,2*}, Frédéric Poitou³ et Joël Spiroux de Vendômois²

1 Laboratory VEAC, University Paris-Saclay, Faculty of Sciences, Bât. 350, Avenue Jean Perrin, 91405 Orsay, France.

2 Committee for Independent Research and Information on Genetic Engineering (CRIIGEN), 42 rue de Lisbonne, 75008 Paris, France.

3 Legal Expertise Laboratory Signatures, BP 800-23, 13791 Aix-en-Provence CEDEX 3, France.

Résumé

Contexte : Le glyphosate est le composant actif déclaré des herbicides les plus largement utilisés dans le monde, et est donc largement présent dans l'environnement. Les taux urinaires de glyphosate représentent un biomarqueur pertinent pour chaque exposition individuelle aux herbicides à base de glyphosate. Cependant, la mesure du taux de glyphosate dans les urines est controversée car différentes méthodes de détection ont conduit à des résultats contradictoires, notamment dans le cas du dosage immuno-enzymatique (ELISA) versus chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS–MS) pour l'urine, et ELISA versus chromatographie liquide haute performance couplée à la détection de fluorescence (HPLC/Fluo) pour l'eau.

Méthodes : Nous avons comparé la méthode ELISA à la méthode LC/MS–MS ou HPLC/Fluo en soumettant à deux laboratoires (Biocheck, Allemagne et Labocéa, France, respectivement) des échantillons d'urine et d'eau identiques, dopés ou non avec des concentrations de glyphosate, mais aussi avec deux molécules chimiquement proches : la glycine et l'acide aminométhylphosphonique, respectivement l'analogue et le métabolite principal du glyphosate.

Résultats : Les deux laboratoires ont revendiqué un seuil de quantification du glyphosate (LOQ) similaire : 0,08 et 0,05 ng/mL, respectivement. Chacune des méthodes testées s'est avérée spécifique au glyphosate et n'a donc entraîné aucune détection croisée avec la glycine et l'acide aminométhylphosphonique. Cependant, ces méthodes ont montré des différences à la fois dans la reproductibilité et la fiabilité selon la matrice utilisée (eau ou urine).

Conclusion : Bien que la méthode ELISA ait donné des résultats moins précis que la technique HPLC/Fluo lorsqu'elle était appliquée à des échantillons d'eau, les concentrations de glyphosate mesurées dans l'urine étaient beaucoup plus fiables et reproductibles avec la technologie ELISA que celles obtenues avec la technologie LC/MS–MS.

Mots clés : ELISA, Glyphosate, LC/MS–MS, Limite de quantification (LOQ), Urine

Introduction

Les herbicides à base de glyphosate (GBH) sont des herbicides non sélectifs à large spectre et les pesticides les plus largement utilisés dans le monde [1]. Le Glyphosate (GLY), le N-(phosphonométhyl) glycine qui est - comme son nom l'indique - un analogue amino-phosphonique de l'acide aminé glycine naturel. Le principal produit de biodégradation du GLY est l'acide (aminométhyl) phosphonique (AMPA). Le GLY a été breveté comme ingrédient actif herbicide en 1971 (brevet américain No 3,799,758) par la société américaine Monsanto (acquise plus tard par la société allemande Bayer en 2018). Les premiers GBH ont été introduits sur le marché des pesticides en 1974 sous le nom commercial populaire Roundup®, et d'autres ont suivi : Glyphogan®, Touchdown®, Glifoglex®. Tous sont des mélanges de GLY avec d'autres produits chimiques utilisés pour faciliter la pénétration du GLY à travers l'épiderme des plantes et augmenter sa stabilité et son activité [2, 3]. Les GBH, qui représentent plus de 750 formulations [4], sont largement utilisées dans l'agriculture intensive, les jardins potagers, la foresterie, l'aménagement paysager et la gestion des zones humides. Leur utilisation a augmenté considérablement depuis 1996, notamment avec le développement des cultures tolérantes au Roundup® [1], dont la grande majorité

des plantes génétiquement modifiées (GM) cultivées commercialement dans le monde [5]. L'utilisation des GBH continue d'augmenter avec l'apparition de mauvaises herbes tolérantes induite par l'application généralisée de ces herbicides : la prolifération de ces mauvaises herbes nécessite des pulvérisations plus fréquentes et des concentrations plus élevées [1].

Une telle utilisation extensive des GBH soulève la question de l'exposition de la population, à la fois en milieu professionnel et via l'eau potable et la nourriture. Le GLY a été détecté dans la poussière des maisons non agricoles [6], et GLY et l'AMPA ont été trouvés tous deux dans les sols, l'eau, les plantes, les animaux et les aliments [7–9]. En particulier, il a été démontré que le GLY s'accumule dans le soja GM tolérant au Roundup [10]. Ceci est d'autant plus pertinent que la plupart des animaux élevés en milieu intensif sont nourris avec des tourteaux de soja fabriqués à partir de graines de soja GM [11, 12] principalement cultivées aux États-Unis, au Brésil et en Argentine [5]. De plus, le GLY et l'AMPA peuvent également être dispersés par l'érosion éolienne et hydrique [13].

Malgré une abondante littérature scientifique rapportant les effets néfastes du GLY et des GBH sur l'environnement et la santé (pour les revues : [14–16]), les effets néfastes des GBH continuent de susciter des débats controversés dans les sphères publiques, scientifiques et politiques [17-19]. Le débat en cours a conduit à un examen minutieux des procédures d'évaluation et des méthodologies d'analyse [20].

Les voies par lesquelles le GLY pénètre dans l'organisme sont cutanées, orales et inhalatoires [2, 21, 22]. Même si la peau ne permet qu'une faible absorption (environ 2%), c'est la principale voie d'entrée signalée pour les agriculteurs exposés [23]. Une fois dans l'organisme, le GLY s'accumule principalement dans les organes de détoxification (reins et foie), côlon, intestin grêle, ainsi que dans les os et la moelle osseuse, et est éliminé principalement via les fèces (90 %) mais aussi dans les urines [2]. La détection du GLY dans l'urine est donc un moyen facile d'évaluer l'exposition et la contamination des individus par des GBH [24, 25]. Cependant, le GLY dans les urines est également controversé puisque des résultats contradictoires ont été obtenus selon les méthodes de détection utilisées. Une vaste campagne a été lancée en France pour détecter le GLY dans les urines, et tous les tests effectués dans un laboratoire (Biocheck, Allemagne) utilisant la méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) se sont révélés positifs [26]. D'autres études commandées par d'autres individus et réalisées dans d'autres laboratoires (par exemple, Labocéa, France) utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS–MS) donnaient systématiquement des taux inférieurs voire des résultats négatifs.

Le but de cette étude est de réaliser une analyse comparative de ces deux techniques de détection de GLY dans l'urine en soumettant aux deux laboratoires des échantillons identiques, dopés ou non par des concentrations précises connues en GLY, glycine ou AMPA. La supplémentation en glycine ou AMPA était destinée à tester une éventuelle détection croisée de molécules chimiquement similaires. Des échantillons d'eau du robinet ont également été soumis aux deux laboratoires, afin de savoir si la précision des niveaux de glyphosate mesurés pouvaient dépendre de la matrice.

Matériels et méthodes

Recueil d'échantillons originaux

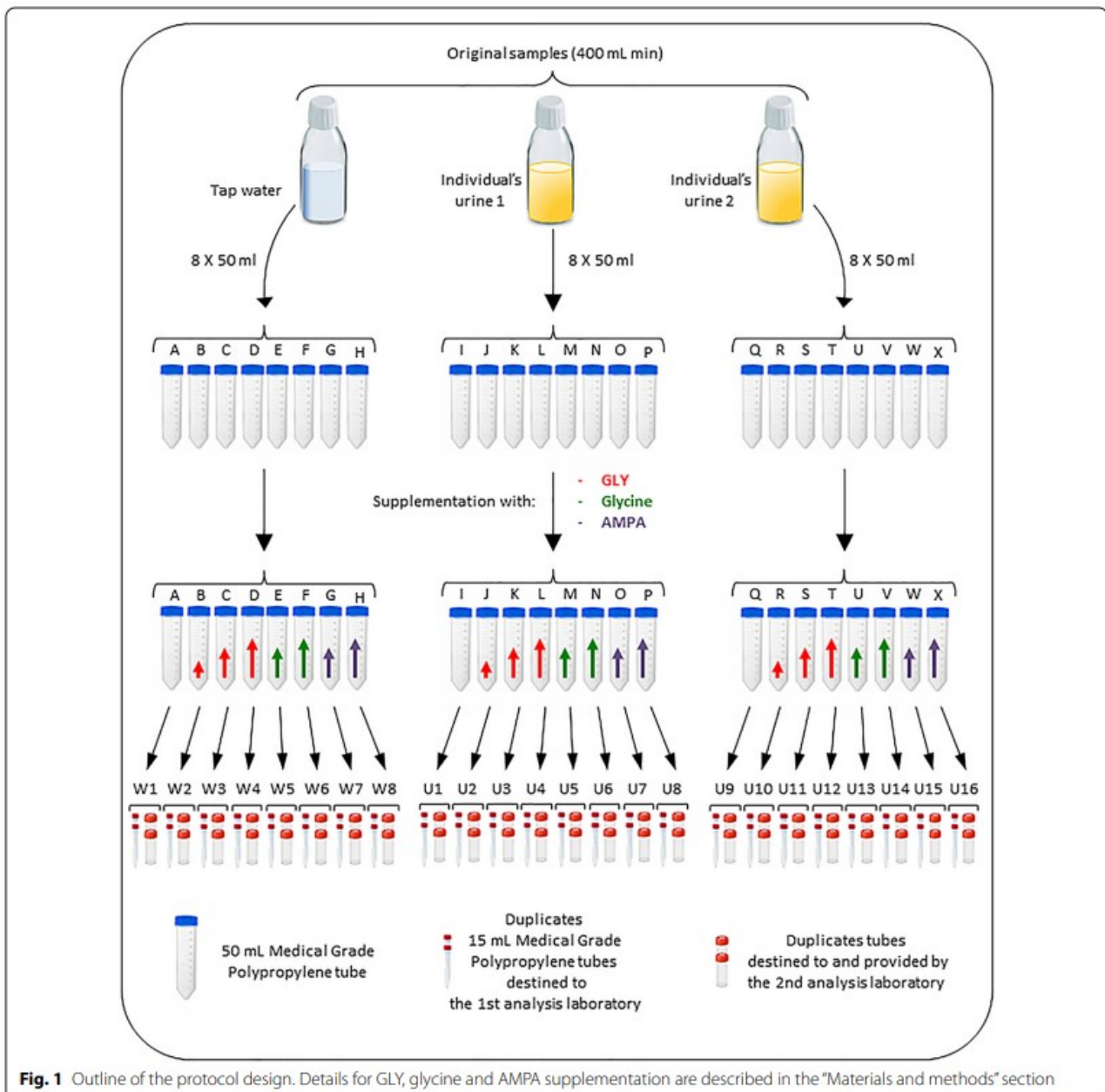
Un échantillon d'eau du robinet d'au moins 400 ml a été prélevé dans un flacon stérile de 500 ml. Deux échantillons des premières urines matinales (au moins 400 ml chacun) provenant de deux individus ont été recueillis dans des flacons stériles de 500 mL.

Produits chimiques

Le N-(phosphométhyl) glycine (GLY ; CAS : 1071–83-6, également connu sous le nom de «glyphosate technique», la Glycine (CAS : 56–40- 6) et l'acide (aminométhyl) phosphonique (AMPA ; CAS : 1066-51-9) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Pour chacun de ces trois produits chimiques, une solution mère à 1 mg/mL a été obtenue en dissolvant 10 mg dans 10 mL d'eau ultrapure (Millipore). Chaque solution mère a été ensuite diluée en série (deux dilutions successives à 10^{-2}) dans de l'eau ultra-pure pour obtenir des solutions finales à 0,1 µg/mL.

Conception du protocole

La conception du protocole est résumée dans la Fig. 1. Chacun des trois échantillons originaux (un d'eau et deux d'urine) a été distribué uniformément dans 8 tubes stériles en polypropylène de qualité médicale de 50 ml (8 × 50 ml). Pour chaque lot de 8 tubes, le premier (A, I, Q) a servi de témoin (pas de produits chimiques ajoutés). 50 µL (5 ng), 250 µL (25 ng) et 1000 µL (100 ng) de la solution finale de GLY ont été ajoutés respectivement aux seconds tubes (B, J, R), aux 3èmes (C, K, S) et aux 4èmes (D, L, T). 250 µL (25 ng) et 1000 µL (100 ng) de la solution finale de glycine ont été ajoutés respectivement aux 5èmes tubes (E, M, U) et 6èmes (F, N, V). 250 µL (25 ng) et 1000 µL (100 ng) de la solution finale d'AMPA ont été ajoutés respectivement aux 7èmes tubes (G, O, W) et 8èmes (H, P, X). Pour chaque série, 40 mL de chacun des huit tubes ont ensuite été uniformément répartis dans quatre tubes (4 × 10 mL) : deux tubes (identiques) destinés au premier laboratoire d'analyses (Biocheck, Allemagne), et deux autres (identiques) destinés au second laboratoire d'analyses (Labocéa, France). Tous les tubes envoyés au même laboratoire (16 par série, c'est-à-dire par échantillon original) ont été numérotés au hasard de sorte que le laboratoire ne puisse ni les identifier ni détecter les doublons. Les tubes finaux ont été emballés dans de la neige carbonique et expédiés par un transporteur spécialisé dans le transport d'échantillons biologiques. Chaque emballage contenait une sonde de température à lecture unique.



Supervision et suivi des expériences

Cette analyse comparative étant susceptible d'être citée dans le cadre d'une procédure judiciaire, le processus expérimental complet (depuis la réception des étalons chimiques, et la collecte des échantillons originaux, jusqu'à l'expédition) a été supervisée par un expert chimiste judiciaire auprès des juridictions françaises et européennes, et a été suivi et photographié par un officier de justice. De plus, l'ensemble de l'expérience a été filmé en une seule prise horodatée. A réception des colis, chacun des deux laboratoires a renvoyé la sonde de température précitée à l'huissier de justice qui en a pris connaissance afin de s'assurer qu'il n'y avait pas eu de rupture de la chaîne du froid pendant le transport.

Résultats et discussion

Alors que le laboratoire Biocheck utilise la technologie ELISA pour la détection du glyphosate dans l'eau et dans les urines, le laboratoire Labocéa utilise deux technologies différentes selon la matrice : chromatographie liquide haute performance couplée à la détection de fluorescence (HPLC/Fluo) pour les échantillons d'eau et LC/MS–MS pour les échantillons d'urine.

Les résultats obtenus pour les échantillons d'eau sont présentés dans le tableau 1. La limite de quantification (LOQ) est de 0,08 et 0,05–0,1 ng/mL pour Biocheck et Labocéa, respectivement. La reproductibilité (c'est-à-dire les résultats obtenus pour chaque paire d'échantillons identiques) est très bonne pour les deux laboratoires. Les deux méthodes utilisées (ELISA et HPLC/Fluo) donnent des résultats inférieurs aux valeurs attendues ; la méthode HPLC/Fluo (Labocéa) produit des résultats plus précis. Les résultats obtenus avec les échantillons W5 à W8 (supplémentés en glycine ou AMPA), comparés à ceux obtenus avec l'échantillon témoin (W1), indiquent que les deux méthodes de détection se sont avérées parfaitement spécifiques au GLY, du fait que les valeurs détectées n'ont pas augmenté lorsque les molécules chimiquement similaires (glycine et AMPA) ont été ajoutées aux échantillons.

Les résultats obtenus pour les échantillons d'urine sont compilés dans les tableaux 2 et 3. Pour Biocheck, la LOQ est la même que pour la matrice eau, à savoir 0,08 ng/mL. Quant à Labocéa, alors que la LOQ initialement déclarée était de 0,05 ng/mL, elle s'est avérée être 10 fois supérieure (0,5 ng/mL). La justification donnée par le laboratoire était la nécessité pour eux de diluer 10 fois tous les échantillons d'urine en raison d'un « *fort effet de matrice* » (c'est-à-dire que « *l'urine était riche de divers composés perturbant l'analyse en empêchant la détection des standards internes labellisés* »). Bien qu'il soit tout à fait compréhensible de devoir diluer des échantillons afin de se situer dans une fenêtre de détection compatible avec la méthode (et dans ce cas précis, pour mieux détecter les pics chromatographiques), il est cependant difficile de comprendre pourquoi cela impacte le seuil de quantification, qui dépend de la méthode et du composé cible [27, 28], mais pas de l'échantillon. Ce devrait être la même chose, que l'urine soit diluée ou non. Pourquoi ne pas simplement multiplier ensuite par 10 la concentration mesurée dans l'échantillon dilué 10 fois pour connaître la concentration dans l'échantillon d'origine ? Labocéa a néanmoins obtenu certaines fois des valeurs inférieures à la LOQ de 0,5 ng/mL (échantillons U2, U3, U11, et un des échantillons U8, U10, U16) « *lorsqu'un pic chromatographique s'est détaché de façon significative du bruit de fond* », mais « *sans la précision de cette estimation répondant aux exigences du COFRAC* » (comité français d'accréditation).

Outre ce problème de LOQ, rendant difficile l'interprétation de certaines valeurs de Labocéa, il semble que la méthode de Biocheck (ELISA) donne une meilleure reproductibilité globale, à l'exception d'un seul couple d'échantillons identiques (U4). En revanche, plusieurs échantillons en double donnent des valeurs relativement éloignées dans le cas de Labocéa (U4, U7, U10, U12). De plus, les valeurs mesurées par Biocheck sont beaucoup plus proches des concentrations attendues que celles de Labocéa, même lorsque les valeurs mesurées sont supérieure à 0,5 ng/mL (LOQ de Labocéa) – et répondent donc aux exigences du COFRAC – (échantillons U4 et U12). Enfin, comme dans le cas des échantillons d'eau, il est clair d'après nos résultats qu'aucune des deux méthodes (ELISA et LC/MS–MS) ne montre la moindre réaction croisée ou détection croisée avec la glycine ou l'AMPA. Cependant, Labocéa a également mesuré la concentration d'AMPA dans tous

les échantillons. De manière surprenante, la concentration d'AMPA a été surestimée dans les échantillons supplémentés en GLY (comparée aux échantillons de contrôle), indiquant que bien que la méthode LC/MS–MS ait permis une détection spécifique de GLY, cette dernière a tout de même interférée avec la détection de l'AMPA (données non présentées).

Table 1 Measured and expected GLY concentrations ([GLY]) in tap water samples

Sample	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8
Supplementation (ng/mL)	/	GLY 0.1	GLY 0.5	GLY 2.0	Glycine 0.5	Glycine 2.0	AMPA 0.5	AMPA 2.0
Expected [GLY] ^a	x	x + 0.1	x + 0.5	x + 2.0	x	x	x	x
Measured [GLY] ^a by ELISA ^c	<0.08 0.08	<0.08 <0.08	0.12 0.11	0.53 0.46	<0.08 <0.08	<0.08 <0.08	0.08 <0.08	<0.08 <0.08
Expected value ^a		≤0.18 >0.10	≤0.58 >0.50	≤2.08 >2.00	≤0.08	≤0.08	≤0.08	≤0.08
Measured [GLY] ^a by HPLC/Fluo ^d	<0.05 <0.05	0.06 0.07	0.36 0.38	1.41 1.51	<0.05 <0.05	<0.05 <0.05	<0.05 <0.05	0.08 <0.05
Expected value ^a		<0.15 ≥0.10	<0.55 ≥0.50	<2.05 ≥2.00	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

^a All measured and expected GLY concentration values are expressed in ng/mL

^b Braces indicate duplicates of the same sample

^c Biocheck

^d Labocéa

Table 2 Measured and expected GLY concentrations ([GLY]) in samples of individual's urine 1

Sample	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8
Supplementation (ng/mL)	/	GLY 0.1	GLY 0.5	GLY 2.0	Glycine 0.5	Glycine 2.0	AMPA 0.5	AMPA 2.0
Expected [GLY] ^a	y	y + 0.1	y + 0.5	y + 2.0	y	y	y	y
Measured [GLY] ^a by ELISA ^c	1.11 1.12	1.19 1.14	1.04 1.42	3.46 1.88	0.91 0.96	1.14 1.21	1.14 1.11	0.98 1.13
Expected value ^a		1.21 1.21	1.51 1.51	3.11 3.11	1.11 1.11	1.11 1.11	1.11 1.11	1.11 1.11
Measured [GLY] ^a by LC/MS-MS ^d	<0.50 <0.50	0.10 0.10	0.36 0.42	1.81 1.20	<0.50 <0.50	<0.50 <0.50	<0.50 N/A	0.10 <0.50
Expected value ^a		≥0.10	≥0.50	≥2.00	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50

^a All measured and expected GLY concentration values are expressed in ng/mL

^b Braces indicate duplicates of the same sample

^c Biocheck

^d Labocéa

La méthode ELISA pour la détection de GLY a été développée sur des échantillons d'eau [29]. Les concentrations de GLY déterminées par ELISA dans des échantillons d'eau sont parfaitement corrélées (coefficient de corrélation égal à 0,99) avec celles déterminées par HPLC [29]. Une telle performance similaire entre les deux techniques pour les échantillons d'eau a été ensuite confirmée par une autre analyse comparative [30]. Cette légère différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par les différentes plages de concentration de GLY entre leurs échantillons et les nôtres. En effet, les principales différences que nous obtenons entre les deux techniques pour les prélèvements d'eau concernent ceux qui ont été dopés en GLY. Par conséquent, la technique ELISA s'avérerait moins efficace que la HPLC/Fluo pour la détection du GLY dans l'eau uniquement pour les échantillons les plus concentrés. Une autre différence avec le travail original de Clegg et al. [29] concerne la spécificité de la méthode ELISA vis-à-vis du GLY : contrairement à nous, ils ont observé que les antisérums polyclonaux GLY faisaient des réactions croisées avec l'AMPA. Ceci indique que les kits ELISA kits utilisés par Biocheck [31] sont plus spécifiques que les originaux.

L'urine est une matrice beaucoup plus complexe que l'eau. En particulier, l'urine peut contenir un grand nombre de métabolites tels que les acides aminés dont la glycine [32]. Par conséquent, la transposition de la méthode ELISA pour la détection du GLY dans l'urine aurait pu être limitée par de possibles réactions croisées avec des molécules structurellement semblables au GLY, et surtout à la glycine. Une telle réaction croisée conduirait à une surestimation générale des niveaux de GLY dans l'urine, et même à de faux positifs. Nos données montrent clairement que ce n'est pas le cas.

Table 3 Measured and expected GLY concentrations ([GLY]) in samples of individual's urine 2

Sample	U9		U10		U11		U12		U13		U14		U15		U16	
Supplementation (ng/mL)	/		GLY 0.1		GLY 0.5		GLY 2.0		Glycine 0.5		Glycine 2.0		AMPA 0.5		AMPA 2.0	
Expected [GLY] ^a	z		z + 0.1		z + 0.5		z + 2.0		z		z		z		z	
Measured [GLY] ^a by ELISA ^c	0.89	0.93	0.65	0.77	1.08	1.02	2.95	2.93	0.89	0.85	1.02	0.90	1.01	1.29	0.91	0.83
Expected value ^a	1.00		1.00		1.40		2.90		0.90		0.90		0.90		0.90	
Measured [GLY] ^a by LC/MS-MS ^d	<0.50	<0.50	0.92	0.10	0.43	0.34	1.00	1.90	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	0.10	<0.50
Expected value ^a	≥0.10		≥0.10		≥0.50		≥2.00		<0.05		<0.50		<0.50		<0.50	

^a All measured and expected GLY concentration values are expressed in ng/mL

^b Braces indicate duplicates of the same sample

^c Biocheck

^d Labocéa

Conclusion

Pour la détermination des niveaux de GLY dans l'eau, la technique HPLC/Fluo utilisée par Labocéa a donné des résultats plus précis que la technique ELISA utilisée par Biocheck. A l'inverse, pour la détermination des niveaux de GLY dans l'urine, la technologie ELISA de Biocheck a donné beaucoup plus des résultats fiables et reproductibles que la méthode LC/MS-MS utilisée par Labocéa.

Aucune des trois techniques utilisées pour la détection de GLY, que ce soit dans l'eau ou dans l'urine, n'a montré de réaction croisée ou de détection croisée avec les molécules chimiquement similaires que sont la glycine et l'AMPA.

La méthode LC/MS-MS de Labocéa nécessite une dilution des premières urine matinales dues à un "fort effet de matrice", impliquant - selon Labocéa - une augmentation de leur seuil de

quantification (LOQ) qu'il a fallu multiplier par le facteur de dilution des échantillons. Par conséquent, lorsque les taux de GLY urinaires sont donnés par Labocéa avec une LOQ de 0,05 ng/mL (la LOQ indiquée à l'origine), cela implique que les échantillons d'urine analysés n'ont pas nécessité de dilution, et donc que ces urines ne sont probablement pas les premières urines du matin, selon les recommandations du laboratoire, mais des urines plus tardives et plus claires qui, bien sûr, ne sont pas représentatives des niveaux réels de GLY auxquels le corps a été exposé.

References

1. Benbrook CM (2016) Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* 28:3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
2. Williams GM, Kroes R, Munro IC (2000) Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 31:117–165. <https://doi.org/10.1006/rtp.1999.1371>
3. Cox C (2004) Herbicide factsheet—glyphosate. *J Pesticide Reform* 24:10–15
4. Connolly A, Coggins MA, Koch HM (2020) Human biomonitoring of glyphosate exposures: state-of-the-art and future research challenges. *Toxics* 8:60. <https://doi.org/10.3390/toxics8030060>
5. ISAAA (2018) Brief 54: Global status of commercialized biotech/GM crop in 2018. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/>
6. Curwin BD, Hein MJ, Sanderson WT, Nishioka MG, Reynolds SJ, Ward EM, Alavanja MC (2005) Pesticide contamination inside farm and nonfarm homes. *J Occup Environ Hyg* 2:357–367. <https://doi.org/10.1080/15459620591001606>
7. Alferness PL, Iwata Y (1994) Determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection. *J Agric Food Chem* 42:2751–2759
8. Caloni F, Cortinovis C, Rivolta M, Davanzo F (2016) Suspected poisoning of domestic animals by pesticides. *Sci Total Environ* 539:331–336. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.005>
9. El-Gendy K, Mosallam E, Ahmed N, Aly N (2018) Determination of glyphosate residues in Egyptian soil samples. *Anal Biochem* 557:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.07.004>
10. Bøhn T, Cuhra M, Traavik T, Sanden M, Fagan J, Primicerio R (2014) Compositional differences in soybeans on the market: glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food Chem* 153:207–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.054>
11. Van Eenennaam AL, Young AE (2014) Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations. *J Anim Sci* 92:4255–4278. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8124>
12. Weiss WP, Simons CT, Ekmay RD (2015) Effects of feeding diets based on transgenic soybean meal and soybean hulls to dairy cows on production measures and sensory quality of milk. *J Dairy Sci* 98:8986–8993. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9955>
13. Silva V, Montanarella L, Jones A, Fernández-Ugalde O, Mol HGJ, Ritsema CJ, Geissen V (2018) Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Sci Total Environ* 621:1352–1359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093>
14. de Araujo JSA, Delgado IF, Paumgarten FJR (2016) Glyphosate and adverse pregnancy outcomes, a systematic review of observational studies. *BMC Public Health* 16:472. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3153-3>
15. Davoren MJ, Schiestl RH (2018) Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research. *Carcinogenesis* 39:1207–1215. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy105>
16. Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, Morris JG Jr (2018) Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ* 616–617:255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>

17. Valavanidis A (2018) Glyphosate, the Most Widely Used Herbicide. Health and safety issues. Why scientists differ in their evaluation of its adverse health effects. <https://www.researchgate.net/publication/323727351>
18. Benbrook CM (2019) How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides? *Environ Sci Eur* 31:2. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0184-7>
19. Tosun J, Lelieveldt H, Wing TS (2019) A case of ‘muddling through’? The politics of renewing glyphosate authorization in the European Union. *Sustainability* 11:440. <https://doi.org/10.3390/su11020440>
20. Spiroux de Vendômois J, Bourdineaud J-P, Apoteker A, Defarge N, Gaillard M, Lepage C, Testart J, Vélot C (2021) Trans-disciplinary diagnosis for an in-depth reform of regulatory expertise in the field of environmental toxicology and security. *Toxicol Res* 37(4):405–419. <https://doi.org/10.1007/s43188-020-00075-w>
21. Martinez TT, Long WC, Hiller R (1990) Comparison of the toxicology of the herbicide roundup by oral and pulmonary routes of exposure. *Proc West Pharmacol Soc* 33:193–197
22. Peillex C, Pelletier M (2020) The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *J Immunotoxicol* 17:163–174. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492>
23. Connolly A, Coggins MA, Galea KS, Jones K, Kenny L, McGowan P, Basinas I (2019) Evaluating glyphosate exposure routes and their contribution to total body burden: a study among amenity horticulturalists. *Ann Work Expo Health* 63:133–147. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxy104>
24. Gillezeau C, van Gerwen M, Shafer RM, Rana I, Zhang L, Sheppard L, Taioli E (2019) The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environ Health* 18:2. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0435-5>
25. Zoller O, Rhyn P, Zarn JA, Dudler V (2020) Urine glyphosate level as a quantitative biomarker of oral exposure. *Int J Hyg Environ Health* 228:113526. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113526>
26. Grau D, Grau N, Gascuel Q, Paroissin C, Stratonovich C, Lairon D, Devault DA, Di Cristofaro J (2022) Quantifiable urine glyphosate levels detected in 99% of the French population, with higher values in men, in younger people, and in farmers. *Environ Sci Pollut Res Int* 29:32882–32893
27. Kim J, Park H, Kang HS, Cho BH, Oh JH (2020) Comparison of sample preparation and determination of 60 veterinary drug residues in fatfish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecules* 25:1206. <https://doi.org/10.3390/molecules25051206>
28. Millet A, Khoudour N, Bros P, Lebert D, Picard G, Machon C, Goldwasser F, Blanchet B, Guillon J (2021) Quantification of nivolumab in human plasma by LC-MS/HRMS and LC-MS/MS, comparison with ELISA. *Talanta* 224:121889. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121889>
29. Clegg BS, Stephenson GR, Hall JC (1999) Development of an enzymelinked immunosorbent assay for the detection of glyphosate. *J Agric Food Chem* 47:5031–5037
30. Rubio F, Veldhuis LJ, Clegg BS, Fleeker JR, Hall JC (2003) Comparison of a direct ELISA and an HPLC Method for glyphosate determinations in water. *J Agric Food Chem* 51:691–696
31. Krüger M, Scheldorn P, Schrödl W, Hoppe HW, Lutz W, Shehata AA (2014) Detection of glyphosate residues in animals and humans. *J Environ Anal Toxicol.* 4:2. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000210>
32. Öztürk Er E, Özbek B, Bakirdere S (2021) Determination of seventeen free amino acids in human urine and plasma samples using quadruple isotope dilution mass spectrometry combined with hydrophilic interaction liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1641:461970. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461970>