

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

Caractérisation thérapeutique d'extraits de racines de *Cannabis sativa* L.

MÉMOIRE PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA

Maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire

PAR

Valérie Gagné

Mars 2024

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

*“Chaque fois que la science avance d'un pas, c'est qu'un
imbécile la pousse, sans le faire exprès.”*

Emile Zola, *La joie de vivre*

REMERCIEMENTS

C'est en écrivant ces quelques phrases que je me rends compte que cette belle aventure tire déjà à sa fin. Mon parcours n'aurait pas été le même sans toutes les personnes qui m'ont entouré lors de ces années. Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée et supportée, particulièrement ma directrice, Isabel Desgagné-Penix, qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a soutenue, encouragée tout au long de mon parcours à l'Université. Ma co-directrice, Nathalie Boucher, pour m'avoir permis d'entreprendre ce merveilleux projet, m'avoir soutenue et apporté ses connaissances sur l'utilisation des plantes médicinales, et à Vickie Beaupré, technicienne au département de chimie, biochimie et physique, pour son soutien technique.

Je remercie également tous les membres du laboratoire pour leur soutien technique et moral, et Natacha Merindol qui m'a guidée tel le jeune Padawan que j'étais, avec une patience infinie pour me guider à travers ces connaissances et apprentissages. Mes remerciements vont également aux personnes que j'ai côtoyées tout au long de ma maîtrise, particulièrement Sabrina Grenier, ma partenaire de laboratoire et d'étude, qui ne m'a jamais laissée tomber.

Finalement, je tiens à remercier ma famille, rapprochée et élargie, particulièrement mon conjoint Sébastien Boivin et mes enfants, pour leur patience et leur soutien tout au long de ce parcours qui n'aura pas été de tout repos.

RÉSUMÉ

La culture du cannabis est en plein essor depuis la légalisation de la consommation récréative en 2018 au Canada, entraînant une augmentation des déchets associés. Les racines font partie de ces déchets, bien qu'elles présentent une possible utilité thérapeutique. En effet, elles étaient mentionnées comme un traitement pour les troubles inflammatoires et infectieux dans l'Ayurveda.

Dans cette étude, afin d'explorer les possibilités thérapeutiques offertes par les racines de cannabis, elles ont été extraites à l'eau, à l'alcool, et selon un protocole acide-base. Plusieurs propriétés thérapeutiques ont été mesurées. L'effet antioxydant a été évalué par la neutralisation de radicaux libres, la chélation de métaux et la lipoperoxydation sur des micelles d'acide linoléique en utilisant un spectrophotomètre. La protection des membranes mitochondriales a été évaluée dans les cellules leucémiques monocytaires THP-1 à l'aide de la sonde MitoPerOx par cytométrie en flux. L'effet anti-inflammatoire a été démontré en mesurant les niveaux d'IL-6 en réponse à la stimulation par le LPS des cellules THP-1. Enfin, l'effet anticholinestérase, une enzyme ciblée dans les traitements de la maladie d'Alzheimer, a été testé à l'aide de tests d'inhibition enzymatique.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence un effet antioxydant prononcé, la détection d'une activité anticholinestérase, des activités anti et pro-inflammatoires, ainsi que des effets bactéricides contre certains microorganismes.

Mots-clés : Revalorisation, THP-1, antioxydant, polyphénols, anti-inflammatoire, chanvre

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé.....	4
Liste des abréviations, sigles et acronymes.....	9
Chapitre I.....	13
Introduction.....	13
1.1 Mise en contexte.....	13
1.2 Biologie des racines de cannabis.....	14
1.2.1 Développement racinaire.....	14
1.2.2 Composition.....	16
1.2.3 Taxonomie.....	16
1.3 Usages thérapeutiques anciens.....	17
1.4 Usage moderne.....	19
1.5 Composition d'extrait de racines de Cannabis.....	20
1.6 Racine de cannabis et biotechnologies.....	25
1.7 Cannabis et environnement.....	25
1.8 Rhizome/microbiome.....	26
1.9 Originalité et contribution à la science.....	28
Chapitre II.....	29
2.1 Contribution des auteurs.....	29
2.2 Résumé de l'article.....	29
2.3 Article scientifique.....	30
2.3.1 Summary.....	30
2.3.2 Introduction.....	31
2.3.3 Method.....	32
2.3.4 Results.....	35
2.3.5 Discussion.....	43
2.3.6 Acknowledgments.....	45
2.3.7 Supplementary materials.....	46
2.3.8 Contributions.....	49

2.3.9 Références	50
Chapitre III	53
3.1 Discussion	53
3.1.1 Perspectives antioxydantes	54
3.1.2 Perspectives antimicrobiennes	55
3.1.3 Perspectives antiinflammatoires	56
3.1.4 Perspective sur l'activité biologique	56
3.2 Conclusion	57
3.3 Références bibliographiques	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1	Utilisations des racines de cannabis répertoriées en ordre chronologique	18
2	Composés identifiés dans les racines avec les propriétés bioactives et leurs utilisations	22-24
3	Primer sequences used in the qRT-PCR	35
4	Results of the antimicrobial activity of Cannabis root extracts	40

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1	Racine de cannabis cultivé en terre	15
2	Polyphenolic composition and antioxidant capacity of Cannabis root extracts	36
3	Monitoring of the formation of conjugated diene systems induced by AAPH and inhibit by Cannabis root extracts over time	37
4	Inhibition of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by Cannabis root extracts	39
5	Anti-inflammatory activities of <i>Cannabis</i> root extracts Relative expression of <i>Nrf2</i> targets	41
6	Representation of the effects of <i>Cannabis</i> root extracts on anti-inflammatory and antioxidant responses	42
7	Representation of the effects of Cannabis root extracts on biological activity and antimicrobial capacity	43
S1	Identification of extracts and yield percentages of different extraction types	46
S2	Standard curve of the different molecules used to calculate equivalents for antioxidant tests	46
S3	Viability of THP-1 cells under different experimental conditions assessed using MTT method	47
S4	Relative expression of <i>Nrf2</i> target genes in differentiated THP-1 cells	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
AB	Acide-Base
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide desoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BuChE	Butyrylcholinestérase
BCE	Before Christian Era
CAQ	Amonium quaternaire
CBD	Cannabidiol
CH	Culture hydroponique
CO ₂	Dioxyde de carbone
COX-2	Cyclooxygénase 2
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced palindromic repeats/associated (Cas) proteins
CT	Culture en terre
Ctrl	Contrôle
DPPH	2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
EFR	Epifriedelanol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Foetal bovine serum
Fe ²⁺	Ions ferreux
Fe ³⁺	Ions ferriques
FR	Friedelin
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
FT	Feruloytyramine
GC/MS	Gas chromatography/Mass spectrometry
GC-FID	Gas chromatography/flame ionization detector
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chloridrique
HO1	Hème oxygénase 1
Iκβα	Inhibitor of nuclear factor kappa B
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
INT	p-iodonitrophenyltetrazolium
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IRAK-1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LOD	Limit of detection
LPS	Lipopolysaccharides
MII	Maladies inflammatoires de l'intestin
miR-146a	MicroRNA 146a
mRNA	Mitochondrial RNA
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium

NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ b	Nuclear factor-kappa B
NH ₄ NO ₃	Nitrate d'ammonium
N ₂ O	Protoxyde d'azote
NQO1	NADPH Quinone Oxidoreductase
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PBS	Tampon phosphate salin
<i>p</i> -CT	<i>p</i> -coumaroyltyramine
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth
PGE ₂	Prostaglandine E2
PGH ₂	Prostaglandine H2
PMA	12-phorbol-meristate
q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
qRT-PCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ST	β -sitosterol
Subsp	Subspecies
THC	Δ 9-tetrahydrocannabinol
THP-1	Human leukemia monocytic cell line
TPC	Total phenolic compound
TPTZ	2,4,6-Tripyridyl-S-triazine
Trolox	Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Trypticase soy broth

LISTE DES SYMBOLES

β	Bêta
μ	Micro
%	Pourcentage
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
Δ	Delta
g	Gramme
Kg	Kilogramme
L	Litre
M	Molaire
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
N	Normal
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
pH	Potentiel hydrogène
Ppm	Partie par million

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

La nature offre à l'homme de nombreux bienfaits tels que la nourriture, les matériaux, les abris et les médicaments [1-3]. L'exploration des sources potentielles de traitements revêt une importance particulière avec le vieillissement de la population, étant donné que certaines phytomolécules sous-tendent plusieurs options de traitements modernes et contribuent à des modes de vie sains [4]. Au fil du temps, certaines communautés autochtones ont accumulé des connaissances sur l'utilisation thérapeutique des plantes, transmises de génération en génération. Les guérisseurs autochtones étaient bien conscients du pouvoir des plantes, les utilisant pour traiter divers maux. Un exemple notoire est l'administration d'une décoction d'aiguilles et d'écorce de *Thuja occidentalis* aux explorateurs européens pour traiter le scorbut [5]. Bien que ce traitement puisse autrefois sembler étrange et non fondé, il s'est avéré efficace. Nous savons aujourd'hui que les symptômes du scorbut étaient causés par une carence en vitamine C, et que ces arbres sont riches en cette vitamine [6]. Cependant, certains métabolites, comme les alcaloïdes, peuvent être toxiques à des concentrations élevées. Un exemple bien connu est l'intoxication par la digitaline pourprée (*Digitalis purpurea*), qui peut causer des troubles cardiaques. Malgré leur toxicité, ces métabolites peuvent fournir un traitement précieux avec un dosage contrôlé [7]. *Cannabis sativa L.*, connu pour ses utilisations récréatives et médicinales, contient des molécules aux propriétés thérapeutiques reconnues. Cependant, en raison de la publicité négative et des réglementations strictes, les connaissances sur la manière de les exploiter, y compris le dosage, l'effet d'entourage et les applications thérapeutiques appropriées, restent largement méconnues. Lors de la culture de cannabis, que ce soit à des fins récréatives ou médicales, seulement les fleurs sont récoltées, laissant les racines sous-utilisées. Cependant, plusieurs autres plantes tirent des bienfaits thérapeutiques de leurs racines, comme le mucilage extraits des plantes, utilisé comme laxatif doux en augmentant la viscosité des selles [8]. Par exemple, la racine de guimauve (*Althea officinalis*) est infusée pour ses effets laxatifs. Les racines de pissenlit, en tisane, sont reconnues pour leurs effets probiotiques grâce à l'inuline, ainsi que pour leur capacité à réguler le tractus intestinal [9]. Le gingembre, bien connu pour ses multiples propriétés, telles que antiémétiques [10], antioxydantes [11], anti-inflammatoire [12], antimicrobiennes [13] et anticancer [14], et sa capacité à prévenir certaines maladies neurodégénératives [15], cardiovasculaires [16], l'obésité [17] et le diabète de type 2 [18] est un autre exemple d'organes végétaux aux propriétés bénéfiques, tout comme le curcuma, qui appartient à la même famille et offre des propriétés tout aussi intéressantes.

Il est à noter que les racines de cannabis pourraient également être une source potentielle de métabolites à valeur ajoutée, bien que peu explorées dans la recherche scientifique, en raison de la législation complexe qui les entoure. La culture de la partie aérienne des plantes de *Cannabis sativa* n'était pas autorisée au Canada entre 1923 et 2001 [19]. Suite à la légalisation de la consommation de cannabis à des fins médicales en 2001 et à des fins récréatives en 2018 [19], la culture du cannabis a repris là où elle s'était arrêtée. Le but premier de la culture de ces plants est pour l'utilisation des parties aériennes : les fleurs pour l'usage médical et récréatif, les tiges pour l'industrie textile et les graines pour l'alimentation. Par conséquent, les

racines, souvent jetées à la poubelle, deviennent un sous-produit de l'agriculture, une pratique que nous cherchons à réduire grâce à l'économie circulaire, souvent par la production de biocarburant. Il serait donc intéressant d'explorer une utilisation effective et confirmée des racines de cannabis afin de minimiser tout gaspillage.

Il devient donc intéressant d'évaluer les possibilités offertes par cet organe de la plante de cannabis qui n'est pas utilisé après la récolte. Les tiges sont déjà exploitées pour leur fibre, les graines pour leurs huiles et protéines, les fleurs pour leurs métabolites bioactifs tels que les cannabinoïdes, mais qu'en est-il des racines? Des informations sur les utilisations thérapeutiques des racines remontent à la pharmacopée chinoise et ont malheureusement été perdues avec le temps, mais se concentrent surtout sur des effets potentiellement anti-inflammatoires. Il serait pertinent de mettre à jour les connaissances à ce sujet pour explorer les hypothèses qui peuvent en être tirées.

Voici un aperçu des connaissances disponibles sur les racines de cannabis, leurs utilisations en agriculture, en médecine, moderne et ancienne, ainsi qu'en biotechnologies et l'impact de leur culture sur l'environnement. Dans cet ouvrage, tant les racines de marijuana que celles du chanvre sont traités, puisque seule la concentration en $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol (THC) dans les fleurs diffère (moins de 0,3% de THC est nommé chanvre). Étant de la même espèce, nous considérerons que les racines seront similaires dans leurs utilisations et leur contenu en métabolites spécialisés.

1.2 Biologie des racines de cannabis

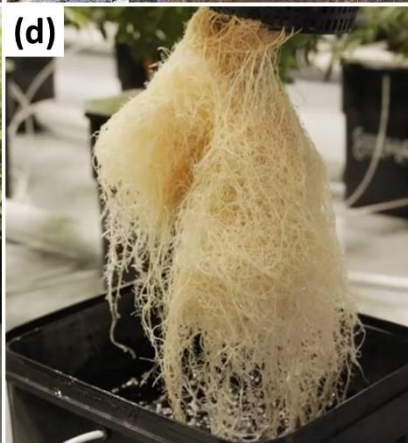
C. sativa fait partie de la famille des Cannabacées [20]. C'est une plante herbacée annuelle, dont l'origine de la culture proviendrait de l'Asie centrale [21]. Outre sa fibre, qui aurait été à l'origine de sa domestication, cette plante a été utilisée comme source de nourriture, d'huile, ainsi que pour ses propriétés tant médicinales que récréatives, et même lors de rituels religieux [22].

1.2.1 Développement racinaire

Le développement du système racinaire est orchestré par les activités du méristème (cellules souches), donnant naissance à divers types cellulaires distincts. Dès les premières étapes de l'embryogenèse, le méristème apical de la racine est établi et situé à l'apex de la racine après la germination [23]. En fonction de la dominance de la racine primaire formée, deux principaux types de motifs racinaires sont possibles : racine pivotante et racine fibreuse [24]. De nombreuses plantes matures ont une combinaison de racine pivotante et de système racinaire fibreux, comme c'est le cas pour *C. sativa*, où les racines adventives sont plus rares et se développeront dans certaines conditions. En effet, chez *C. sativa*, on observe des systèmes de racines pivotantes avec une ou plusieurs racines primaires à partir desquelles se développent des racines secondaires [25, 26]. Une jeune racine peut être divisée en quatre régions : la coiffe, la région de division cellulaire, la région d'élongation et la région de maturation. On peut observer distinctement la coiffe comme une structure bien définie, alors que les trois autres régions n'ont pas de limites bien définies et se fondent progressivement l'une dans l'autre [27].

La coiffe est un amas de cellules de parenchyme recouvrant l'extrémité de la racine, dont la fonction principale est de protéger les tissus délicats derrière elle lorsque la pointe de la jeune racine pousse à

travers les particules abrasives du sol. Les dictyosomes, des cellules situées vers l'extérieur de la coiffe, sécrètent et libèrent une substance visqueuse qui se loge dans les parois et finit par passer à l'extérieur, formant un lubrifiant visqueux facilitant le mouvement de l'extrémité de la racine à travers le sol. De plus, ce lubrifiant mucilagineux favorise la croissance de bactéries bénéfiques qui contribuent à l'azote disponible pour la plante. Puisque les racines semblent croître de façon aléatoire, il a été supposé que les cellules de la coiffe auraient également une fonction de perception de la gravité. Les amyloplast, un type de leucoplaste contenant des granules d'amidon comme réserve de glucide, agissent comme des capteurs



de la gravité et s'accumulent au fond des cellules de la coiffe. De cette façon, lorsqu'une racine qui a poussé verticalement est inclinée horizontalement, les amyloplast se dirigent jusqu'au nouveau fond des cellules. La racine recommence à pousser en 30 minutes à quelques heures. La nature exacte de cette réponse gravitationnelle n'est pas connue, mais il existe des preuves que les ions calcium dans l'amyloplaste influencent la distribution des hormones de croissance au sein de la cellule [27].

L'importance qu'occupe dans l'espace le système racinaire d'un plant de cannabis peut être impressionnante (figure 1), surtout chez les plants femelles qui sont jusqu'à 3 fois plus grands que ceux des plants mâles. Il a été démontré que le système racinaire joue un rôle essentiel dans l'expression du sexe de la plante chez le chanvre, augmentant la formation de plants femelles, et ce rôle est basé sur la synthèse et l'export de cytokines par les racines. [28].

Figure 1 Racines et plant de Cannabis cultivé terre (A et B) et en hydroponie (C et D)

1.2.2 Composition

De nombreux composés chimiquement actifs ont été identifiés dans les différents organes de la plante au fil du temps, principalement les cannabinoïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes et les alcaloïdes [29]. Les cannabinoïdes, une classe de composés terpénophénoliques, sont considérés comme l'une des classes de métabolites les plus actives biologiquement au sein de la plante et s'accumulent principalement au niveau des trichomes sur les fleurs femelles.

1.2.3 Taxonomie

Dans le domaine du cannabis, toutes les variétés présentent une composition génétique diploïde ($n=10$) [30], et il n'existe aucun obstacle inhérent à l'hybridation réussie au sein du genre. Deux catégories distinctes émergent : l'une caractérisée par son potentiel limité d'induction d'intoxication, souvent trouvée dans des climats septentrionaux, et principalement façonnée par la sélection pour des traits de fibre et d'huile agronomiquement favorables. L'autre catégorie comprend principalement des plantes méridionales avec une propension notable à induire l'intoxication, façonnée principalement par la sélection pour leurs qualités psychoactives. Ces deux catégories sont formellement désignées comme les sous-espèces (*subsp.*) *C. sativa* et *C. indica*, toutes deux appartenant à *Cannabis sativa*, l'espèce unique englobée dans le genre *Cannabis* [31].

Les désignations de *sativa* et *indica* ont historiquement été appliquées avec ambiguïté et incohérence, ayant des implications variées en matière de nomenclature et de contextes de production et de consommation. Par exemple, les taxonomistes ont traditionnellement attribué le terme *sativa* pour décrire des plantes non narcotiques comme le chanvre, tandis qu'*indica* a été utilisé pour caractériser des espèces narcotiques [32]. De plus, les producteurs emploient ces termes pour décrire le chemotype d'une plante ou ses effets psychoactifs. Ils attribuent *C. sativa* aux variétés de plantes avec une teneur élevée en THC et une faible ou minimale teneur en cannabidiol (CBD), tandis que *C. indica* est attribué aux plantes avec des niveaux modérés de THC et de CBD [33]. Ainsi, une disparité existe entre la littérature scientifique et les noms courants des espèces de *Cannabis*, évidente à tous les niveaux de rédaction scientifique, y compris dans des revues académiques réputées, semant ainsi la confusion tant chez les consommateurs que chez les scientifiques [34].

Il est donc essentiel de clarifier cette nomenclature. En accord avec la théorie affirmant le caractère monospécifique du genre, le genre *Cannabis* englobe une seule espèce, *Cannabis sativa* L. [35], et trois sous-espèces (*subsp. sativa*, *indica* et *ruderalis*). Les variations géographiques, morphologiques et chimiques observées découlent de processus étendus de sélection et de domestication subis par l'espèce à des fins utilitaires diverses. Cependant, il est à noter que certains taxonomistes désignent le genre *Cannabis* comme polyspécifique (*C. sativa*, *C. indica* et *C. ruderalis*) [36].

1.3 Usages thérapeutiques anciens

Au fil du temps, le cannabis a été exploré pour son côté récréatif et thérapeutique et est désigné sous plusieurs appellations. Si utilisé comme substitut aux opioïdes comme traitement de la douleur chronique, il est nommé Gunjah [37]. Les termes ganja et banj en Inde, bang en Afrique [38] et bhang pour les feuilles séchées ont été employés anciennement, et plusieurs variations linguistiques en sont issus [39].

Les premiers écrits qui font référence à l'utilisation de cannabis remontent jusqu'en 2 700 Av. J.-C. mais pour ce qui est des racines, les usages sont moins rapportés dans la littérature, et surtout moins précis. Les premiers écrits concernant le cannabis et la médecine humaine proviennent de la pharmacopée chinoise dont le crédit revient à l'empereur Shen Nung qui a vécu vers 2 700 Av. J.-C. Cet empereur est reconnu comme étant le père de la médecine chinoise. Son ouvrage s'est concentré sur l'utilisation des remèdes à base de plantes. Il a également enseigné à son peuple comment récolter le cannabis pour sa fibre, ses graines riches en nutriments et ses propriétés médicinales [40]. Shen Nung préférait l'énergie 'yin' des plantes de cannabis femelles pour traiter la malaria, la dysenterie, la constipation, les douleurs rhumatismales, les absences d'esprit et les troubles féminins [41].

Nous nous rendons ensuite au 1^{er} siècle apr. J.-C. où *Pliny the Elder* note que les gélotophyllis (*leaves of laughter*) produisent des hallucinations et que leurs infusions sont efficaces pour calmer les bêtes. Les racines sont alors indiquées pour soulager les contractures articulaires et pour les brûlures causées par la goutte [42]. Au 11^e siècle, les racines de cannabis étaient indiquées contre la fièvre, les tumeurs, alors que le jus de l'herbe était conseillé pour les oreilles et les feuilles contre les pellicules [43].

En 1535, Rabelais, médecin et auteur de *Gargantua et de Pantagruel*, dit que le suc de l'herbe pantagruéliens (chanvre) tue toute espèce de vermine et est un prompt remède contre les chevaux souffrant de coliques et d'essoufflement. Sa racine, bouillie dans l'eau, ramollit les tendons durcis, les articulations raides, la goutte sclérotique et les gonflements causés par la goutte. Il y est indiqué : « Si vous souhaitez soigner rapidement une échaudure ou une brûlure, appliquez du pantagruéliens brut » [44]. En 1542, la racine de *C. sativa* était utilisée bouillie pour la goutte, brute pour les brûlures, alors que le chanvre sauvage bouilli était utilisé en cataplasme pour les tumeurs [45]. En 1546, les racines bouillies étaient utilisées pour les muscles endoloris, les articulations raides, la goutte, les rhumatismes, le jus d'herbe pour les coliques de chevaux et cru sur les brûlures [46]. En 1596, Li Shi-Chen utilisait les fleurs pour traiter les troubles menstruels, le jus de racines pour favoriser la rétention placentaire et diminuer les hémorragies post-partum [47].

Plus tard, en 1640, Marcandier a fait écho aux affirmations antérieures de l'herboriste Parkinsons [48] selon lesquelles la racine de cannabis était efficace contre les tumeurs et autres inflammations dans le *Theatrum Botanicum* [49]. La même décoction de racines soulage les douleurs de la goutte, les tumeurs dures ou les nœuds des articulations, la douleur et le rétrécissement des tendons et autres douleurs similaires des hanches. Il est bon de l'utiliser, pour tout endroit qui a été brûlé par le feu, si le jus frais est mélangé avec un peu d'huile ou de beurre [50]. En 1764, *The New English Dispensatory* recommandait d'appliquer des racines de chanvre sur la peau afin de réduire l'inflammation [41].

Finalement, en 1971, Rodger a rapporté qu'un extrait de racines de cannabis dans le whiskey était utilisé par les Amérindiens et par d'autres pour traiter l'hydropisie (épanchement de sérosité) et avait aussi été rapporté comme ayant un effet semblable à la digitaline sur le cœur. L'effet serait associé à une grande

concentration de potassium dans l'extrait. C'est en 1974 qu'il a plutôt été suggéré que les racines de cannabis auraient une activité cardiaque causée par autre chose que le potassium, mais, étant encore à l'étape de fractionner les différents extraits afin de trouver la molécule responsable des effets observés, la question n'a pas été élucidée [51].

On note un certain intérêt pour la médecine racinaire du cannabis au Moyen Âge (Tableau 1), où la plupart des traitements étaient à base de plante et préparés par des apothicaires ou des herboristes. Il est compliqué de trouver des écrits à ce sujet décrivant la préparation, la récolte et l'utilisation des cures à base de plante dans ces époques. Cela peut être dû au vocabulaire utilisé et au fait que la racine de cannabis porte un autre nom. Également, majoritairement des femmes avaient ce type de connaissance, et lorsqu'elles les utilisaient, elles étaient susceptibles d'être condamnées de sorcellerie si leur pratique s'ébruitait. Des années 1580 aux années 1650, les chasses aux sorcières ont fait rage en Europe, réduisant les connaisseurs de remèdes à base de préparation botanique au silence, de peur de se faire accuser de comploter avec le malin [52]. Ce n'est que récemment que certains scientifiques se sont penchés sur les racines, mais l'engouement n'est pas comparable à l'intérêt apporté aux molécules comme le THC et le CBD retrouvés en grande quantité dans les fleurs et dont le ratio varie d'un chémotype à un autre. Une racine de cannabis s'est avérée contenir des terpénoïdes, des stérols et des alcaloïdes, mais peu de cannabinoïdes [53]. Les racines de cannabis ont reçu peu d'attention du milieu de la recherche au cours de la dernière décennie [50].

2700 Av. J.-C.	Premiers écrits de l'utilisation du cannabis en médecine humaine	[40]
1 ^{er} siècle ap. J.-C.	Pliny the Elder mentionne que les racines pour les contractures articulaires et pour les brûlures de la goutte sont efficaces	[42]
11 ^{ème} siècle	Les racines étaient bonnes pour la fièvre et les tumeurs	[43]
1535	La racine bouillie dans l'eau ramollit les tendons durcis, les articulations contractées, la goutte sclérotique et les gonflements goutteux	[44]
1542	La racine de <i>C. sativa</i> était utilisée bouillie pour la goutte et crue pour les brûlures	[45, 54]
1546	Les racines bouillies étaient utilisées pour les muscles endoloris, les articulations raides, la goutte, les rhumatismes, le jus d'herbe pour les coliques de chevaux, cru sur les brûlures	[46]
1596	Le jus de racines était indiqué pour favoriser la rétention placentaire et diminuer les hémorragies post-partum	[47]
1640	La racine de cannabis était efficace contre les tumeurs et autres inflammations	[50]
1764	Conseillé d'appliquer des racines de chanvre sur la peau afin de réduire l'inflammation	[41]
1971	Un extrait dans le whiskey de racine de cannabis était utilisé par les <i>American Indians</i> et par d'autres pour traiter l'hydropisie	[51]
1973	La racine bouillie soulage les crampes articulaires, la goutte et les douleurs similaires, et est appliquée crue aux brûlures	[55]

Tableau 1. Utilisations des racines de cannabis répertoriées en ordre chronologique

1.4 Usage moderne

En considérant que les racines de cannabis n'ont jamais vraiment été étudiées de fond en comble, et en prenant en compte tous les métabolites actifs qui sont produits par la plante en tant que telle, il devient intéressant de les étudier. C'est ce qu'ont fait quelques équipes de recherche, comme le réseau de biotechnologie du Nord-Est et l'Université Rurale fédérale de Pernambuco au Brésil, très récemment. Ils se sont surtout intéressés à l'effet anti-inflammatoire, antioxydant et antimicrobien, puisque ce sont ces usages qui sont rapportés le plus fréquemment dans l'ancienne littérature médicale.

L'effet anti-inflammatoire et spasmolytique ainsi que le profil toxicologique d'un extrait aqueux de racines de *C. sativa* ont été évalués chez la souris. Il a été démontré que cet extrait inhibe la migration des leucocytes, apporte une diminution de l'œdème causé par le carraghénane, et ce à toutes doses testées. Les auteurs ont déduit que, puisque la cannabissativine, le premier alcaloïde de type polyamine isolé de *C. sativa L.*, était le métabolite principal à intérêt pharmacologique dans leur extrait, celui-ci apportait une activité anti-inflammatoire. Dans cet essai, aucun effet spasmolytique n'a été observé ainsi qu'aucun effet toxique [56]. L'absence d'activité spasmolytique fut confirmée par une autre étude, démontrant également une activité anti-inflammatoire, en plus de capacité antinociceptive et antiasthmatique sur un extrait aqueux. L'effet antipyrétique fut testé, mais n'était pas concluant [57]. Encore une fois, un extrait de racine de cannabis a démontré des activités anti-inflammatoires en plus d'antioxydant remarquables, mais cette fois ce fut testé avec un extrait éthanolique sur des cellules U937 [58].

Les extraits totaux sont utilisés pour les récents tests, et quelquefois comparés aux composés isolés identifiés dans ces mêmes extraits. Il est connu qu'un effet d'entourage est présent dans les extraits provenant de plante et a été démontré en comparant l'effet anticancer du THC et d'une préparation botanique complète. L'efficacité anti-tumeur mesurée était plus grande avec la préparation botanique par rapport au THC seul. Cet effet d'entourage est dû à la grande diversité de métabolites présentes dans la plante de cannabis, offrant une quantité d'effets additifs ou synergiques sur leurs effets thérapeutiques [59].

Finalement, tous cannabinoïdes confondus, la plante femelle est reconnue comme ayant des concentrations plus élevées que les plants mâles, surtout en ce qui concerne les fleurs [60]. De faibles concentrations de ces cannabinoïdes ont été détectées dans les racines des deux sexes, mais apportaient tout de même une capacité anti-inflammatoire modérée. Considérant la présence d'un effet anti-inflammatoire modéré dans les racines, mais avec de faibles concentrations en cannabinoïde, la présence d'un métabolite spécialisé anti-inflammatoire différent pourrait y être retrouvée en grande quantité. Il y a donc présence d'opportunités supplémentaires de développement de produits biologiquement actifs à valeur ajoutée en exploitant les propriétés médicinales des racines [61]. On retrouve actuellement beaucoup de produits à base d'huile de chanvre, des produits topiques contenant principalement du CBD comme ingrédient actif. Le manque d'information sur les capacités thérapeutiques des racines de cannabis n'encourage pas de grandes compagnies à se lancer dans la production et la commercialisation de produits à base de racines de cannabis, comparativement à l'huile de chanvre. Pour le moment, il est possible de trouver des recettes pour préparer ses propres produits topiques à base d'extraits de plantes. Il serait donc possible d'en préparer à base d'extrait de racines de cannabis, avec comme indications le soulagement d'un état inflammatoire topique, tel que l'eczéma, puisque c'est l'utilisation la plus répertoriée dans les

écrits. La seule limitation est l'information disponible sur la composition et l'effet de ces molécules sur un système biologique.

1.5 Composition d'extrait de racines de Cannabis

Puisque les effets des extraits racinaires n'ont pas été très bien étudiés sur un organisme vivant pour le moment, la composition des extraits de racine de cannabis est également moins bien connue. Dans l'étude rapportant le plus grand nombre de composés, 20 métabolites spécialisés ont été identifiés dans le même échantillon de racine de chanvre par GC-MS [62]. Au total, 43 métabolites différents ont été identifiés dans différentes études (Tableau 2).

C'est en 1976 que l'alcaloïde dérivé de la spermidine, nommé cannabissativine, a été isolé des racines de cannabis [63]. Les effets des alcaloïdes retrouvés dans les racines, soit la cannabissativine et l'anhydrocannabissativine, sont ambigus et peu ou pas caractérisés. Sachant que plusieurs alcaloïdes sont utilisés comme traitement anticancéreux, telle la vincristine, ou pour ralentir la progression des symptômes de l'Alzheimer, comme la galanthamine, il devient intéressant d'explorer le potentiel thérapeutique que ces molécules pourraient apporter.

Par la suite, les métabolites du groupe des phénylpropanoïdes tels le feruloytyramine (FT) et *p*-coumaroyltyramine (*p*-CT) ont été détectés dans les racines. Leur administration intracérébrale ventriculaire dans l'éthanol (pour contrecarrer le passage à travers la barrière hématoencéphalique) a entraîné quelques effets pharmacologiques chez la souris, tels l'hypothermie, la catalepsie et une perte de coordination motrice. Ces mêmes molécules, isolées de certaines plantes médicinales, sont également utilisées pour traiter la sténocardie, l'asthme cardiaque et la stase veineuse. Finalement, ces métabolites inhibent la biosynthèse de prostaglandine *in vitro* [64].

Les racines sont l'organe de la plante ayant la plus petite concentration de terpénoïdes totaux, qui serait inférieure à 0,03%. Cependant, les triterpénoïdes totaux sont les plus élevés dans les racines, comparativement aux autres organes, avec une moyenne de 0,182%, ce qui est supérieur au seuil d'intérêt pharmacologique. Les flavonoïdes totaux sont également inférieurs à 0,03% dans les racines, et cette concentration est la même pour l'écorce et la tige également. Comparativement aux autres compartiments de la plante, ce sont les racines qui possèdent la plus grande concentration en stérol, qui est en moyenne de 0,066%. Selon l'étude, les cannabinoïdes totaux seraient inférieurs à 0,03% dans les racines [65]

Un extrait éthanolique de racines de cannabis cultivées en aéroponie a été caractérisé, et les principales composantes présentant un intérêt biologique étaient les phytostérols β -sitostérol (ST), l'épifriedélanol (EFR) et le friedélanol (FR) [58]. Cet extrait a démontré une activité antioxydante supérieure dans les systèmes acellulaires comparativement aux composants individuels testés à des concentrations équivalentes à celle présente dans l'extrait total, et cela selon un schéma bimodal additif (DPPH et Fe_2^{+}). L'extrait a donc la capacité de piéger les radicaux ainsi que de chélater les métaux de transition.

Dans un système cellulaire, l'extrait ainsi que ces métabolites ont conservé leur activité antioxydante contre la cytotoxicité et la génotoxicité induites par H_2O_2 (U937). Certaines plantes médicinales voient leur activité anti-inflammatoire attribuée à leur teneur en terpènes comme le friedélanol, qui présente une puissante activité anti-inflammatoire *in vivo*. L'extrait éthanolique (ainsi que FR, EFR et ST individuellement) ont

empêché l'expression génique, stimulé par LPS, des marqueurs d'inflammation (IL-6, IL-8, TNF- α , I κ B- α et iNOS).

Également, lors de la stimulation des cellules U937 avec LPS, IRAK-1 est surexprimé, alors que miR-146a est sous-exprimé. L'extrait favorise la surexpression de miR-146a dans les mêmes conditions de stimulation LPS. Les auteurs ont conclu que la surexpression de miR-146a était liée de manière causale à la régulation négative parallèle d'IRAK-1 et impliquée de manière mécanique dans l'activité anti-inflammatoire globale de l'extrait et de ses principaux composants rapportés dans l'étude [58]. La surexpression de miR-146a permet, entre autres, d'inhiber la libération des chimiokines pro-inflammatoires et l'expression de IRAK-1, altère l'activité de NF- κ B en plus de supprimer l'expression des gènes cible de NF- κ B [66]. Cette surexpression serait liée à la régulation négative d'IRAK-1, dont l'effet principal est une diminution de l'apparition des molécules inflammatoires [67].

La quantité de molécules bioactives retrouvées dans les plantes diffère d'une culture à l'autre, étant plus élevée dans les plants cultivés en sol qu'en aéroponie. Cependant, la croissance des parties aériennes et racinaires est plus rapide en aéroponie. En ce qui concerne les phytostérols, l'épifriedélanol et le friedélin sont plus élevés en sol, le campestérol et le stigmastérol sont présents en quantité similaire, que ce soit en sol ou en aéroponie, mais le β -sitostérol est plus élevé en aéroponie [68].

Dans une autre étude, il a été démontré que l'extrait éthanolique de racines de chanvre contenait une forte concentration d'acide *p*-coumarique [69]. Ce composé est un phénylpropanoïde largement répandu dans le règne végétal. L'acide *p*-coumarique et ses dérivés ont des activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et diverses autres activités biologiques. L'acide *p*-coumarique élimine efficacement les radicaux libres, soulage le stress oxydatif et la réponse inflammatoires des cellules endothéliales et des kératinocytes épidermiques. Il diminue également l'hépatotoxicité de l'alcool et protège la peau des rayons UV. De plus, l'acide *p*-coumarique inhibe l'activité de la tyrosinase par un mécanisme compétitif avec le substrat et réduit la pigmentation dans les modèles animaux et les tests d'application humaine. Pour toutes ces raisons, ce métabolite est en cours de d'essais pour diverses utilisations en cosmétiques. Une étude menée par Oh, Choi et al (2022) a rapporté la présence de *p*-coumarate d'éthyle dans les racines de chanvre. Ce composé présente une activité antifongique prononcée contre *Alternaria alternata in vitro* et *in vivo* dans le fruit de jujube avec une concentration de 100 μ g/mL. Cela suggère un potentiel d'utilisation dans le contrôle des maladies post-récolte des fruits. Ses effets antioxydants et anti-inflammatoires ont été démontrés dans le modèle d'œdème de la patte induit par le carraghénane de souris *Swiss* et dans le modèle complet d'arthrite induite par l'adjuvant de Freund de rats *Wistar*. Cette étude a donc identifié l'acide *p*-coumarique et le *p*-coumarate d'éthyle comme les principaux composés phénoliques contenus dans les racines de chanvre [69].

Les racines sont reconnues pour être l'organe de la plante qui ne contient pas de THC, donc elles ne sont pas considérées comme une drogue à proprement parler. Cependant, une étude menée par Gul et al (2018) a permis de détecter la présence de 9 cannabinoïdes majeurs, incluant le THC. Leur technique de détection permet une limite de détection (LOD) de 0,05 ppm, alors que la concentration quantifiée de THC allait jusqu'à 0,8 ppm pour la plante mère, et était inférieure pour les plantes filles. Le fait que les racines ne soient pas soumises aux mêmes limitations légales que les parties aériennes de la plante serait peut-être à réévaluer, si l'on en croit cette étude. En revanche, il faut prendre en considération que les racines utilisées pour ces études proviennent d'une technique de propagation *in vitro* et que les taux de

cannabinoïdes étaient tellement bas qu'une analyse GC-FID ne permettait pas leur détection. La quantité alors dosée n'est peut-être pas significative pour appuyer une législation en ce sens [70].

Famille de métabolites	Molécules	Propriétés bioactives	Utilisations	Références
Triterpenes	Friedelin	Anti-diabétique, anticancer, anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique	Diabète T2, cancer du sein, leucémie, inflammation, douleurs, fièvre	[62] [68] [71-73]
	Epifriedelinol	Anticancer	Cancer du col	[62] [68, 74]
	β -amyrine	Antibactérien, antifongique, anti-xanthine oxydase, anti-tyrosinase	Infection, vieillissement, hyperpigmentation	[62, 75-77]
	β -amyrone	Anti-inflammatoire, inhibe alpha-glucosidase et lipase pancréatique	Œdème, diabète T2	[62, 78, 79]
	Glutinol	Anticancer, analgésique, anti-inflammatoire	Cancer ovarien, douleurs, inflammation	[62, 80, 81]
	Squalène	Régule la biosynthèse de vitamine D, précurseur des stéroïde	Antioxydant, émollient cutané	[75, 82]
Acide gras	Palmitate d'éthyle	Anti-inflammatoire	Marqueur capillaire de consommation d'alcool, œdème	[62, 83, 84]
	Linoléate d'éthyle	Antibactérien, anti-inflammatoire, anti-acné	Cosmétique, agent blanchissant pour réduire l'hyperpigmentation	[62, 85]
	Octadécanoate d'éthyle	Biomarqueur de consommation d'alcool		[62, 75, 86]
	Oléamide	Vasodilatateur	Thermorégulation, analgésique	[62, 87]
	Acide vaccénique	Ralentissement du développement tumorale, maladie coronarienne	Anticancer, diminution des risques de développement de maladie coronarienne	[75, 88]
	Acide lignocérique	Précurseur de la formation de la myéline		[75, 89]

	Acide palmitique	Antibactérien	Résistance bactérienne	[75, 90]
	Acide α -linoléique	Pro-inflammatoire intestinal, anti-inflammatoire leucocytaire, active la lipoxygénase	Obésité, résistance à l'insuline	[75, 91, 92]
	Acide arachidique	antifongique	Infection	[75, 93]
Hydrocarbures stéroïdiens	Stigmasta-3,5-diène	Produit d'oxydation du β -sitostérol		[62, 94]
	Stigmasta-3,5,22-triène	Produit de déshydratation du stigmastérol		[62, 95]
Phytostérols	Campestérol	Anti angiogénique, anticancer	Cancer des ovaires, marqueur d'absorption du cholestérol	[62] [68, 75, 96, 97]
	Stigmastérol	Modulation des récepteurs GABA, anticonvulsivant	Troubles neurologiques, anxiété	[62] [68, 75, 98]
	β -sitostérol	Antimicrobien, anti-inflammatoire, diminution des lipides	Cholestérol, prévention maladies du cœur, douleurs, NAFLD	[62] [68, 99-101]
	Stigmastanol	Inhibition de l'absorption du cholestérol	Cholestérol, maladies cardiovasculaires	[62, 102]
	Fucostérol	Antioxydant, anticancer, anti-photo vieillissement	Obésité, cancer du poumon, vieillissement	[62, 103-106]
	γ -sitosterol	Antioxydant, effet antiproliférative sur les cellules de l'épithéliale bronchique	Conservation de l'huile de friture, MPOC	[75, 107, 108]
Cétones stéroïdes	4-campestene-3-one	Dérivé du campestane		[62]
	Stigmasta-4,22-diene-3-one	Dérivé du stigmastane		[62]
Composés phénoliques	Acide <i>p</i> -coumarique	Anti mélanogénique, antioxydant, anti-inflammatoire	Pigmentation de la peau, inflammation	[69, 109, 110]
	<i>P</i> -coumarate d'éthyle	Antioxydant, anti-inflammatoire	Réduit le stress oxydatif, inflammation chronique	[69, 111]
	2-methoxy-4-vinylphenol	Anticancer, anti-inflammatoire	Cancer du pancréas, inflammation chronique	[75, 112, 113]
	Phenol-2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl	Utilisé en industrie comme stabilisateur, adhésif et antioxydant de produit hydraulique, carburant et lubrifiant		[75, 114]
	<i>p</i> -coumaroyltyramine	Inhibe acétylcholinestérase,	Alzheimer's	[57, 115-117]

		prolifération cellulaire et agrégation plaquettaire, antioxydant		
	Feruloyltyramine	Inhibiteur de la synthèse de mélanine, antioxydant	Cancer, tumeur	[57, 118, 119]
Cannabinoïde synthétique	Dronabinol	Δ 9-THC synthétique administré pour l'anorexie lié au sida ainsi que les nausées et vomissements liés à une chimiothérapie	[75, 120]	
Alcaloïdes	Cannabisativine	Sont présents en petite quantité et sont présumés non effectif dans les activités biologiques du cannabis		[57, 63]
	Hydrocannabisativine			
Cannabinoïdes	Cannabitol	Sédatif, anticonvulsivant, anti-inflammatoire, antimicrobien, anti-MRSA	Brûlure, psoriasis,	[57] [70, 121-124]
	Cannabigerol	Analgésique, antiarythmique, antifongique, anticancer, inhibiteur de kératocytes, antidépresseur	Douleur, inflammation, sensation de chaleur, cancer du sein, psoriasis, humeur	[70, 124-130]
	Acide cannabigerolique	Précurseur des cannabinoïdes		[70]
	Cannabidiol	Anticonvulsion, anti-inflammatoire, antioxydant, antipsychotique	Epilepsie, Parkinson, SLA, Huntington, Alzheimer's, Sclérose multiple	[70, 131-134]
	Acide cannabidiolique	Antiémétique	Nausées	[70, 135, 136]
	Δ 9-tetrahydrocannabinol	Bronchodilatateur, antioxydant neuroprotecteur, antipruritique, anti-inflammatoire,	Douleur, spasticité, sédation, appétit, humeur, agent dans la jaunisse cholestatique	[70, 128, 137-140]
	Acide tetrahydrocannabinolique	Immunomodulateur, anti-inflammatoire, neuroprotecteur, antinéoplasique	Nausée et vomissement, cancer	[70, 135, 141, 142]
	Δ 8-Tetrahydrocannabinol	Antiémétique pédiatrique, antiprolifératif	Nausée et vomissement, cancer	[70, 143, 144]
	Cannabichromène	Analgésique, anti-inflammatoire	Douleurs	[70, 145, 146]

Tableau 2. Métabolites identifiés dans les racines avec leurs propriétés bioactives et leurs utilisations

1.6 Racine de cannabis et biotechnologies

La culture des racines peut être effectuée de manière intensive grâce au système de culture aéroponique. Un vaste tapis de racines est produit, à partir duquel, après coupe, des métabolites biologiquement actifs sont extraits pour l'industrie médicale. La production de métabolites médicinales à partir de racines de chanvre a une longue histoire d'utilisation. En fait, elles ont été utilisées dans la fabrication de décoctions et de préparations pour traiter et soulager les symptômes causés par un grand nombre de maladies et de troubles tels que la raideur des articulations et la goutte. La possibilité d'utiliser des racines est une alternative au vide législatif qui interdit l'utilisation d'inflorescences, mais le développement de cette nouvelle utilisation dérivée du chanvre devrait être profitable en culture aéroponique. Avec cette technique, environ 360 g. de racines sèches à 10% d'humidité sont produits par mètre carré de tapis radicalaire, avec un rapport de matière sèche entre les racines et l'inflorescence de 2 :1. De cette surface de racines, on peut extraire une série de composés d'intérêt pharmaceutique, tels que les triterpénoïdes et les monoterpènes, par exemple la friedeline à raison d'environ 360 mg/kg, une valeur très élevée compte tenu des valeurs rapportées dans la littérature pour une seule plante de chanvre [147, 148].

Du côté biotechnologique, les quantités importantes de tapis racinaires produites par une culture de cannabis peuvent être utilisées. En effet, les systèmes racinaires "hairy root" produits par *Agrobacterium rhizogenes* sont de plus en plus populaires comme système de production de métabolites spécialisés synthétisés dans les racines des plantes [149], grâce à leur propagation illimitée dans les milieux de culture, leur croissance rapide, leur stabilité génétique et biochimique ainsi que leur croissance dans des milieux sans hormones. Cette alternative pour la production de molécules d'intérêt, telles que les cannabinoïdes et les alcaloïdes, est actuellement étudiée pour le cannabis. Malheureusement, puisque les cannabinoïdes sont normalement produits dans les trichomes et ne sont pas présents dans les tissus racinaires, cette approche n'est pas adaptée pour cette famille de composés [150]. Étant très réfractaire aux modifications génétiques et ayant un taux de régénération très faible, *C. sativa L.* est considéré comme un mauvais candidat à la production de métabolites d'intérêt par ses racines. Cependant, vu l'impressionnante vitesse de croissance et la quantité de racines produites par cette plante, il reste intéressant d'évaluer les options. Dernièrement, une combinaison d'induction de polyploidie et de culture de racines à médiation par *A. rhizogenes* équipée de CRISPR/Cas9 a été considérée comme une stratégie robuste pour modifier le profil chimique ainsi qu'augmenter la production de métabolites spécialisées [151]. Cette stratégie est susceptible de surmonter les problèmes de culture de racines de cannabis transformés à des fins de production de métabolites d'intérêt.

1.7 Cannabis et environnement

Il existe 2 raisons distinctes pour lesquelles les sols contaminés au cadmium peuvent servir à des fins de culture. Premièrement, une culture de plante qui absorbe les contaminants qui s'accumulent dans les parties récoltables de la plante : la phytoextraction. La deuxième s'applique à la culture végétale non comestible avec un intérêt commercial afin de valoriser les sols contaminés au cadmium. On peut combiner ces deux utilisations si la partie utilisée à des fins industrielles et commerciales n'est pas celle qui accumule les métaux lourds [152]. Des données préliminaires ont démontré que les fibres de chanvre (*C. sativa L.*) sont exemptes de métaux lourds lorsqu'elles sont cultivées sur des sols contaminés. Ainsi, il serait un candidat pour la phytoextraction, tout en utilisant la fibre en raffinage industriel [153].

Le développement durable est guidé principalement par l'utilisation des ressources naturelles. Des limites ont été tracées par des chercheurs suédois définissant les frontières à l'intérieur desquelles l'être humain peut opérer sans affecter l'équilibre de la planète [154]. L'utilisation optimale des surfaces de cultures est alors nécessaire afin de ne pas dépasser ces limites et interférer avec l'équilibre de la biodiversité. Le chanvre, étant autant utilisé comme textile, huile alimentaire, source de fibre, nourriture et de traitement, peut être un candidat intéressant. Mais qu'en est-il de l'impact de sa culture, sachant que l'équilibre de l'écosystème est un sujet sensible avec la croissance exponentielle de la population humaine.

L'une des grandes préoccupations des écologistes est la concentration en CO₂ qui se situe actuellement à 418 ppm dans l'atmosphère [155]. La valeur préindustrielle se situait à 280 ppm. L'avantage qu'a le chanvre sur la production de CO₂ est qu'il s'agit d'une culture à ΔCO₂ négatif en soi. Cette culture est capable d'éliminer plus de CO₂ de l'environnement qu'elle n'en émet. Vu sa croissance très rapide, elle est avantageuse par rapport aux autres types de culture, particulièrement des ligneuses, qui possèdent aussi une grande capacité à séquestrer le CO₂, mais cette capacité varie énormément selon les pratiques agronomiques adoptées et la biomasse produite par hectare. Pour une production de biomasse produite, entre 8 et 12 tonnes rapportent des valeurs de CO₂ séquestrées entre 10 et 15 tonnes par hectare [156]. Un autre point positif à favoriser la culture de chanvre est qu'il a un effet bénéfique sur la réduction des gaz à effet de serres agricoles via la nutrition azotée. Il a été démontré que cette culture a un meilleur développement végétatif et une meilleure qualité de graines si des engrais à libération lente comme l'urée sont utilisés par rapport aux engrais synthétiques tels que le nitrate d'ammonium (NH₄NO₃) [157]. De plus, l'utilisation de nitrate d'ammonium favorise une plus grande émission de gaz à effet de serre dans l'atmosphère, comparativement à l'urée, comme le protoxyde d'azote. Ce dernier est extrêmement dangereux puisqu'il chauffe 297 fois plus que le CO₂ [158]. Il est en revanche nécessaire d'optimiser les traitements pré et post culture. Autrement dit, les impacts négatifs apportés par l'utilisation de machinerie agricole, de transport, de conditionnement post-récolte ne doivent pas annuler les bienfaits apportés par ce type de culture, afin de la garder comme une option favorable à l'environnement, comparativement aux cultures déjà industrialisées comme le coton.

Dans les faits, le cannabis agit positivement autant sur l'écosystème, en capturant du CO₂ atmosphérique dans sa biomasse et en baissant l'émission de N₂O dans l'atmosphère grâce à l'utilisation des engrais azotés à libération lente, que sur la santé humaine, en fournissant des fibres, des huiles, de la nourriture et un potentiel thérapeutique. Il est donc raisonnable de classer la culture de chanvre comme une culture respectueuse du climat, et un bon outil pour lutter contre le changement climatique.

1.8 Rhizome/microbiome

La recherche de nouvelles techniques innovantes pour optimiser la culture ou la production de certains métabolites spécialisées chez certaines plantes bat son plein. L'élucidation des microbiomes et des spécificités qui l'entourent est un moyen d'y parvenir. Prenant en compte les avancées biotechnologiques dont les racines de cannabis font partie, il devient intéressant de se pencher sur les organismes vivants qui participe à leur croissance.

Le microbiome décrit le génome collectif des communautés microbiennes, le microbiote, qui est associé aux humains, aux animaux et aux plantes. La composition du microbiote résidant dans un hôte est affectée par les conditions environnementales telles que la température, le pH et la disponibilité des nutriments. Plusieurs facteurs peuvent également affecter la capacité de l'hôte à interagir correctement avec son

microbiote, comme la surutilisation des xénobiotiques en agriculture, l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques et aux pesticides, autant en agriculture qu'en médecine humaine.

Des points communs sont partagés par le microbiote racinaire et intestinal, surtout concernant la régulation de l'expression des gènes, l'amélioration de capacité métabolique de l'hôte et la suppression des agents pathogènes nocifs. Chez l'homme, il est reconnu que la composition microbienne a un impact réel sur la santé humaine. « Que ta nourriture soit ta médecine! », comme disait Hippocrate. Il existe donc la stratégie nutritionnelle consistant à ajouter des composés phytochimiques alimentaires tels que les métabolites secondaires, les flavonols et la quercétine. Les flavonoïdes et la quercétine sont des composés phytochimiques importants du cannabis et leur combinaison en font un puissant antioxydant.

Les communautés microbiennes spécifiques aux racines et au sol qui les entourent composent la rhizosphère, celle demeurant à l'interface air-plante est la phyllosphère et celle associée aux tissus internes de la plante s'appelle endosphère [159].

Il a été démontré que les planctobactéries et les ascomycètes dominaient les communautés bactériennes et fongiques du microbiote du chanvre. Cependant, aucun microbiote central n'a été identifié et une grande partie des bactéries n'ont pas été classées au niveau du genre (37%), indiquant que le microbiote central du chanvre comprend des bactéries qui n'ont pas encore été isolées ou documentées [160].

Également, la rhizosphère, l'endosphère et la phyllosphère varient selon les chémotypes. Ce sont probablement les métabolites secondaires distincts produits par les différents cultivars qui contribuent à ces variances. Il a également été démontré que la diversité microbienne était la plus grande dans les sols et diminuait ensuite de la racine à la tige et à la feuille, pour finir très faible dans les fleurs. Il est possible d'observer le même gradient dans d'autres cultures, telles que le maïs (*Zea mays*), le blé (*Triticum aestivum*) et l'orge (*Hordeum vulgare*). La conclusion fut que le sol constituait le réservoir principal pour le microbiome associé aux plantes et que ces dernières pouvaient alors recruter et filtrer les microbes habitant la rhizosphère et l'endosphère.

Il faut aussi comprendre que certaines espèces de microorganismes ne sont pas en mesure de maintenir un mode de vie symbiotique avec l'hôte, ce qui diminue les possibilités de cohabitation pour la plante. Effectivement, chaque compartiment d'un plant de cannabis (racine, tige, feuille et fleur) va être enrichi des groupes microbiens ayant des fonctions spécifiques. Par exemple, le genre *Rhizobium*, ayant un fort potentiel d'absorption de nutriments, est fortement enrichi dans l'endosphère racinaire. Également, les *Xanthomonadales*, les *Spongibacteraceae* et les *Burkholderiales*, qui se sont avérés être des membres dominants du microbiome de l'endosphère, ont des effets bénéfiques sur la croissance et la santé des plantes [161].

Il existe probablement un potentiel d'optimisation de la production de métabolites d'intérêt par la plante via la connaissance des microorganismes présents dans l'entourage des racines. Les connaissances entourant les interactions entre le microbiome et les végétaux par le système racinaire sont en constante évolution et valent la peine qu'on s'y intéresse davantage dans les prochaines années.

1.9 Originalité et contribution à la science

La recherche sur les propriétés du cannabis a été en pause pendant des décennies en raison de son illégalité. Maintenant que toutes les avenues de recherche sont à explorer, la fleur a été et est toujours sous investigation pour son efficacité dans différents états pathologiques, tels que le cancer [162], la maladie d'Alzheimer [163], les chocs post-traumatiques [164], etc. Il existe une probabilité qu'une autre partie de la plante puisse apporter des effets positifs sur l'homéostasie humaine. L'organe négligé de *C. sativa* L. est la racine. Les racines ne sont actuellement pas utilisées après la récolte des parties aériennes d'intérêt, que ce soient les tiges pour la fibre, les graines pour l'huile ou les fleurs pour les molécules psychoactives.

Plusieurs variétés de plantes médicinales ont déjà suscité l'intérêt au fil du temps pour leurs racines, tant dans la pharmacopée chinoise que dans l'Ayurveda. On peut citer, entre autres, *Panax ginseng* [165], *Rhodiola crenulata* [166], *Aucklandia lappa* [167], *Rubia cordifolia* L [168] et *Aconitum carmichaeli* Debx [169]. Puisque peu d'informations sont disponibles sur l'utilité des racines de cannabis dans la médecine moderne, cette étude se veut un criblage des possibilités émergentes, basé sur une recherche bibliographique méticuleuse des utilisations rapportées dans des ouvrages dont certains datent de plusieurs centaines d'années.

CHAPITRE II

Caractérisation thérapeutique d'extraits de racines de *Cannabis sativa*

2.1 Contribution des auteurs

L'étude a été conçue par Valérie Gagné, Nathalie Boucher et Isabel Desgagné-Penix, supervisée par Isabel Desgagné-Penix (directrice de recherche) et Nathalie Boucher (co-directrice de recherche). La première ébauche du manuscrit a été réalisée par Valérie Gagné. Les expériences à la base de cet article ont toutes été accomplies par Valérie Gagné, soit le criblage des activités antioxydantes, antiinflammatoires, antibactériennes ainsi que l'activité biologique dans le cadre de sa maîtrise. La révision finale de l'article a été corrigé par Natacha Merindol, Mélodie B. Plourde et Isabel-Desgagné-Penix.

2.2 Résumé de l'article

La culture du *Cannabis* est en plein essor depuis la légalisation de la consommation récréative en 2018 au Canada, ce qui a entraîné une augmentation des déchets qui y sont associés. Les racines font partie de ces déchets, malgré leur possible utilité thérapeutique. En effet, elles étaient mentionnées comme un traitement pour les troubles inflammatoires et infectieux dans l'Ayurveda. Dans cette étude, afin d'explorer les possibilités thérapeutiques offertes par les racines de *Cannabis*, elles ont été extraites à l'eau, à l'alcool, et selon un protocole acide-base, et plusieurs propriétés thérapeutiques ont été mesurées. L'effet antioxydant a été évalué par la neutralisation de radicaux libres, la chélation de métaux et la lipoperoxydation sur des micelles d'acide linoléique en utilisant un spectrophotomètre. La protection des membranes mitochondriales a été évaluée dans les cellules leucémiques monocytaires THP-1 à l'aide de la sonde MitoPerOx par cytométrie en flux. L'effet anti-inflammatoire a été démontré en mesurant les niveaux d'IL-6 en réponse à la stimulation par le LPS des cellules THP-1. Enfin, l'effet anticholinestérase, une enzyme ciblée dans les traitements de la maladie d'Alzheimer, a été testé à l'aide de tests d'inhibition enzymatique. Cette étude nous a permis de mettre en évidence un effet antioxydant prononcé, la détection d'une activité anticholinestérase, des activités anti et pro-inflammatoires, ainsi que des effets bactéricides contre certains microorganismes.

2.3 Article scientifique

Rooted in Therapeutics: Comprehensive Analyses of *Cannabis sativa* Root Extracts reveals potent antioxidant, anti-inflammatory, and bactericidal properties

Short Title: Unlocking Therapeutic Value of Cannabis Roots

Valérie Gagné^{1,2}, Nathalie Boucher^{1,2}, Isabel Desgagné-Penix^{1,2}

¹Department of Chemistry, Biochemistry, and Physics, University of Quebec at Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada

²Plant Biology Research Group, Trois-Rivières, Québec, Canada.

* Correspondence: Isabel.Desgagne-Penix@uqtr.ca; Tel.: 1-819-376-5011

Keywords: Valorization₁, Alkaloid₂, THP-1₃, Antioxidant₄, Polyphenols₅, Anti-inflammatory₆

2.3.1 Summary

Since the legalization of recreational *Cannabis* consumption in Canada in 2018, its culture, and thus the associated waste, greatly increased. Among these waste products are the roots, which account for 30 to 50 % of the total plant volume. Cannabis roots have however long been reported/used/noted for their therapeutic utility, such as their use as a treatment for inflammatory and infectious disorders in Ayurvedic medicine. This study aims to explore the therapeutic possibilities of water, alcohol, and acid-base *Cannabis* roots extracts. Their antioxidant properties were assessed through free radicals' neutralization, metal chelation, and lipoperoxidation on linoleic acid micelles. Mitochondrial membrane protection was evaluated by flow cytometry in THP-1 monocytic leukemia cells using the MitoPerOx probe. The extracts' anti-inflammatory effect was studied by measuring IL-6 levels in response to LPS stimulation of THP-1 cells. The bactericidal efficacy was evaluated utilizing the INT assay on *Escherichia coli*, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus*. Finally, leveraging the established efficacy of certain alkaloids derived from plants, their inhibition of cholinesterase, an enzyme targeted in Alzheimer's disease treatments, was tested. This study highlighted a significant antioxidant effect, some anticholinesterase activity, both anti- and pro-inflammatory activities, as well as bactericidal effects against certain organisms of *Cannabis* root extracts.

2.3.2 Introduction

Cannabis sativa, an annual herbaceous plant, belongs to the Cannabaceae family [20] and its cultivation is believed to originate from Central Asia [21]. Besides its fiber, which is thought to be the basis for its domestication, this plant has been used as a source of food and oil, as well as for its medicinal and recreational properties, and has even been involved in religious rituals [22]. Many of *Cannabis*'s medicinal properties are attributed to the presence of cannabinoids, a class of terpenophenolic compounds specific to *Cannabis* that has garnered substantial interest in recent years. Two cannabinoids are more abundant and more studied, tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), and they exert their effects on humans through the endocannabinoid system [170]. It is in part due to the growing interest in these compounds that the agricultural landscape surrounding this plant has evolved in recent years.

Cannabis cultivation has been on the rise in Canada since its legalization for medical purposes in 2001 [19] and for recreational use in October 2018. In 2016, the number of production licenses issued by Agriculture Canada amounted to 55, covering a total cultivation area of 8.7 hectares. From this area, 80,535 kilograms of dried *Cannabis* were produced, generating revenues of \$245,733,000 [171]. This increased almost a hundredfold in 2021, with a total of 522 authorized *Cannabis* cultivators in Canada, 20,130,384 square feet of indoor cultivation and 685 hectares of outdoor cultivation [172], and revenues of 14 billion dollars [173]. As a result of the period of illegality from 1923 to 2001[19], very little research was conducted on *Cannabis*. Thus, there is a need for an in-depth examination of this industry, not only in regard to the effects of the plant on humans but also regarding optimal cultivation methods and the environmental impact of *Cannabis* cultivation, as well as its potential in biotechnology.

A critical consideration for all types of cultivation, particularly in the context of climate change, is the environmental footprint, which should aim to be as close to carbon neutral as possible. This involves considering processes both upstream and downstream of the harvest. One approach employed by various industries is waste valorisation, which involves converting cultivation waste into value-added products or reusing residues to establish a circular economy. To reduce the environmental impact of *Cannabis* cultivation, it would be interesting to assess waste materials for their therapeutic potential.

As *Cannabis* roots, which represent 30 to 50 percent of the plant biomass, do not contain the psychoactive compound THC, they are not regulated under the *Cannabis* legislation, making them easier to valorise. Historical records suggest that they were primarily used as anti-inflammatory and antimicrobial agents [174], while other less precise sources have touted them for alleviating various other ailments [29]. Some studies have identified molecules present in different extracts, although often focusing on a specific family of compounds [57, 175-178]. As a result, we have a superficial/narrow knowledge of which metabolites are found in *Cannabis* roots and of their associated therapeutic activities. However, the occurrence of synergistic effects should not be overlooked. Only a handful of studies have focused on total extracts, and those that have often directly employed complete biological models such as mice and rats [56, 57, 175]. On the other hand, small-scale trials on cellular models reduce multifactorial variation and facilitate the testing of multiple experimental conditions.

In this study, we conducted chemical and biochemical tests, such as total polyphenols determination, free radicals scavenging, and inhibition of micelle lipoperoxidation to assess the extracts' antioxidant potential.

Subsequently, we carried out tests for mitochondrial membrane integrity and interleukine-6 production in THP-1 cells. These tests allowed us to demonstrate a significant antioxidant effect as well as potential anti-inflammatory effects with no modification of the relative expression of Nrf2 for certain extracts, in addition to anticholinesterase and fungicidal effects.

2.3.3 Method

Plant material

Roots from the Alien Gorilla Glue cultivar (Crop King Seed, Vancouver) were obtained from two medical *Cannabis* users with cultivation licences (MCR-347668 and MCR-185440) and were derived from vegetative cuttings from the same mother plant. Three plants were cultivated using a hydroponic method, while three others were grown in soil, all under controlled conditions inside a cultivation chamber. In brief, after the vegetative cuttings were taken, young plants were placed under conditions conducive to vegetative growth, with a 24-hour light cycle. Flowering was induced by switching to a 12-hour light-dark cycle. When approximately two-thirds of the stigmas had turned brown, the flowers were harvested. The roots were cleaned with distilled water, then dehydrated using a food dehydrator (50°C, overnight) before being ground and reduced to powder. This raw material was then used for the extractions.

Extractions

Three different types of extraction were performed: aqueous, alcohol, and acid-base. The water extraction was conducted in the form of a decoction: the roots were macerated in distilled water for 24 hours before being gently heated (75°C, 10 minutes) and filtered. The alcoholic extraction was carried out using continuous solvent extraction (Soxhlet) with ethanol (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) for a period of three hours and 30 minutes. The acid-base extraction was performed following the method described by Andrade, J.P., and al [179], with some modifications. The material was macerated for 24 hours in methanol (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) at room temperature, and then the macerate was filtered. The crude extract was acidified with 2 % sulfuric acid (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) to a pH of 2 and extracted with chloroform (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) to remove neutral compounds. The aqueous acid solution was basified with 7 N ammonia (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) to a pH of 10, then extracted with chloroform and evaporated. All extractions were reported as dry weight and then diluted in a 70 % ethanol solution to a final concentration of 5 mg/mL, and in 20 % ethanol at the same concentration for antibacterial and antifungal tests. Extraction yields are reported in the supplementary material (S1)

Total phenolic content (TPC)

The total phenolic content (TPC) quantification was carried out using the Folin-Ciocalteu colorimetric method [180], with some modifications. In summary, 500 µl of the extracts were mixed with 250 µl of Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and vortexed for three minutes. Subsequently, 500 µl of 8 % Na₂CO₃ (ACROS organics from Fisher, Geel, Belgium) were added, and the volume was adjusted to 2.5 ml. The mixture was incubated for one hour in the dark at room temperature. Finally, the samples were centrifugated at 1000 g for five minutes at room temperature, the supernatant was transferred to a microplate and absorbance was read at 765 nm on a spectrophotometer (Synergy H1,

Bio Tek). The total polyphenol content was calculated as gallic acid equivalent (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) (S2).

ABTS• radical scavenging activity

The assessment of the extracts' antioxidant capacity was conducted using the method outlined by Re, R., et al [181]. In summary, the ABTS• radical (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) diammonium salt) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was generated by oxidation with potassium persulfate (MAT laboratory, Quebec, Canada) and can be reduced by a hydrogen-donor antioxidant. The reagent consists of a 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate stock, kept at room temperature for 12 hours in the dark. The reaction involved mixing 0.2 ml of sample with 2 ml of the ABTS• solution (diluted in ethanol). A_{765} readings were taken at the beginning of the reaction and after six minutes (Synergy, BioTek). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was used to build standard curves at the start and end of the reaction and the results are expressed in Trolox equivalents (μM).

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The ability of the extracts to reduce Fe_3^+ was demonstrated using the FRAP method [182]. In summary, a working solution was freshly prepared by mixing 10 volumes of acetate buffer (300 mM, pH 3.6) (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) with one volume of 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (40 mM dissolved in 40 mM HCl) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and one volume of iron chloride (20 mM in water) (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) and warming to 37°C for 10 minutes before use. Gallic acid (1000 μM) was employed as a standard. 20 μl of the extracts and the standard were dispensed into the wells of a 96-well microplate, followed by the addition of 280 μL of working solution. The mixture was agitated and incubated at 37°C in the dark for 30 minutes. Absorbency readings were taken at 593 nm (Synergy H1, BioTek).

Lipid peroxidation on linoleic acid micelles

Micelles were prepared as follows: 1 g of linoleic acid (ACROS organics from Fisher, Geel, Belgium) was dissolved in 222.72 ml of borate buffer (0.1 M, pH 9, SDS 0.1 M) (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) previously purged with nitrogen. The mixture was incubated at 37°C with agitation for 10 minutes. To assess the appearance of conjugated dienes, 185 μl of 1X PBS was mixed with 2 μl of micelles and 5 μl of samples. 18 μl of an 8 mM solution of 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada) was added to each well just before the start reading on the microplate reader. Readings were taken every 5 minutes over a 5-hour period at 234 nm (Synergy H1, BioTek). Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was used as a positive control in same concentration than the extract.

Lipid peroxidation of mitochondrial membranes

To measure the antioxidant capacity of the extract in a cellular context, THP-1 cells (American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA) were exposed to various extracts (1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hours at concentration of $2-5 \times 10^5$ Cells/ml in 96-wells plate. Subsequently, they were washed twice with phosphate-buffered saline. Next, 100 μl of MitoPerOx at 100 nM (Cayman chemical company, Ann Arbor, USA) was added to the wells, followed by a 30-minutes incubation. The cells were once again washed twice with PBS, and 500 μM hydrogen peroxide (H_2O_2) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was applied to the

cells. One hour after exposure to H₂O₂, the cells were analyzed by flow cytometry (Cytoflex S, Beckman Coulter). The data were analyzed using the Flowjo software (v 10.9, BD Biosciences) and the 520/590 mean fluorescence ratio was calculated.

Cholinesterase inhibition

To assess cholinesterase inhibition, the extracts and standards were diluted to a concentration of 0.125 µg/ml in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5) (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada). The reaction buffer consisted of DTNB at 0.01 M, the enzyme at 100 U/ml in phosphate buffer at 0.1M (75 µl per reaction) (Abcam, Waltham, USA). Seventy-five µl of this mixture were added to wells along with 5 µl of samples and incubated for 5 minutes at room temperature. Subsequently, 20 µl of substrate (acetylthiocholine iodide, 0.01M) (Abcam, Waltham, USA) was added, the plate was mixed, and absorbency readings were taken in a kinetic mode every 2 minutes at 410 nm. Inhibition was calculated using the following formula:

$$I = 100X(1 - \Delta i / \Delta e)$$

where Δi represents the absorbance difference between the two readings in the presence of the sample and Δe is the corresponding difference for the solvent control.

Antibacterial and antifungal capacity

The extracts were tested in 96-well plates at a concentration of 5 mg/ml in 20 % ethanol. 50 µl of a 0.5 McFarland unit suspension of the microorganisms to be tested (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*) were added. The plate was incubated for 3 hours for bacteria and 6 hours for yeasts. Then, 40 µl of *p*-iodonitrophenyltetrazolium (INT; 2.85 g/L) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) were added to the wells, followed by an incubation of one hour for bacteria and 16 hours for yeasts. The wells displaying a yellow color, indicating growth, were spread on agar plates (PDB, PDA, TSB, and TSA respectively; Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada), and the bactericidal/fungicidal activity was evaluated based on the number of colonies observed.

IL-6 production

THP-1 cells were cultivated in complete RPMI medium (Wisent Inc., St-Bruno, Canada) complemented with 10 % fetal bovine serum (Wisent Inc., St-Bruno, Canada) and 100 I.U./ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) which was refreshed every 2-3 days. The cells were disposed into plates and differentiated into macrophages with 200 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) for 24 hours. After differentiation, PMA was removed and the extracts or control were added for a 24-hour period. The differentiated THP1 were stimulated with *Escherichia coli* 0111: B4 lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) at a concentration of 500 ng/ml for 24 hours. The supernatants were collected to perform an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for interleukine-6 (IL-6) in accordance with the manufacturer's protocol (BD Bioscience, Heidelberg, Germany).

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from THP-1 cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) and subjected to reverse transcription with M-MLV reverse transcriptase (NEB, Whitby, Ontario) following the manufacturer's instructions. The relative mRNA expression levels were quantified using the Luna Universal

qPCR kit (NEB, Whitby, Ontario). All samples were analyzed in triplicate and normalized using β -actin as the reference gene. The list of primer sequences is available in Table 3.

Table 3. Primers used for the qRT-PCR. *HO1*: Heme oxygenase 1, *NQO1*: NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, *COX-2*: cyclooxygenase 2, *iNOS*: inducible oxide nitric synthase

Gene	Primer sequences	
<i>HO1</i>	Forward	TCTTGGCTGGCTTCCTTAC
	Reverse	CATAGGCTCCTTCCTCCTTTC
<i>NQO1</i>	Forward	GGGATGAGACACCACTGTATTT
	Reverse	TCTCCTCATCCTGTACCTCTTT
<i>COX-2</i>	Forward	TACTGGAAGCCAAGCACTTT
	Reverse	GGACAGCCCTTCACGTTATT
<i>iNOS</i>	Forward	GTCAGAGTCACCATCCTCTTTG
	Reverse	GCAGCTCAGCCTGTACTTATC

Cell viability

To determine the optimal concentration of each extract and of the treatments (PMA, LPS and H_2O_2), THP-1 cell viability was assessed using the Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche, Mississauga, Canada). MTT assay readings were performed at 575nm using the plate reader (Synergy H1, Biotech).

2.3.4 Results

Total polyphenol content and antioxidant capacity

Polyphenols are specialized plant metabolites that play an essential role in protecting plants from UV radiation and certain diseases [183]. When regularly consumed by humans, they can reduce the risk of developing certain diseases [184]. We analyzed extracts from the roots of plants propagated from the same mother plant and cultivated hydroponically (CH) or in soil (CT). Extractions were performed using water (H_2O), alcohol (EtOH), and an acid-base protocol (AB). The quantity of phenolic compounds present in the six extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method and is illustrated in Figure 2.A. It can be observed that, for both cultivation methods, ethanol extractions contain a higher concentration of polyphenols, followed by water then AB extractions. Extracts from soil-cultivated plants have slightly higher concentrations of phenolic compounds (54 % for alcohol extraction, 30 % for water extraction, and 35 % for acid-base extraction).

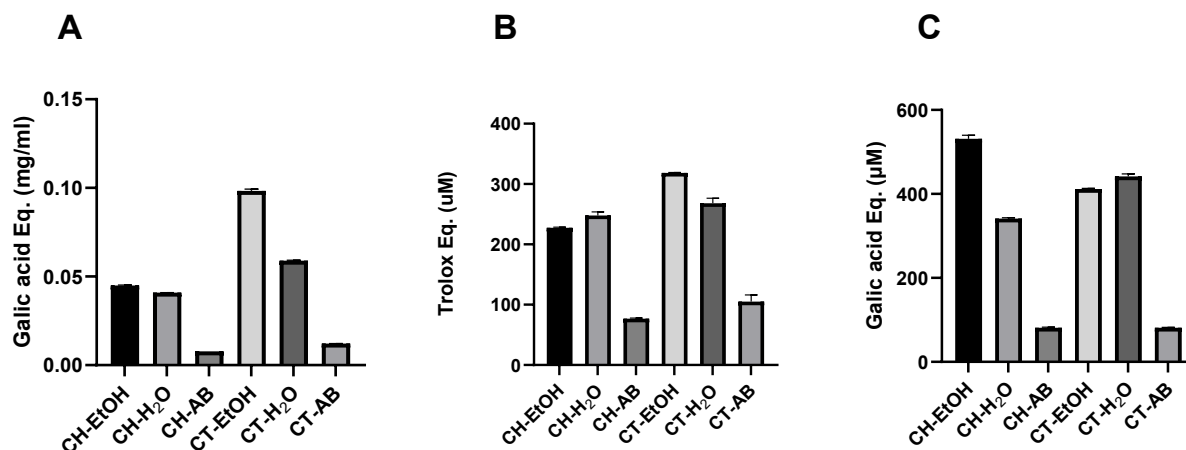


Figure 2. Polyphenolic composition and antioxidant capacity of *Cannabis* root extracts:

A- Total phenolic compounds concentration in *Cannabis* root extracts, expressed in milligrams of gallic acid equivalent per millilitre (mg/ml). Results are presented as the mean \pm SEM (n=3).

B-Antioxidant capacity provided by different *Cannabis* root extracts through ABTS radical neutralization. Results are presented as the mean \pm SEM (n=3). The y-axis represents the difference in Trolox equivalent (μM) between the reading at time 0 and after 6 minutes of reaction.

C -ferrous ion-reducing capacity of different extracts represented in gallic acid equivalent. Results are presented as the mean \pm SEM (n=3) (CH=hydroponic culture, CT=soil culture, EtOH=Ethanol extraction, H₂O=Water extraction, AB= acid-base extraction).

The antioxidant capacity of the extracts can be measured by ABTS radical neutralization, calculated in Trolox equivalent (μM). The CT-EtOH and CH-H₂O extracts showed the highest neutralization capacity, while the acid-base extracts were the least effective, which correlates with their total polyphenol profiles (Figure 2.B). No significant neutralization capacity was observed in the solvent-only controls.

The antioxidant capacity was also measured through the ferrous ion-reducing capacity of the extracts, calculated in gallic acid equivalent (μM) and represented in Figure 2C. It is interesting to note that the pattern observed is similar to the ABTS test, with a strong antioxidant capacity for CT-EtOH and CT-H₂O compared to the acid-base extraction. Thus, the presence of phenolic compounds in the extracts appears to play a key role in antioxidant capacity, although other factors may also contribute.

Next, we assessed the membrane protection provided by the various extracts using linoleic acid micelles. When added to these micelles, the oxidant AAPH initiates a chain reaction of lipid peroxidation that can be tracked by the appearance of conjugated diene systems which have an absorbance maximum at 234 nm. Protection against lipoperoxidation, or the reduction in the formation of conjugated diene systems, is a correlate of the antioxidant capacity of the extracts. The AB extracts did not prevent lipid peroxidation, while the EtOH extracts were the most inhibitory and the H₂O extracts showed intermediate activity (Figure 3A-B) for both hydroponic and soil cultivation. Most extracts, as well as the ascorbic acid control, lost their effectiveness over time. In contrast, the CT-EtOH extract maintained a relatively stable protection after 5 hours, with a 60% inhibition. The observed reaction kinetics differences between the extracts and ascorbic acid suggest they act through different molecular antioxidant mechanisms. As was observed with the two previous antioxidant assays, the profile of lipid peroxidation inhibition of the extracts corresponds to their polyphenol profiles.

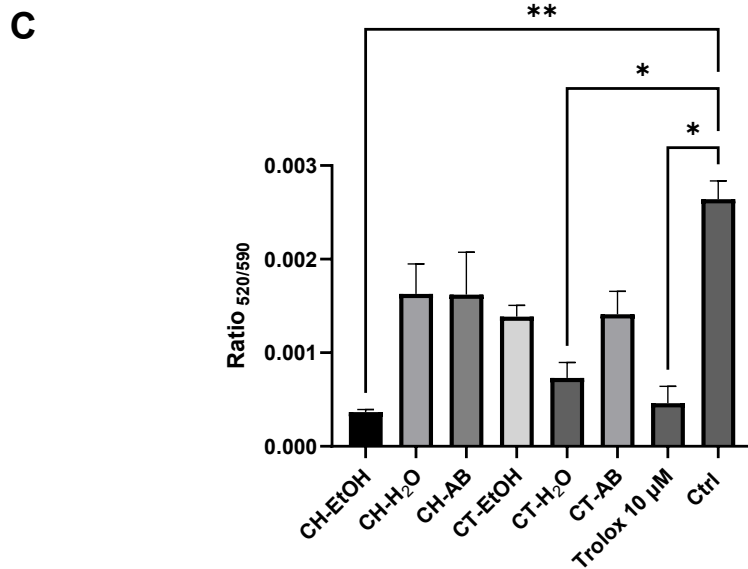
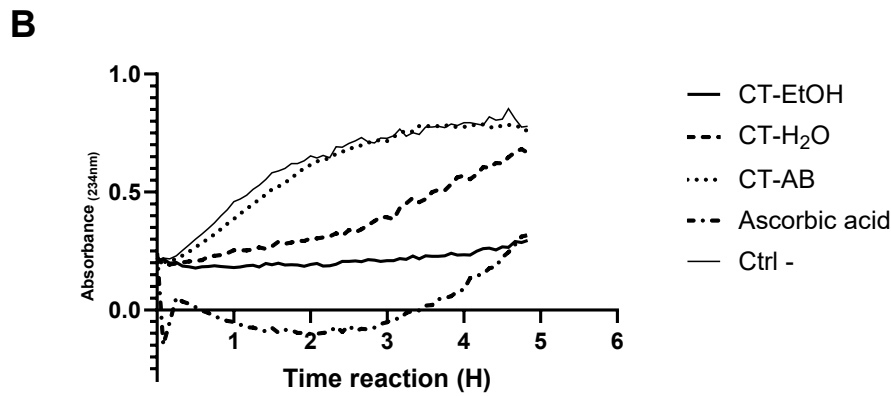
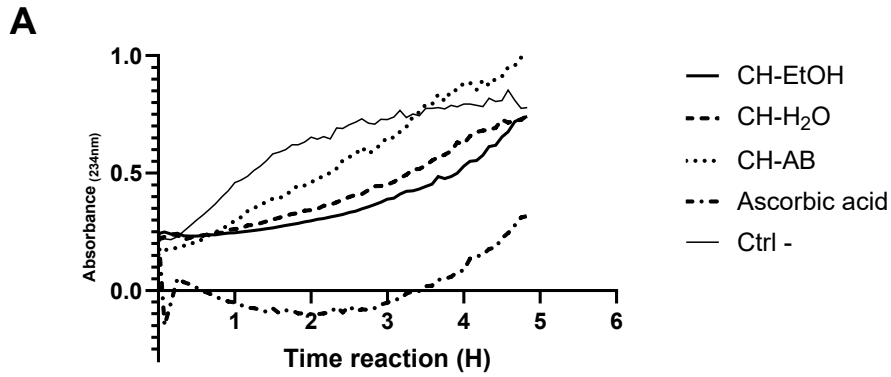


Figure 3 A-B: Monitoring of the formation of conjugated diene systems induced by AAPH in the presence or absence of Cannabis root extracts (30 µg/ml). OD_{234nm} measurements were taken every 5 minutes for a 5-hour period. (n=3)

Figure 3C: Difference in the absorbance ratio (520/590) of the MitoPerOx probe on THP-1 cells subjected to oxidative stress. All extracts were used at a concentration of 1,25 µg/mL, n=10,000 (CH=hydroponic culture, CT=soil culture, EtOH=Ethanol extraction, H₂O=Water extraction, AB= acid-base extraction). The P value was calculated by one-way ANOVA with control *p< 0.05 ** p< 0.01.

Protection against in-cell oxidative stress was measured using the MitoPerOx probe fluorescence before and after the treatment of THP1 cells with hydrogen peroxide in the presence or absence of the extracts. This probe specifically binds to the mitochondrial membrane and emits maximum fluorescence at 520 nm. When the membrane is damaged, the emission maximum is shifted to 590 nm. An increase in the 520/590 nm ratio indicates mitochondrial lipid peroxidation. As expected, the AB extracts from both hydroponic and soil-cultivated plants had non-significant antioxidant effect, as did CH-H₂O and CT-EtOH, while CH-EtOH and CT-H₂O extracts significantly reduced the impact of oxidative stress on mitochondrial membranes by 86 % and 72 % respectively relative to the solvent control (Ctrl) (Figure 3C). Interestingly, the CH-EtOH extract offered slightly superior protection when compared to the Trolox control (10 μM).

Overall, a notable antioxidant activity is observed in aqueous and ethanolic extracts from both soil and hydroponic cultivated plants, whereas the acid-base extracts appeared to have little or no effect in this regard. For the TPC, ABTS, and lipid peroxidation tests, soil extracts proved to be more potent, while for the FRAP test, hydroponic extracts exhibited higher activities. It's also interesting to note that the most promising extracts in the FRAP test (CH-EtOH and CT-H₂O) are the same ones that provide significant protection to mitochondria, as indicated by the results obtained with the MitoPerOx probe.

Cholinesterase inhibitory activity

Cannabis roots contain poorly characterized alkaloids, such as cannabistatine and anhydrocannabistatine [63] Galantamine, an alkaloid primarily isolated from plants of the Amaryllidaceae family [185], is used to slow the progression of Alzheimer's disease through the inhibition of cholinesterase's. [186]. In an attempt to diversify the pharmacological portfolio, we assessed this activity in the various extracts.

Potential cholinesterase inhibition of *Cannabis* root extracts was evaluated using the catalytic reaction of acetylthiocholine iodide by the enzyme's (acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase) and galantamine was used as a positive control. For the butyrylcholinesterase, it was observed that all the extracts exhibited a moderate inhibitory activity (between 8 and 20%), similar to that of galantamine, and extracts from soil cultivation appeared to be more inhibitory than those from hydroponic cultivation (Figure 4). Regarding the acetylcholinesterase inhibition, the effect of five out of the six extracts was significantly stronger (between 45 and 85 %) and higher than that of the positive control (Figure 4). These results suggest that molecules with anticholinesterase effects are indeed present in the extracts, but in varying proportions and with different affinities for the two enzymes tested. While cholinesterase inhibition does not address the underlying cause of Alzheimer's disease, it is a recognized therapeutic for slowing the progression of the disease's symptoms[187]. Given the ever-increasing Alzheimer's disease burden and the observed greater inhibitory activity in our extracts than from a known therapeutic, it will be important to identify the candidate molecules responsible for this effect.

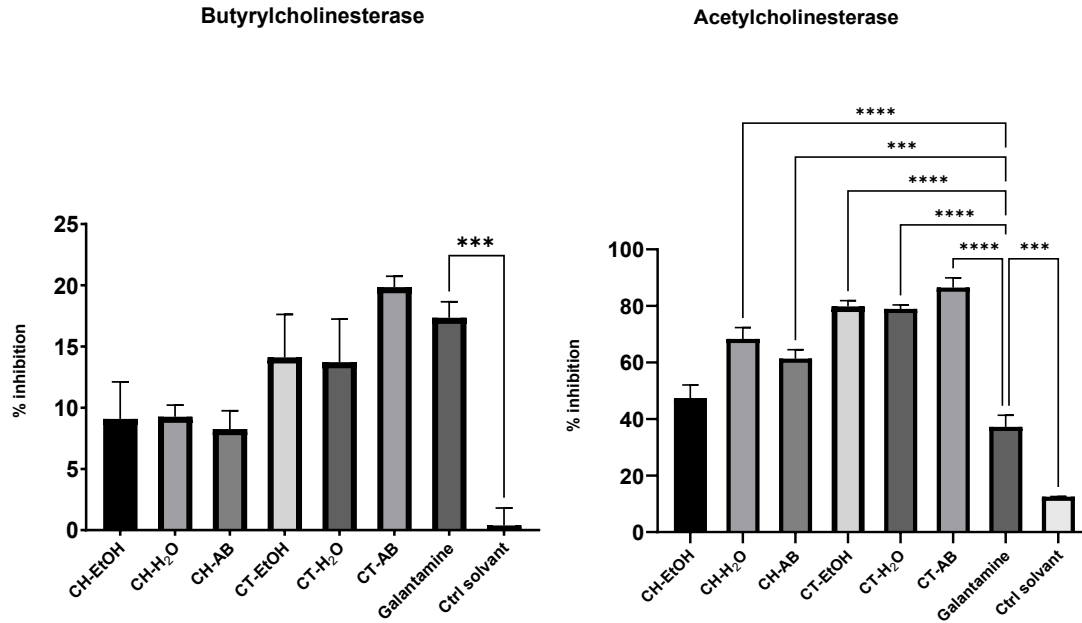


Figure 4: Inhibition of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by Cannabis root extracts at a concentration of 0,125µg/mL Results are presented as the mean ± SEM (n=3). The P value was calculated by one-way ANOVA with control *p< 0.05 ** p< 0.01 ***p<0.001 ****p< 0.0001 (CH=hydroponic culture, CT=soil culture, EtOH=Ethanol extraction, H₂O=Water extraction, AB= acid-base extraction).

Antimicrobial activity

Antimicrobial activity was assessed using p-iodonitrophenyltetrazolium (INT) colorimetric reduction by living microorganisms. Briefly, extracts' dilutions were incubated with precultured microorganisms for a defined period. INT was added to the mix and wells that did not display a color change were spread on agar to distinguish between inhibition or bactericidal/fungicidal action. Growth results were correlated with extract concentrations and inhibitory extract concentrations were determined when no color change was observed but growth on agar was noted. Likewise, bactericidal/fungicidal concentrations were determined when no color change was observed and no growth was seen on agar. The results obtained are presented in Table 4.

Table 4. Results of the antimicrobial activity of Cannabis root extracts

Extracts/control (%)		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
Control	QAC	0,000351	0,00079	≥0,000104	0,000351	≥0,000104	0,00016
	EtOH 20%	> Eq.0,3	> Eq.0,3	> Eq.0,3	> Eq.0,3	Eq.0,133	> Eq.0,3
Extracts	CH-EtOH	-	-	-	-	++	+
	CH-H ₂ O	-	-	+	+/-	++	+
	CH-AB	-	-	++	+	++	+
	CT-EtOH	-	-	+/-	-	+++	++
	CT-H ₂ O	-	-	+/-	+/-	++++	+/-
	CT-AB	-	-	+	+	+++++	+/-

All extracts were tested in triplicates at various concentrations ranging from 0,3 % to 0,012 %

- : >0,3 %

+/- : 0,3 %

+ : 0,133 %

++ : 0,089 %

+++ : 0,026 %

++++ : 0,018 %

+++++ : 0,012 %

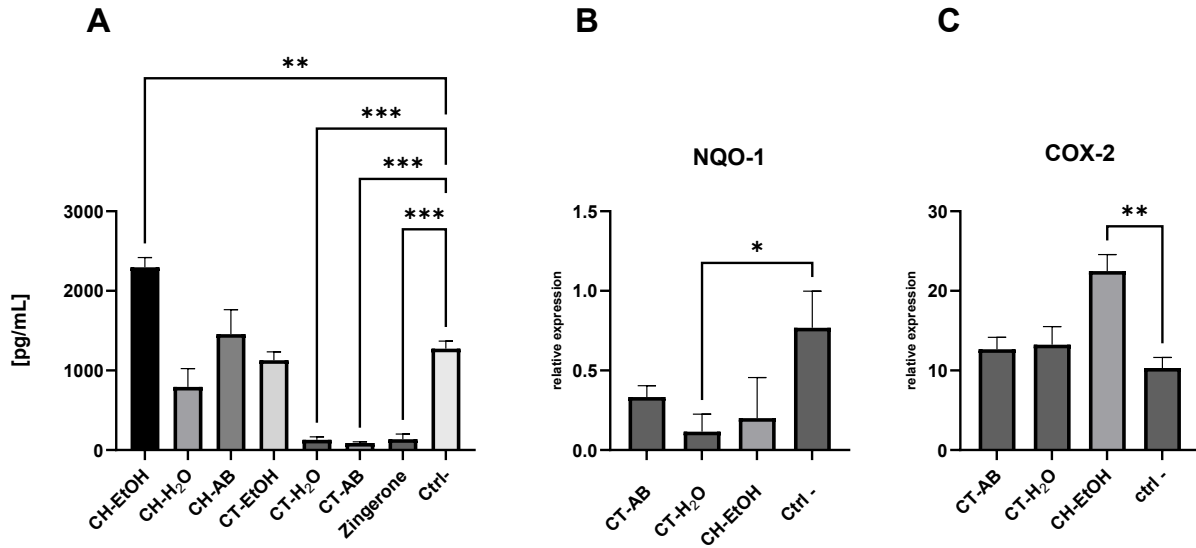
(CH=hydroponic culture, CT=soil culture, EtOH=Ethanol extraction, H₂O=Water extraction, AB= acid-base extraction), MIC : Minimum inhibitory concentration; MBC : Minimum bactericidal concentration; MFC : Minimum fungicidal concentration; QAC : quaternary ammonium compound

The extracts showed no metabolic activity modulation of the Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, in contrast to the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, for which inhibitory action began at a concentration of 0.089 % of the AB extraction from hydroponically grown roots (Table 4). A bactericidal action against *S. aureus* was evident at a concentration of 0.133 % with both AB extracts. The greatest effect of the extracts was observed against *Candida albicans*. Indeed, all extracts inhibited its growth at concentrations ranging from 0.089 % to 0.012 %, while fungicidal action occurred at 0.089 % for CT-EtOH, and at 0.133 or 0.3 % for the other extracts. These results indicate that our cannabis extracts exhibit antimicrobial effects but with varying responses depending on the microorganism.

Anti-inflammatory effect

Finally, the anti-inflammatory effect of the extracts was evaluated by measuring IL-6 after LPS activation of differentiated THP-1 cells. The concentration of IL-6 detected in the supernatant of cells treated with CT-AB and CT-H₂O is significantly reduced compared to the control (Figure 5A). In contrast, extracts from hydroponic culture did not seem to have an anti-inflammatory effect, the CH-EtOH extract even showed a significant pro-inflammatory effect under the experimental conditions used. To ensure that the applied treatments did not compromise the cell metabolic activity, we performed an MTT viability assay (S3)

One of the pathways that can be activated to modulate the inflammatory response of THP-1 cells is dependent on the Nrf2 transcription factor. Through the regulation of cytoprotective gene expression, this pathway is the primary inducible defence against oxidative stress [188]. Its activation leads to the translocation of Nrf2 into the nucleus, where it modulates the expression of certain genes, including NAD(P)H quinone dehydrogenase (*NQO1*), cyclooxygenase 2 (*COX-2*), heme oxygenase (*HO1*), and inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) [189]. RNA extraction followed by qRT-PCR to measure the modulation of Nrf2-dependent gene expression was performed on the samples with a modulated expression of IL-6 (CT-AB, CT-H₂O, and CH-EtOH).



: Anti-inflammatory activities of *Cannabis* root extracts.

Figure 5A IL-6 concentrations in LPS activated differentiated THP1 supernatants measured by ELISA after treatment with. Results are presented as mean \pm SEM (n=3)

Figure 5 B-C: Relative expression of Nrf2 modulated genes in LPS activated differentiated THP-1 cells after exposure to. Results are presented as mean \pm SEM (n=6). The reference gene used to calculate relative expression is β -actin.

(CH=hydroponic culture, CT=soil culture, EtOH=Ethanol extraction, H₂O=Water extraction, AB= acid-base extraction). The P value was calculated by one-way ANOVA with control *p<0.05 ** p<0.01 ***p<0.001 ****p<0.0001.

It is worth noting that only a few significant changes were observable (Figure 5 B-C). The CT-H₂O extract, which reduced IL-6 production, resulted in a decrease in the expression of *NQO-1*, a gene involved in the neutralization of reactive oxygen species. On the other hand, the CH-EtOH extract, which increased IL-6 production, also increased *COX-2* expression, suggesting that its pro-inflammatory effect may occur through an increase in the production of prostaglandin H₂ (PGH₂), a product of COX-2 activity and a precursor to biologically active prostanoids such as various prostaglandins and thromboxane A₂ [190]. No difference in relative expression was detected for *HO-1* and *iNOS* (S4).

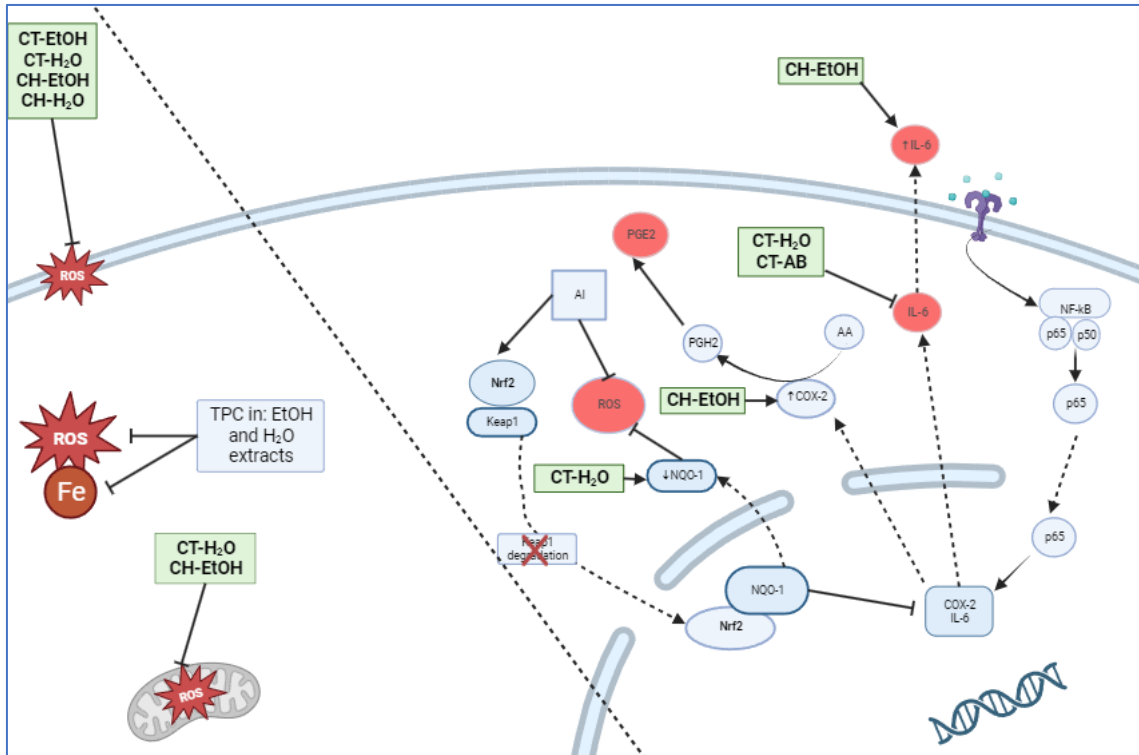


Figure 6: graphical representation of the effects of *Cannabis* root extracts on anti-inflammatory and antioxidant responses of LPS activated immune cells. CT-H₂O and CT-AB reduced the IL-6 concentration, while CH-EtOH increased it. Additionally, CT-H₂O was found to decrease the relative expression of *NQO-1*, while CH-EtOH increased *COX-2* expression. On the cell membrane, the extracts, except AB, inhibited lipid peroxidation, and the total polyphenol composition (TPC) of AB extract exhibited radical-scavenging properties and iron chelation. Furthermore, CT-H₂O and CH-EtOH extracts protected immune cell mitochondria from ROS induced by hydrogen peroxide. (CH=hydroponic culture, CT=soil culture, EtOH=Ethanol extraction, H₂O=Water extraction, AB= acid-base extraction).

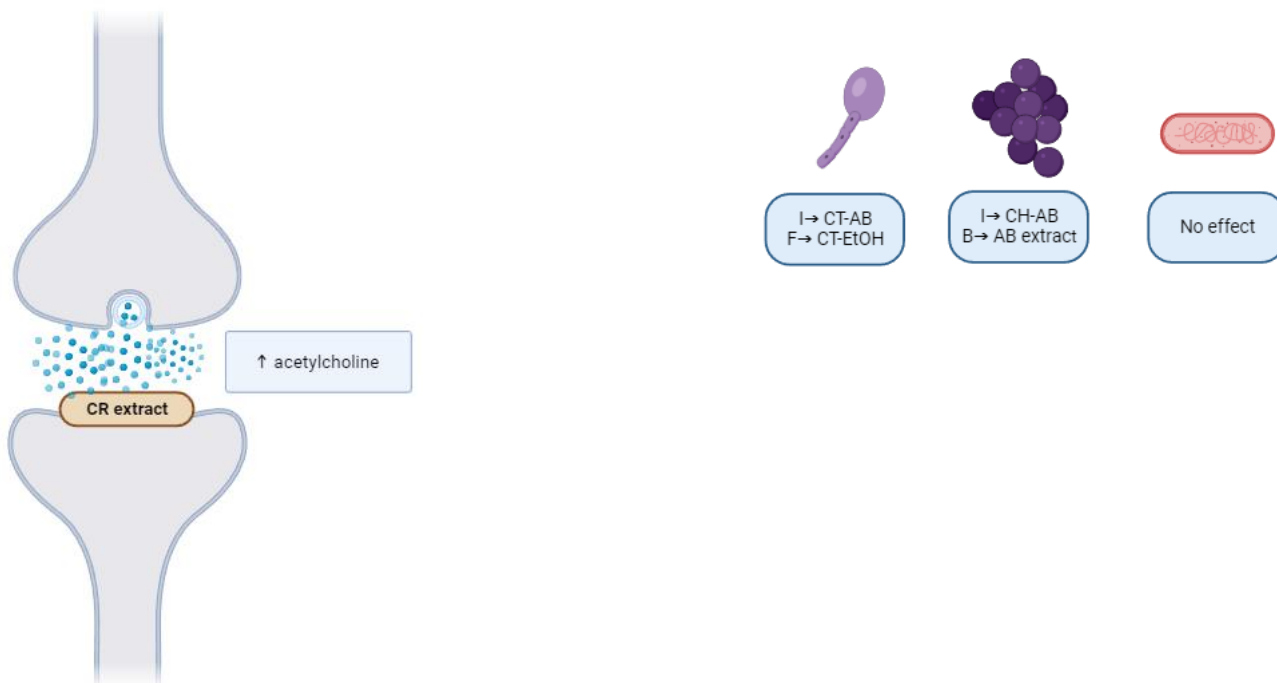


Figure 7: Graphical representation of the effects of *Cannabis* root extracts on biological activity and antimicrobial capacity. *Cannabis* root extracts inhibit cholinesterase enzymes, which can lead to an increase in the neurotransmitter acetylcholine in synapses. Additionally, these extracts exhibit antimicrobial effects, with CT-AB inhibiting *C. albicans*, CT-EtOH destroying it, CH-AB inhibiting *S. aureus*, and AB extracts destroying it, while none of the extracts had an effect on the metabolic activity of *E. coli*. (CH=hydroponic culture, CT=soil culture, EtOH=Ethanol extraction, H₂O=Water extraction, AB= acid-base extraction).

2.3.5 Discussion

To help with the valorisation of *Cannabis* culture waste, we wondered if they could have therapeutic properties. Extracts from *Cannabis* roots have demonstrated significant antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activity, as well as cholinesterase enzyme inhibitory activity, with varying degrees depending on the cultivation and extraction methods.

In healthy cells, reactive oxygen species (ROS) levels are finely controlled to maintain cellular homeostasis. The main targets of this oxidative stress are lipids, proteins, as well as DNA and RNA, thereby increasing the risks of mutagenesis [191]. An imbalance between ROS production and elimination can lead to chronic inflammation, which is implicated in many chronic diseases.

Ethanol and water extracts exhibited a strong antioxidant capacity in three different assays (ABTS radical neutralization test, metal chelation test with the FRAP test, and protection against lipid peroxidation on linoleic acid micelles), and with both solvents the extracts from soil-grown roots outperformed those from hydroponically grown roots. Soil may represent a more hostile environment, eliciting roots to produce more antioxidants to protect themselves from oxidative stress. It is difficult to compare the values obtained with those from other studies, as these tests are not standardized, but it is not the first time that *Cannabis* roots have demonstrated an antioxidant effect [192]. The total polyphenols amount detected in the roots partly explains this capacity, but other families of molecules may also contribute. Indeed, compounds such

as fucosterol and γ -sitosterol have been identified in *Cannabis* roots and are known for their antioxidant capabilities [75, 103-107]. Furthermore, it is interesting to note that the loss of efficiency of lipid peroxidation inhibition by ascorbic acid over time is not observed for *Cannabis* root extracts. On the contrary, the CT-EtOH extract stably protected the micelles even after 5 hours of reaction. This stability could be due to the complexity of the molecular mixture, where different molecules can act at different stages of the lipid peroxidation process, thereby reducing its intensity.

Using the MitoPerOx probe, we were able to demonstrate that the CH-EtOH and CT-H₂O extracts had a protective effect on the mitochondrial membranes of THP-1 cells against oxidative stress in vivo, whereas the other extracts were not significantly different from the negative control. Interestingly, the most effective extracts differed between the in vivo and in vitro oxidation assays, as the CH-EtOH and CT-H₂O only showed intermediate effectiveness on micelles peroxidation prevention while the CT-EtOH extract had the stronger effect. These observations suggest that one or more lipid protective molecules present in the CT-EtOH extract may not have the ability to penetrate inside the cell to directly protect the mitochondria. It is also possible that they interact with other cellular components before they can influence the mitochondria. While this consideration goes beyond the scope of our study, it would be of significant interest to identify and isolate the molecules primarily responsible for this effect and to analyse the interactions with various compounds already identified in roots. This approach would possibly allow mitigation of pathologies associated with mitochondrial dysfunction, such as Alzheimer's disease [193].

In vivo, an inflammatory state is characterised by the presence of pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha and interleukin-6 (IL-6). Therefore, it is interesting to observe a reduction in IL-6 production by THP-1 cells in response to two extracts, CT-H₂O and CT-AB, which do not appear to act through the Nrf2 signalling pathway to the nucleus. These results are consistent with the study of Lima, K.S.B. and al [56], where an aqueous extract from *Cannabis* roots demonstrated an anti-inflammatory effect in mouse inflammation models. This study suggests that the observed anti-inflammatory effect was related to a reduction in vascular extravasation and inflammatory cells migration. Another study, conducted by Menezes, P.M.N. et al [57], demonstrated an anti-inflammatory effect in mouse lungs, with a reduction in the total number of leukocytes in bronchoalveolar fluids following treatment with an aqueous extract. This reduction is also likely related to a decrease in vascular extravasation. Overall, the results of this study

Many compounds found in *Cannabis* roots have antimicrobial activities. For example, the presence of β -amyryn has been reported [194] and this compound is known to induce apoptosis in *C. albicans* by deregulating mitochondrial calcium [76]. B-sitosterol, also identified in *Cannabis* roots [194], displays antimicrobial activity against *S. aureus* [195]. To the best of our knowledge, no previous study has evaluated the antimicrobial action of whole *Cannabis* root extracts, even less so testing different extraction methods. The antimicrobial assays conducted in this study did not reveal any significant effect against *E. coli* for any of the extracts and at the tested concentrations. However, we observed an intermediate effect on *S. aureus*, and a pronounced effect on *C. albicans*. It would be interesting to study the effect of our different extracts on parasites as one of the therapeutic use of Cannabis roots reported in the literature targets horse intestinal parasites [48].

Some plant-derived alkaloids are currently used as treatments for various medical conditions, including Alzheimer's disease and cancer [196]. The therapeutic target in Alzheimer's disease are cholinesterase enzymes. We thus wanted to assess the effect of our extracts on the cholinesterase activity Two *Cannabis* specific alkaloids, cannabistatine and anhydrocannabistatine, have been identified but have not yet been

characterized from a biological perspective [63], and many more are uncharacterized. Therefore, it would be desirable to identify the molecules responsible for this effect and to determine their potential as therapeutic agents, such as their capacity to cross the blood-brain barrier.

Interestingly, the results of this study point to significant differences in the biological activities of our *Cannabis* roots extracts depending on the cultivation type. Soil-based extracts exhibited a better antioxidant capacity in most tests, as well as a more pronounced anti-inflammatory activity, while hydroponic cultivation combined with alcohol extraction appears to have a unique pro-inflammatory effect. Regarding the antimicrobial activity, soil cultivation seems to be more effective against *S. aureus*.

In summary, this research represents the beginning of the exploration of the chemical, biochemical, and biological properties of *Cannabis* roots, a relatively uncharted territory. The results obtained open various potential applications for *Cannabis* roots extracts, offering the opportunity to benefit from this until now wasted plant material. The observed antioxidant effect could find applications in the cosmetic industry, particularly as an anti-aging agent, or in the food industry to prevent product rancidity. The anticholinesterase effect holds promise in the pharmaceutical field, pending the identification and characterization of suitable candidates. Lastly, the antimicrobial effect warrants exploration in different fields such as in agriculture, where it could be used as an additive to fertilizers for protection against phytopathogens, or in the medical domain for the development of new antibiotics, an ongoing concern in the face of rising multidrug-resistant organisms.

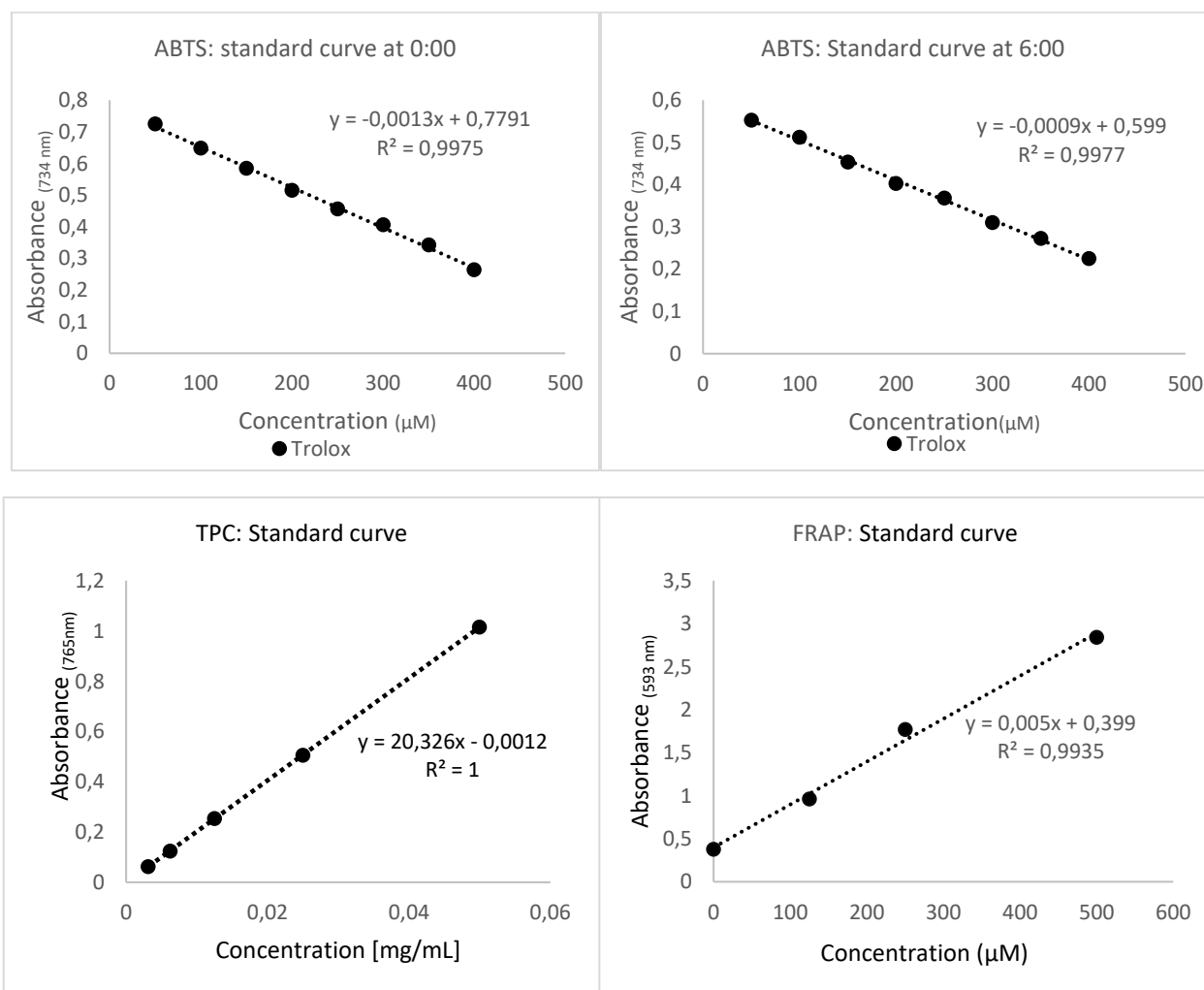
2.3.6 Acknowledgments

I wish to express my sincere gratitude to Natacha Merindol for sharing her invaluable expertise in cell culture, inflammatory processes, and flow cytometry with me. I would also like to thank Innofibre for their contribution and collaboration in the antimicrobial testing, Mitacs for providing financial support for this study and Mélodie B. Plourde for her help with the correction of this article. Finally, a special thanks to my advisors, Prof. Isabel Desgagné-Penix and Dr. Nathalie Boucher, for their constant guidance, insights, and unwavering support throughout this work.

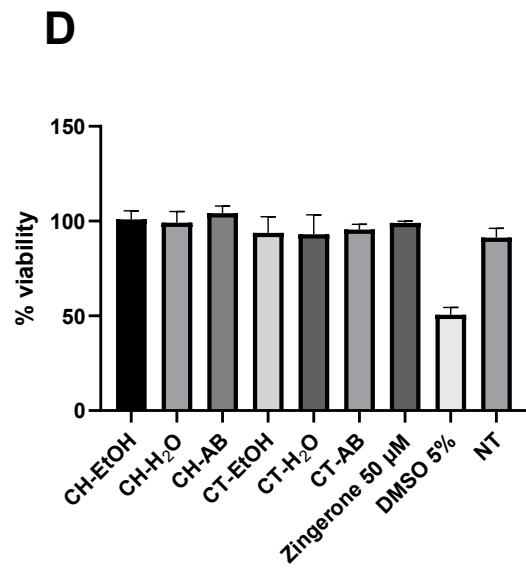
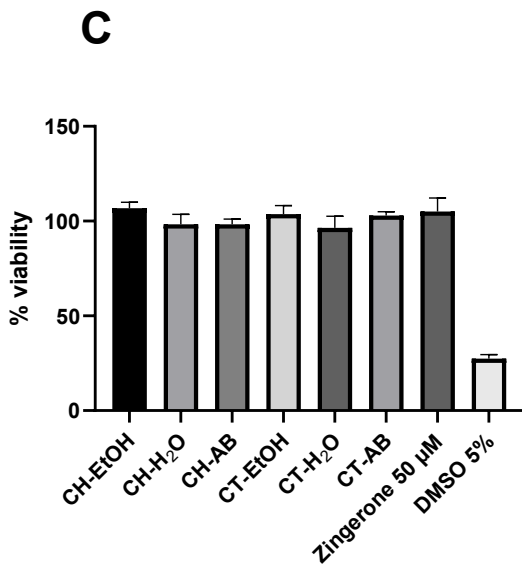
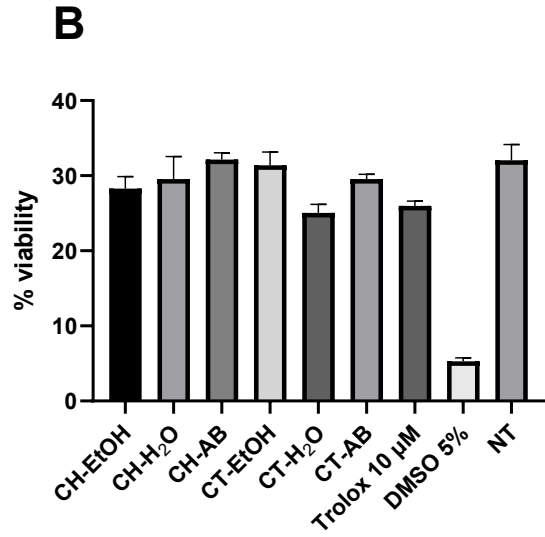
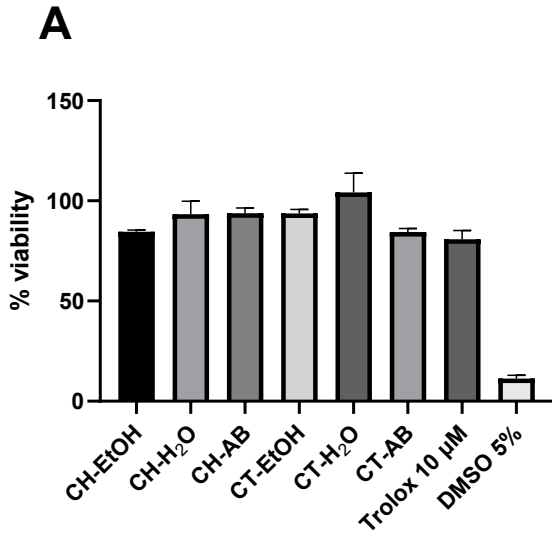
2.3.7 Supplementary materials

<i>Alien Gorilla Glue strain</i>	<i>Extraction method</i>	<i>Yield % (w/w)</i>
<i>Hydroponic</i>	<i>Ethanol</i>	<i>9,2</i>
	<i>Aqueous</i>	<i>3,7</i>
	<i>Acid-Base</i>	<i>3,2</i>
<i>Soil</i>	<i>Ethanol</i>	<i>2,1</i>
	<i>Aqueous</i>	<i>7,1</i>
	<i>Acid-Base</i>	<i>3,3</i>

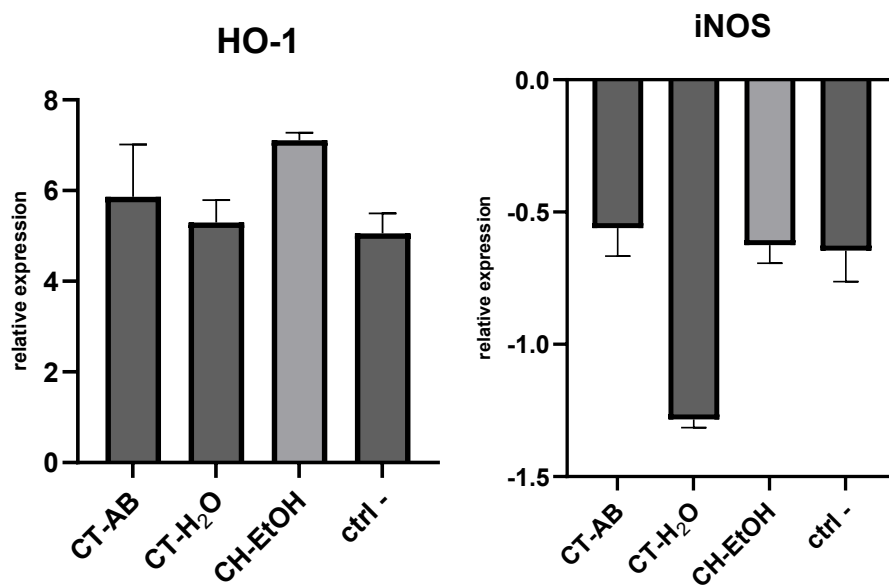
S1: Identification of extracts and yield percentages of different extraction types



S2: Standard curve of the different molecules used to calculate equivalents for antioxidant tests.



S3: Viability of THP-1 cells under different experimental conditions assessed using MTT method. A: suspended cells; B: Suspended cells with a 1-hour treatment with 500 µM hydrogen peroxide; C: Cells differentiated with 200 nM PMA; D: Cells differentiated with 200nm PMA and treated with 500ng/mL for 24 hours. Results are presented as mean ± SEM (n=3).



S4 : Relative expression of *Nrf2* target genes in differentiated THP-1 cells after exposure to the extracts and LPS stimulation. Results are presented as mean \pm SEM (n=6). B-actin was used as the reference gene to calculate relative expression. (CH=hydroponic culture, CT=soil culture, EtOH=Ethanol extraction, H₂O=Water extraction, AB= acid-base extraction) The P value was calculated by one-way ANOVA with control *p< 0.05 ** p< 0.01 ***p<0.001 ****p< 0.0001

2.3.8 Contributions

Conceptualization, V.G., N.B. and I.D.-P.; Writing, revision, and editing, V.G., N.B., N.M. and I.D.-P.; Co-supervision, N.B et N.M; Supervision, I.D.-P. All authors have read and approved the published version of the manuscript.

2.3.9 Références

1. Yang, M.-Q., et al., *Molecular phylogenetics and character evolution of Cannabaceae*. *Taxon*, 2013. **62**(3): p. 473-485.
2. Russo, E.B., et al., *Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia*. *Journal of Experimental Botany*, 2008. **59**(15): p. 4171-4182.
3. Piluzza, G., et al., *Differentiation between fiber and drug types of hemp (Cannabis sativa L.) from a collection of wild and domesticated accessions*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2013. **60**(8): p. 2331-2342.
4. Amin, M.R. and D.W. Ali, *Pharmacology of Medical Cannabis*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1162**: p. 151-165.
5. Tattrie, J., *Légalisation du cannabis au Canada*, in *L'encyclopédie Canadienne*. 2019.
6. Canada, S. *Un instantané des producteurs autorisés de cannabis*, 2016. 2017; Available from: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/daily-quotidien/180426/dq180426b-fra.htm>.
7. Canada, S. *Production de cannabis autorisée, Recensement de l'agriculture, 2021*. 2021; Available from: <https://doi.org/10.25318/3210038401-fra>.
8. Canada, S. *Farm income, 2021*. 2022; Available from: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/daily-quotidien/221128/dq221128b-eng.htm>.
9. Natasha R. Ryz, D.J.R.a.E.B.R., *Cannabis Roots: A traditional therapy with future potential for treating inflammation and pain*. *Cannabis and Cannabinoid research*, 2017. **2.1**.
10. Andre, C.M., J.-F. Hausman, and G. Guerriero, *Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules*. *Frontiers in Plant Science*, 2016. **7**.
11. Christoph Kornpointner, A.S.M., Silvija Marinovic, Christian Haselmair-Gosch, Polona Jamnik, Katharina Schrödes, Christian Löffke and Heidi Halbwirth, *Chemical composition and antioxidant potential of Cannabis sativa L. roots*. 2021.
12. David J. Slatkin, N.J.D., Louis S. Harris, Asaad N. Masoud, Maynard W. Quimby and Paul L. Schiff Jr., *Chemical constituents of Cannabis sativa L. Root*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1971.
13. Gruschow, A., *A comparison of antioxidant potential, Total phenolic content, and Cannabidiol (CBD) content of Cannabis infused Hemp, MCT and olive oils*, in *Nutrition and food studies*. 2020, Montclair state University.
14. Menezes, P.M.N., et al., *Investigation of antinociceptive, antipyretic, antiasthmatic, and spasmolytic activities of Brazilian Cannabis sativa L. roots in rodents*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021. **278**: p. 114259.
15. A.Slosse, F.V.D., N. Samyn, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *Evaluation of data preprocessings for the comparison of GC-MS chemical profiles of seized cannabis samples*. *Forensic science international*, 2020.
16. Lima, K.S.B., et al., *Cannabis roots: Pharmacological and toxicological studies in mice*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021. **271**: p. 113868.
17. Dimopoulos, G., M.H. Kollef, and J. Cohen, *In 2035, will all bacteria be multiresistant? Yes*. *Intensive Care Medicine*, 2016. **42**(12): p. 2014-2016.
18. de Andrade, J.P., et al., *Crinine-type alkaloids from Hippeastrum aulicum and H. calypttratum*. *Phytochemistry*, 2014. **103**: p. 188-195.
19. Hinneburg, I., H.D. Dorman, and R. Hiltunen, *Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices*. *Food chemistry*, 2006. **97**(1): p. 122-129.
20. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free radical biology and medicine*, 1999. **26**(9-10): p. 1231-1237.

21. Bolanos de la Torre, A.A.S., et al., *A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey*. Food Chemistry, 2015. **174**: p. 119-123.
22. Scalbert, A., et al., *Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005. **45**(4): p. 287-306.
23. Arts, I.C. and P.C. Hollman, *Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 317s-325s.
24. Sharma, K., *Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review)*. Mol Med Rep, 2019. **20**(2): p. 1479-1487.
25. Harvey, A.L., *The pharmacology of galanthamine and its analogues*. Pharmacol Ther, 1995. **68**(1): p. 113-28.
26. Turner, C.E., et al., *Isolation of cannabistatine, an alkaloid, from Cannabis sativa L. root*. J Pharm Sci, 1976. **65**(7): p. 1084-5.
27. Canada, S.A.d. *Les médicaments approuvés pour traiter la maladie d'Alzheimer au Canada*. 2023 16 mai 2023; Available from: <https://alzheimer.ca/fr/au-sujet-des-troubles-neurocognitifs/comment-traiter-les-troubles-neurocognitifs/les-medicaments>.
28. Baird, L. and M. Yamamoto, *The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway*. Mol Cell Biol, 2020. **40**(13).
29. Saha, S., et al., *An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation*. Molecules, 2020. **25**(22): p. 5474.
30. Olszowski, T., et al., *The effect of cadmium on COX-1 and COX-2 gene, protein expression, and enzymatic activity in THP-1 macrophages*. Biological trace element research, 2015. **165**: p. 135-144.
31. Judžientienė, A., R. Garjonytė, and J. Būdienė, *Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Various Extracts of Fibre Hemp (Cannabis sativa L.) Cultivated in Lithuania*. Molecules, 2023. **28**(13).
32. Lee, J.-H., et al., *Fucoesterol, isolated from Ecklonia stolonifera, inhibits adipogenesis through modulation of FoxO1 pathway in 3T3-L1 adipocytes*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2017. **69**(3): p. 325-333.
33. Lee, S., et al., *Anti-oxidant activities of fucoesterol from the marine algae Pelvetia siliquosa*. Archives of Pharmacal Research, 2003. **26**(9): p. 719-722.
34. Javaid, A., I.H. Khan, and M.F. Ferdosi, *BIOACTIVE CONSTITUENTS OF WILD Cannabis sativa ROOTS FROM PAKISTAN*. Pakistan Journal of Weed Science Research, 2021. **27**(3): p. 359.
35. Singh, A., *Sitosterol as an antioxidant in frying oils*. Food Chem, 2013. **137**(1-4): p. 62-7.
36. Gan, S.Y., et al., *Fucoesterol exerts protection against amyloid β -induced neurotoxicity, reduces intracellular levels of amyloid β and enhances the mRNA expression of neuroglobin in amyloid β -induced SH-SY5Y cells*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **121**: p. 207-213.
37. Meinita, M.D.N., et al., *Fucoesterol of Marine Macroalgae: Bioactivity, Safety and Toxicity on Organism*. Mar Drugs, 2021. **19**(10).
38. Li, Y., et al., *Mitochondrial dysfunction in microglia: a novel perspective for pathogenesis of Alzheimer's disease*. J Neuroinflammation, 2022. **19**(1): p. 248.
39. Hussain, T., et al., *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?* Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 7432797.
40. Dan Jin, K.D., Zhen Xie and Jie Chen, *Secondary metabolites profiled in Cannabis inflorescences, leaves, stem barks and roots for medicinal purposes*. scientific reports, 2020.
41. Kwun, M.S., H.J. Lee, and D.G. Lee, *β -amyrin-induced apoptosis in Candida albicans triggered by calcium*. Fungal Biol, 2021. **125**(8): p. 630-636.

42. Pierre Luhata, L. and T. Usuki, *Antibacterial activity of β -sitosterol isolated from the leaves of *Odontonema strictum* (Acanthaceae)*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2021. **48**: p. 128248.
43. Marcandier, *Traité du Chanvre... A Paris, chez Nyon... MDCCLVIII*. 1758: Nyon.
44. Bhambhani, S., K.R. Kondhare, and A.P. Giri, *Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids*. *Molecules*, 2021. **26**(11).

CHAPITRE III

3.1 Discussion

L'utilisation des plantes par l'homme est une pratique courante qui remonte à aussi loin que l'on puisse l'imaginer. Le règne végétal procure nourriture, abris et outils à l'homme, constituant une base essentielle pour la survie. Au fil du temps, certaines espèces végétales ont été jugées si intéressantes qu'elles ont été domestiquées par l'homme. La domestication des végétaux a entraîné une sélection génétique en fonction des usages visés. L'utilisation de plantes à des fins alimentaires a permis à l'homme de découvrir les bienfaits spécifiques qu'une plante spécifique peut avoir sur une pathologie donnée.

Les peuples des premières nations du monde entier ont joué un rôle crucial dans la préservation de ces connaissances. Ces connaissances sont principalement transmises au sein de communautés multigénérationnelles, où la tradition orale est prédominante et où le temps passé ensemble favorise l'apprentissage des usages et la reconnaissance des différentes herbes. Les guérisseurs de ces peuples ont toujours porté une attention particulière à la période de récolte des plantes et à leur préparation, en fonction de l'usage prévu. Certaines plantes seront efficaces si récoltées jeunes, d'autres en fleur, certaines au lever ou au coucher du soleil et certaines nécessiteront la conservation de la racine, tandis que d'autres non. Ces choix dépendent principalement de l'accumulation de métabolites d'intérêt apportant un effet thérapeutique, bien que l'aspect traditionnel de la récolte des plantes médicinales soit également pris en compte.

Le respect de la nature est une valeur fondamentale dans ces cultures. Il est impératif de ne jamais prélever plus que nécessaire, en laissant suffisamment pour les autres et en favorisant la régénération. Ainsi, l'année suivante, on sait exactement où trouver les herbes nécessaires tout en en laissant encore pour les années à venir. Cette approche représente une méthode de culture durable et respectueuse de l'écosystème en place.

La médecine moderne repose largement sur ces connaissances héritées des traditions médicinales anciennes. En effet, de nombreuses molécules utilisées comme médicaments trouvent leur origine dans le règne végétal. Un exemple notable est celui du pavot somnifère (*Papaver somniferum*), une plante traditionnellement utilisée pour soulager les maux de tête, la toux et l'insomnie, qui a été étudiée [197]. L'isolement des composés actifs a permis d'attribuer les effets thérapeutiques à la morphine, identifiée comme le principal composé actif, aux côtés d'autres alcaloïdes tels que la codéine. Ainsi, le règne végétal continue de jouer un rôle central dans la découverte de nouveaux médicaments, bien que, dans certains cas, comme celui de l'insuline, le règne animal ait également contribué à la découverte de nouveaux traitements pour l'homme [198].

Le Cannabis ne fait pas exception, avec la caractérisation des cannabinoïdes qui sont présents en grandes quantités dans ses fleurs. Malgré le fait que *C. sativa L.* soit l'une des plus anciennes plantes domestiquées par l'homme, des lacunes subsistent dans les connaissances modernes en raison de sa période d'illégalité. Idéalement, nous devrions disposer d'autant d'informations sur le cannabis que sur le maïs, ce qui est loin d'être le cas actuellement.

Le moment de la récolte dans le développement de la plante a été mentionné comme un facteur de performance pour certaines utilisations. Dans le cas de notre étude, les racines ont toujours été récoltées d'une plante mature, dont les fleurs ont été récoltées au préalable. Il en a été ainsi afin de mettre en valeur des utilisations possibles des racines de cannabis après la récolte dans les grandes cultures de cannabis, tant médicales que récréatives. La possibilité que les propriétés démontrées lors de cet ouvrage soient différentes si les racines avaient été récoltées en premier, sur des plants en phase végétative ou en plein floraison, est présente.

3.1.1 Perspectives antioxydantes

La consommation d'une quantité suffisante d'antioxydants par l'homme a été démontrée comme étant un facteur contributif à une bonne santé générale. Cette consommation permet de réduire le risque de développer un bon nombre de maladies découlant d'un vieillissement cellulaire prématuré. Également, au niveau des cosmétiques, les antioxydants ont été prouvés efficaces pour l'application cutanée en raison de leurs propriétés anti-âge. On peut observer l'utilisation des antioxydants dans les méthodes de marketing, avec la mention ``source d'antioxydants`` sur certains produits de consommation humaine, tels que les smoothies ou les jus. On en retrouve dans de nombreux produits de consommation, surtout au niveau alimentaire, de façon naturelle. Malheureusement, tous les antioxydants ne conservent pas leurs activités lors de la manutention et jusqu'à la consommation. En effet, les antioxydants peuvent être sensibles à la lumière ou à la température, ce qui peut entraîner une perte de leurs activités avant leur utilisation.

Les extraits racinaires utilisés dans cette étude ont été conservés à -20°C dans une solution d'éthanol à 70% avant d'être testés. Les tests suivants ont été réalisés : détermination du contenu en polyphénols totaux, la capacité de neutralisation du radical ATBS, la capacité de chélation des métaux avec le test de FRAP, la protection des membranes cellulaires avec l'inhibition de la peroxydation lipidique sur des micelles d'acide linoléique et la protection des membranes mitochondriales sur des cellules THP-1 avec la sonde MitoPerOx. Tous ces tests ont été effectués sur les six extraits différents de racines de cannabis.

Les polyphénols sont reconnus comme des molécules ayant la capacité de neutraliser les radicaux libres grâce à leur structure, conférant ainsi un effet antioxydant. Cette étude démontre qu'une grande partie des effets de neutralisation observés provient de la présence de ces molécules. Pour chaque extrait, on observe un motif d'efficacité similaire pour les tests de neutralisation (FRAP et ABTS) que pour le contenu en polyphénols, avec peu ou pas d'effet des extraits acide-base.

De plus, les extraits provenant des racines cultivées en terre sont plus concentrés en polyphénols que ceux cultivés en hydroponie, ce qui les rend encore plus efficaces pour les tests de neutralisation subséquents (ABTS et FRAP). Il est émis comme hypothèse que, en se développant dans un environnement plus hostile, les racines en terre produisent et emmagasinent davantage de composés protecteurs dans leurs cellules. Cependant, ce n'est pas tout l'effet qui leur est attribuable. En effet, une variation dans l'ordre d'efficacité est observable pour les tests de neutralisation, laissant penser que les molécules responsables des effets diffèrent d'un extrait à l'autre, et que différentes familles de molécules démontrent des capacités soit à capter les métaux, soit à neutraliser les radicaux libres.

La simulation de protection contre la peroxydation lipidique sur des micelles d'acide linoléique a mis en avant différents extraits. Les extraits à l'eau et à l'alcool ont démontré une inhibition de la peroxydation lipidique. Il a été intéressant de constater, avec CT-ÉtOH, que la protection reste stable dans le temps jusqu'à 5

heures, tandis que tous les autres, y compris le contrôle d'acide ascorbique, perdent en efficacité avec le temps.

D'un point de vue thérapeutique, ces informations sont pertinentes lorsque l'on connaît certaines racines d'autres espèces qui ont un effet positif sur le métabolisme humain. Par exemple, la racine de réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) est connue pour ces effets, notamment sur le taux d'enzyme hépatique, autant via un mécanisme anti-inflammatoire qu'antioxydant [199].

Dans le cas du cannabis, des recherches plus approfondies doivent être menées avant de pouvoir vérifier la pharmacocinétique des principaux composés qui pourraient éventuellement être identifiés comme des candidats probables. Une analyse métabolomique plus poussée et non ciblée devra être effectuée. Après une recherche bibliographique approfondie, certaines avenues devront être explorées, plus spécifiques que celles que nous avons effectuées ici, telles que des modèles murins transgénique précis.

3.1.2 Perspectives antimicrobiennes

La montée des microorganismes multirésistants est une préoccupation persistante dans le monde de la médecine moderne depuis quelques années. Peu de temps après la découverte des premiers antibiotiques, des résistances sont apparues en raison de la surutilisation de ces molécules et de leur mauvais emploi. Aujourd'hui encore, dans certaines régions du monde, les antibiotiques sont utilisés de manière excessive pour des états ne nécessitant pas ce type de traitement. Les bactéries se propagent aussi rapidement que les personnes, donc même si l'utilisation des antibiotiques est relativement adéquate au Canada, rien n'empêche l'arrivée de nouvelles résistances par avion avec leurs hôtes.

Les dernières années ont été le théâtre de l'arrivée sur le marché d'une nouvelle classe d'antibiotiques de 2^{ème} et 3^{ème} génération. Malgré tout, ces nouveaux médicaments deviennent progressivement moins efficaces. Certains sont même réservés pour être utilisés dans des cas où rien d'autre n'aurait fonctionné, agissant comme des molécules de dernier recours. Toutes les sources de nouveaux traitements dans ce domaine sont exploitables. Nous avons donc testé nos extraits contre trois microorganismes différents afin de déterminer si un effet pouvait être détecté et des candidats identifiés.

L'évaluation de la capacité antibactérienne des extraits de racines de cannabis a été réalisée avec la méthode de l'INT. De cette manière, il était possible de déterminer une concentration à laquelle un effet inhibiteur était observé, et une autre où un effet bactéricide ou fongicide était présent. Les tests ont été entrepris sur trois microorganismes différents : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Cette méthodologie nous a permis d'émettre des hypothèses par rapport au Gram et à la nature du microorganisme.

Aux concentrations testées (0,012% à 0,3%), aucun effet n'a été observé pour *E. coli*, l'organisme sélectionné dans la famille des Gram négatif. Cependant, pour ce qui est de *S. aureus*, le représentant des Gram positif, et *C. albicans*, celui des levures, le tableau est différent. Pour ces derniers, un effet à la fois inhibiteur et bactéricide a pu être observé, avec un effet plus prononcé pour les extraits réalisés selon un protocole acide-base.

Il a déjà été démontré que la β -amyrine, identifiée dans les racines de cannabis[194], dérègle le calcium mitochondrial de *C. albicans* [76], et que le β -sitostérol, également identifié dans les racines de cannabis

[194], a un effet antibactérien contre *S. aureus* [195]. Nous avons ici une partie de l'explication de l'effet. Pour identifier un nouveau candidat, il serait nécessaire de doser chacun des composés dans les extraits et tester en parallèle leur efficacité avec des concentrations égales. De cette façon, si les résultats démontrent une plus grande efficacité des racines, explorer de nouvelles options ou investiguer pour découvrir un effet synergique pourrait apporter une arme supplémentaire à la bataille contre la montée des microorganismes multirésistants.

3.1.3 Perspectives antiinflammatoires

Les troubles inflammatoires entrent dans la catégorie de maladies à pathogénèse complexe et multifactorielle, qui ne sont pas encore comprises à 100%. Uniquement pour les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) en 2023, Crohn et Colite Canada estimaient que 0,8% de la population Canadienne en souffrait [200]. Considérant la diversité des troubles à pathogénèse inflammatoire, on peut imaginer que les avenues de traitement doivent être variées. Les traitements ciblent souvent les symptômes plutôt que la cause, étant donné que ces troubles peuvent être très difficiles à diagnostiquer. De plus, la pathogénèse de plusieurs d'entre eux reste à confirmer. Plusieurs équipes de professionnels en réponses inflammatoires travaillent afin d'apporter des réponses et des solutions pour soulager les patients. Dans cette optique, la découverte d'effets et de modulations des médiateurs inflammatoires est d'actualité et pourrait offrir une alternative plus naturelle aux problèmes humains.

Les tests ont été effectués sur des cellules de type THP-1, un modèle inflammatoire qui a déjà fait ses preuves. Le dosage d'interleukine-6 par les cellules différenciées après une stimulation au LPS nous a permis d'observer une modulation à la baisse de la production par CT-H₂O et CT-AB, ainsi qu'une augmentation par l'extrait CH-EtOH.

Une investigation supplémentaire a été enclenchée pour déterminer si oui ou non l'effet pouvait passer par la voie de Nrf2 en calculant l'expression relative de HO1, NQO1, COX-2 et iNOS. Pour ce faire, une extraction d'ARN suivie d'une qRT-PCR a été effectuée sur les culots cellulaires. Il nous a été permis de démontrer une modification significative de certains effecteurs de cette voie. Pour CT-EtOH, qui a entraîné une augmentation de la production d'IL-6, l'expression relative de COX-2, un gène pro-inflammatoire, s'est retrouvée augmentée. Pour CT-H₂O, on a observé une diminution de l'expression relative de NQO-1, un gène anti-inflammatoire, ce qui nous laisse penser que l'effet sur l'IL-6 est indépendante de l'activation de Nrf2.

3.1.4 Perspective sur l'activité biologique

Les alcaloïdes provenant des plantes ont plusieurs propriétés pharmaceutiques et sont régulièrement synthétisés chimiquement car leur isolement directement du végétal est très coûteux et souvent le rendement est minime. Sur les pathologies humaines, ces alcaloïdes ont des propriétés thérapeutiques et parfois curatives. Entre autres, certains traitements pour le cancer sont des molécules dérivées des alcaloïdes. L'une des cibles thérapeutiques autorisées par Santé Canada pour le traitement de la maladie d'Alzheimer est l'inhibition des cholinestérases. Une molécule sur le marché pour cet usage est la galanthamine. La galanthamine est un alcaloïde dérivé de la famille des Amaryllidacées. Malgré le fait que ce traitement ne soit pas curatif, il peut améliorer la qualité de vie de plusieurs personnes atteintes de la maladie.

Les racines de cannabis sont reconnues pour contenir deux alcaloïdes spécifiques à cette espèce. Ils ont été nommés cannabissativine et anhydrocannabissativine. Bien que leur découverte date déjà de plusieurs années, ils n'ont pas encore réellement été caractérisés, du moins pour leur activité biologique. Le test d'inhibition des cholinestérases nous a permis de voir que cette capacité n'est pas réservée seulement aux alcaloïdes de la famille des amaryllidacées mais est plus étendue. De plus, l'inhibition supérieure à celle apportée par la galanthamine par les extraits de racines de cannabis, plus importante pour les extraits acides bases, démontre la pertinence de continuer à évaluer les activités biologiques possibles. Exploiter un domaine très lucratif, tel que la pharmaceutique, est une très bonne façon de récupérer les racines après la récolte. De cette façon, il est possible de bonifier de manière significative la rentabilité de la culture.

3.2 Conclusion

Il va sans dire que le genre *Cannabis* est plein de potentiel. La législation a retardé le développement de ce potentiel, et nous nous retrouvons, en 2024, avec une panoplie de possibilités d'utilisation à lui attribuer. Les outils technologiques disponibles favoriseront le développement de la biotechnologie l'utilisant, et, avec un peu de temps, modifieront le stéréotype négatif qui lui est associé. Pour apporter une dose de positivité à son utilisation, une production optimale devra en être faite. Ainsi, toutes les parties de la culture devront servir, pour un intérêt environnemental. Les racines en font partie et peuvent représenter une majorité de la biomasse, selon la technique de culture utilisée. Il sera important d'investiguer les composés qui sont présents dans la majorité des racines de cannabis, indépendamment de leur chimotype ou leur protocole de culture. De cette façon, les racines pourront toutes être récupérées après la culture sans coût additionnel pour les producteurs et permettront une uniformité dans le produit proposé.

Non seulement les racines peuvent servir d'un point de vue thérapeutique, même si des preuves des effets bénéfiques sont encore à apporter, mais également d'un point de vue biotechnologique, pour la production de métabolites, et aussi d'un point de vue environnemental, pour leur capacité de captation de métaux lourds dans la phytoremédiation. Depuis sa légalisation à des fins récréatives au Canada en 2018, les surfaces de culture lui étant dédiées ont augmenté. Sa culture arrive à un moment décisif où elle doit être optimisée, avec l'aide de véritables démarches et observations scientifiques, afin de lui procurer la visibilité et l'utilité dont elle est digne. Le moment où des molécules isolées de racines de cannabis apparaîtront sur le marché n'est pas encore arrivé et les recherches ne font que commencer. De plus, les avenues d'utilisation étant nombreuses et les informations peu présentes, les efforts ne sont pas tous dirigés dans la même direction. Ce fut un véritable plaisir pour moi de faire partie du début de la marche vers une culture de cannabis sans déchets.

3.3 Références bibliographiques

1. Ali, S.I., et al., *Medicinal plants: Treasure for antiviral drug discovery*. *Phytother Res*, 2021. **35**(7): p. 3447-3483.
2. Singh, S., et al., *Lead Phytochemicals for Anticancer Drug Development*. *Front Plant Sci*, 2016. **7**: p. 1667.
3. Temirel, M., S.R. Dabbagh, and S. Tasoglu, *Hemp-Based Microfluidics*. *Micromachines (Basel)*, 2021. **12**(2).
4. Morand, C. and F.A. Tomás-Barberán, *Contribution of plant food bioactives in promoting health effects of plant foods: why look at interindividual variability?* *Eur J Nutr*, 2019. **58**(Suppl 2): p. 13-19.
5. Martini, E., *Jacques Cartier witnesses a treatment for scurvy*. *Vesalius*, 2002. **8**(1): p. 2-6.
6. Carpenter, K.J., *The Discovery of Vitamin C*. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2012. **61**(3): p. 259-264.
7. Aubry, P., *Intoxications par les plantes toxiques dans les zones tropicales et inter tropicales*. *Médecine tropicale*. 11p, 2012.
8. Rebole, A., et al., *Mucilage in linseed: effects on the intestinal viscosity and nutrient digestion in broiler chicks*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002. **82**(10): p. 1171-1176.
9. González-Castejón, M., F. Visioli, and A. Rodriguez-Casado, *Diverse biological activities of dandelion*. *Nutrition reviews*, 2012. **70**(9): p. 534-547.
10. Betz, O., et al., *[Is ginger a clinically relevant antiemetic? A systematic review of randomized controlled trials]*. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 2005. **12**(1): p. 14-23.
11. Nile, S.H. and S.W. Park, *Chromatographic analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and xanthine oxidase inhibitory activities of ginger extracts and its reference compounds*. *Industrial Crops and Products*, 2015. **70**: p. 238-244.
12. Zhang, M., et al., *Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer*. *Biomaterials*, 2016. **101**: p. 321-340.
13. Vijendra Kumar, N., et al., *Synthesis and quorum sensing inhibitory activity of key phenolic compounds of ginger and their derivatives*. *Food Chemistry*, 2014. **159**: p. 451-457.
14. Citronberg, J., et al., *Effects of Ginger Supplementation on Cell-Cycle Biomarkers in the Normal-Appearing Colonic Mucosa of Patients at Increased Risk for Colorectal Cancer: Results from a Pilot, Randomized, and Controlled Trial*. *Cancer Prevention Research*, 2013. **6**(4): p. 271-281.
15. Ho, S.-C., K.-S. Chang, and C.-C. Lin, *Anti-neuroinflammatory capacity of fresh ginger is attributed mainly to 10-gingerol*. *Food Chemistry*, 2013. **141**(3): p. 3183-3191.
16. Akinyemi, A.J., et al., *Effect of dietary supplementation of ginger and turmeric rhizomes on angiotensin-1 converting enzyme (ACE) and arginase activities in L-NAME induced hypertensive rats*. *Journal of Functional Foods*, 2015. **17**: p. 792-801.
17. Suk, S., et al., *Gingerenone A, a polyphenol present in ginger, suppresses obesity and adipose tissue inflammation in high-fat diet-fed mice*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017. **61**(10): p. 1700139.
18. Wei, C.-K., et al., *6-Paradol and 6-Shogaol, the Pungent Compounds of Ginger, Promote Glucose Utilization in Adipocytes and Myotubes, and 6-Paradol Reduces Blood Glucose in High-Fat Diet-Fed Mice*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. **18**(1): p. 168.
19. Tattrie, J., *Légalisation du cannabis au Canada*, in *L'encyclopédie Canadienne*. 2019.
20. Yang, M.-Q., et al., *Molecular phylogenetics and character evolution of Cannabaceae*. *Taxon*, 2013. **62**(3): p. 473-485.

21. Russo, E.B., et al., *Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia*. Journal of Experimental Botany, 2008. **59**(15): p. 4171-4182.
22. Piluzza, G., et al., *Differentiation between fiber and drug types of hemp (Cannabis sativa L.) from a collection of wild and domesticated accessions*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2013. **60**(8): p. 2331-2342.
23. Dolan, L., et al., *Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root*. Development, 1993. **119** 1: p. 71-84.
24. Taylor A. Steeves, V.K.S., *Essentials of developmental plant anatomy*. 2017: Oxford University Press.
25. Cole, C. and B. Zurbo, *Industrial hemp—a new crop for NSW*. Primefacts, 2008. **801**: p. 1-6.
26. Islam, M.M., et al., *Microbial consortium inoculant and rock mineral fertiliser differentially improved yield and nutrient uptake of industrial hemp (Cannabis sativa L.) varieties*. Industrial Crops and Products, 2023. **197**: p. 116599.
27. James E. Bidlack, S.H.J., *Plant Biology*. 15TH ed. 2021: McGraw-Hill Education. 509.
28. Chailakhyan, M.K. and V.N. Khryanin, *The role of roots in sex expression in hemp plants*. Planta, 1978. **138**(2): p. 185-187.
29. Andre, C.M., J.-F. Hausman, and G. Guerriero, *Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules*. Frontiers in Plant Science, 2016. **7**.
30. Parsons, J.L., et al., *Polyploidization for the Genetic Improvement of Cannabis sativa*. Front Plant Sci, 2019. **10**: p. 476.
31. Small, E. and A. Cronquist, *A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis*. Taxon, 1976. **25**(4): p. 405-435.
32. McPartland, J.M., *Cannabis systematics at the levels of family, genus, and species*. Cannabis and cannabinoid research, 2018. **3**(1): p. 203-212.
33. Sawler, J., et al., *The Genetic Structure of Marijuana and Hemp*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0133292.
34. Gould, J., *The cannabis crop*. Nature, 2015. **525**(7570): p. S2-3.
35. Reimann-Philipp, U., et al., *Cannabis Chemovar Nomenclature Misrepresents Chemical and Genetic Diversity; Survey of Variations in Chemical Profiles and Genetic Markers in Nevada Medical Cannabis Samples*. Cannabis Cannabinoid Res, 2020. **5**(3): p. 215-230.
36. Hillig, K.W. and P.G. Mahlberg, *A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae)*. American journal of botany, 2004. **91**(6): p. 966-975.
37. Lucas, P., *Cannabis as an Adjunct to or Substitute for Opiates in the Treatment of Chronic Pain*. Journal of Psychoactive Drugs, 2012. **44**(2): p. 125-133.
38. Schaeffer, J., T. Andrysiak, and J.T. Ungerleider, *Cognition and Long-Term Use of Ganja (Cannabis)*. Science, 1981. **213**(4506): p. 465-466.
39. Du Toit, B.M., *Man and cannabis in Africa: a study of diffusion*. African economic history, 1976(1): p. 17-35.
40. Friedman, D. and J.I. Sirven, *Historical perspective on the medical use of cannabis for epilepsy: Ancient times to the 1980s*. Epilepsy & Behavior, 2017. **70**: p. 298-301.
41. Rasmusson, X., *History and policy of clinical cannabis versus medical marijuana: US history and policy*. Journal of Social Science for Policy Implications, 2014. **2**(1): p. 15-30.
42. Fordyce, C., *Pliny: Natural History. Volume VI (Books XX–XXIII). With an English translation by WHS Jones. (Loeb Classical Library.) Pp. xxv+ 532. London: Heinemann, 1951. Cloth, 15s. net*. The Classical Review, 1953. **3**(2): p. 121-122.
43. Sina, A.i., *Al-Qanun fi I-tibb (Canon of Medicine)*. Vol. 2nd book. 1294: Bulaq 502.
44. Grinspoon, L.G., L. Grinspoon, and J.B. Bakalar, *Marihuana, the forbidden medicine*. 1997: Yale University Press.

45. Classen, A., *The Great Herbal of Leonhart Fuchs. De historia stirpium commentarii insignes, 1542.* 2001, JSTOR.
46. Rabelais, F., *Gargantua and Pantagruel*, trans. J. Le Clercq, vol. Book, 1990. 4.
47. Bernard, E.R., *CHINESE MATERIA MEDICA: A REVIEW OF SOME OF THE WORK OF THE LAST DECADE.* Chinese Medical Journal, 1938. **53**(04): p. 353-362.
48. Marcandier, *Traité du Chanvre... A Paris, chez Nyon... MDCCLVIII.* 1758: Nyon.
49. Parkinson, J., *Theatrum botanicum: The theater of plants.* Tho. Cotes.
50. Russo, E.B., *History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet.* Chemistry & biodiversity, 2007. **4**(8): p. 1614-1648.
51. Rodger, J.R., *Cannabis roots.* JAMA, 1971. **217**(12): p. 1705-1706.
52. El Kenz, D. *Les enfants sorciers dans l'Europe d'Ancien Régime.* in *L'enfant.* 2016.
53. Jin, D., et al., *Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes.* Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 3309.
54. Fuchs, 1999.
55. Brunner, T.F., *Marijuana in ancient Greece and Rome? The literary evidence.* Bulletin of the History of Medicine, 1973. **47**(4): p. 344-355.
56. Lima, K.S.B., et al., *Cannabis roots: Pharmacological and toxicological studies in mice.* Journal of Ethnopharmacology, 2021. **271**: p. 113868.
57. Menezes, P.M.N., et al., *Investigation of antinociceptive, antipyretic, antiasthmatic, and spasmolytic activities of Brazilian Cannabis sativa L. roots in rodents.* Journal of Ethnopharmacology, 2021. **278**: p. 114259.
58. Ferrini, F., et al., *Characterization of the Biological Activity of the Ethanolic Extract from the Roots of Cannabis sativa L. Grown in Aeroponics.* Antioxidants, 2022. **11**(5): p. 860.
59. Blasco-Benito, S., et al., *Appraising the "entourage effect": Antitumor action of a pure cannabinoid versus a botanical drug preparation in preclinical models of breast cancer.* Biochem Pharmacol, 2018. **157**: p. 285-293.
60. Livingston, S.J., et al., *Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation.* The Plant Journal, 2020. **101**(1): p. 37-56.
61. Esposito, L.G.A., et al., *Immune Responses Are Differentially Regulated by Root, Stem, Leaf, and Flower Extracts of Female and Male CBD Hemp (Cannabis sativa L.) Plants.* Immuno, 2021. **1**(4): p. 369-379.
62. Kornpointner, C., et al., *Chemical composition and antioxidant potential of Cannabis sativa L. roots.* Industrial Crops and Products, 2021. **165**: p. 113422.
63. Turner, C.E., et al., *Isolation of cannabisativine, an alkaloid, from Cannabis sativa L. root.* J Pharm Sci, 1976. **65**(7): p. 1084-5.
64. Ikuo, Y., et al., *Analysis and pharmacotoxicity of feruloyltyramine as a new constituent and p-coumaroyltyramine in Cannabis sativa L.* Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1991. **40**(3): p. 465-469.
65. Jin, D., et al., *Identification of Chemotypic Markers in Three Chemotype Categories of Cannabis Using Secondary Metabolites Profiled in Inflorescences, Leaves, Stem Bark, and Roots.* Frontiers in Plant Science, 2021. **12**.
66. Li, L., X.P. Chen, and Y.J. Li, *MicroRNA-146a and human disease.* Scandinavian journal of immunology, 2010. **71**(4): p. 227-231.
67. Lee, K.-H., et al., *Globular adiponectin exerts a pro-inflammatory effect via I κ B/NF- κ B pathway activation and anti-inflammatory effect by IRAK-1 downregulation.* Molecules and Cells, 2018. **41**(8): p. 762.
68. Ferrini, F., et al., *Yield, Characterization, and Possible Exploitation of Cannabis Sativa L. Roots Grown under Aeroponics Cultivation.* Molecules, 2021. **26**(16).

69. Oh, C.M., et al., *Identification of p-Coumaric Acid and Ethyl p-Coumarate as the Main Phenolic Components of Hemp (Cannabis sativa L.) Roots*. *Molecules*, 2022. **27**(9): p. 2781.
70. Gul, W., et al., *Detection and Quantification of Cannabinoids in Extracts of Cannabis sativa Roots Using LC-MS/MS*. *Planta Med*, 2018. **84**(4): p. 267-271.
71. Sunil, C., et al., *Friedelin exhibits antidiabetic effect in diabetic rats via modulation of glucose metabolism in liver and muscle*. *J Ethnopharmacol*, 2021. **268**: p. 113659.
72. Chang, W., J. Wang, and Y. Xiao, *Friedelin inhibits the growth and metastasis of human leukemia cells via modulation of MEK/ERK and PI3K/AKT signalling pathways*. *J buon*, 2020. **25**(3): p. 1594-1599.
73. Antonisamy, P., V. Duraipandiyan, and S. Ignacimuthu, *Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from Azima tetraantha Lam. in mouse and rat models*. *J Pharm Pharmacol*, 2011. **63**(8): p. 1070-7.
74. Yang, J., J. Fa, and B. Li, *APOPTOSIS INDUCTION OF EPIFRIEDELINOL ON HUMAN CERVICAL CANCER CELL LINE*. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2017. **14**(4): p. 80-86.
75. Javaid, A., I.H. Khan, and M.F. Ferdosi, *BIOACTIVE CONSTITUENTS OF WILD Cannabis sativa ROOTS FROM PAKISTAN*. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, 2021. **27**(3): p. 359.
76. Kwun, M.S., H.J. Lee, and D.G. Lee, *β -amyryn-induced apoptosis in Candida albicans triggered by calcium*. *Fungal Biol*, 2021. **125**(8): p. 630-636.
77. Viet, T.D., T.D. Xuan, and H. Anh, *α -Amyrin and β -Amyrin Isolated from Celastrus hindsii Leaves and Their Antioxidant, Anti-Xanthine Oxidase, and Anti-Tyrosinase Potentials*. *Molecules*, 2021. **26**(23).
78. de Almeida, P.D., et al., *Anti-Inflammatory Activity of Triterpenes Isolated from Protium paniculatum Oil-Resins*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. **2015**: p. 293768.
79. Ferreira, R.G.S., et al., *Physicochemical Characterization and Biological Activities of the Triterpenic Mixture α,β -Amyrenone*. *Molecules*, 2017. **22**(2): p. 298.
80. Chen, Y. and J. Li, *Glutinol inhibits the proliferation of human ovarian cancer cells via PI3K/AKT signaling pathway*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2021. **20**(7): p. 1331-1335.
81. Gaertner, M., et al., *Analgesic triterpenes from Sebastiania schottiana roots*. *Phytomedicine*, 1999. **6**(1): p. 41-44.
82. Kim, S.K. and F. Karadeniz, *Biological importance and applications of squalene and squalane*. *Adv Food Nutr Res*, 2012. **65**: p. 223-33.
83. Tsanaclis, L., et al., *Testing venous carbohydrate-deficient transferrin or capillary phosphatidylethanol with concurrent ethyl glucuronide and ethyl palmitate hair tests to assess historical and recent alcohol use*. *Drug Test Anal*, 2021. **13**(1): p. 203-207.
84. Saeed, N.M., et al., *Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012. **264**(1): p. 84-93.
85. Ko, G.A. and S. Kim Cho, *Ethyl linoleate inhibits α -MSH-induced melanogenesis through Akt/GSK3 β / β -catenin signal pathway*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018. **22**(1): p. 53-61.
86. Cheng, C.T., et al., *Fatty acid ethyl esters in meconium: A biomarker of fetal alcohol exposure and effect*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021. **246**(4): p. 380-386.
87. Hernández-Díaz, C., et al., *Effects of Oleamide on the Vasomotor Responses in the Rat*. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2020. **5**(1): p. 42-50.
88. Field, C.J., et al., *Human health benefits of vaccenic acid*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2009. **34**(5): p. 979-91.
89. Shigematsu, H., et al., *Purification and characterization of the heat-stable factors essential for the conversion of lignoceric acid to cerebronic acid and glutamic acid: identification of N-acetyl-L-aspartic acid*. *Journal of neurochemistry*, 1983. **40**(3): p. 814-820.

90. Shaaban, M.T., M.F. Ghaly, and S.M. Fahmi, *Antibacterial activities of hexadecanoic acid methyl ester and green-synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria*. J Basic Microbiol, 2021. **61**(6): p. 557-568.
91. Kuratko, C.N. and B.J. Constante, *Linoleic acid and tumor necrosis factor- α increase manganese superoxide dismutase activity in intestinal cells*. Cancer Letters, 1998. **130**(1): p. 191-196.
92. Pauls, S.D., et al., *Anti-inflammatory effects of α -linolenic acid in M1-like macrophages are associated with enhanced production of oxylipins from α -linolenic and linoleic acid*. J Nutr Biochem, 2018. **57**: p. 121-129.
93. Pereira, C.B., et al., *Antifungal activity of eicosanoic acids isolated from the endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii**. Microb Pathog, 2016. **100**: p. 205-212.
94. Bonveh, J.S., M.S. Torrent, and F.V. Coll, *A laboratory study of the bleaching process in stigmasta-3,5-diene concentration in olive oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2001. **78**(3): p. 305-310.
95. Blekas, G. and D. Boskou, *Oxidation of stigmasterol in heated triacylglycerols*. Food Chemistry, 1989. **33**(4): p. 301-310.
96. Choi, J.M., et al., *Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities*. Phytotherapy Research, 2007. **21**(10): p. 954-959.
97. Bae, H., et al., *Disruption of Endoplasmic Reticulum and ROS Production in Human Ovarian Cancer by Campesterol*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(3).
98. Karim, N., et al., *Stigmasterol can be new steroidal drug for neurological disorders: Evidence of the GABAergic mechanism via receptor modulation*. Phytomedicine, 2021. **90**: p. 153646.
99. Bresson, J.-L., et al., *Plant Sterols and Blood Cholesterol Scientific substantiation of a health claim related to plant sterols and lower/reduced blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006 Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies*. EFSA J, 2008. **781**: p. 1-12.
100. Ododo, M.M., M.K. Choudhury, and A.H. Dekebo, *Structure elucidation of β -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora**. SpringerPlus, 2016. **5**(1): p. 1210.
101. Paniagua-Pérez, R., et al., *EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY CAPACITY OF BETA-SITOSTEROL IN RODENT ASSAYS*. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2017. **14**(1): p. 123-130.
102. Gershkovich, P., et al., *Inhibition of intestinal absorption of cholesterol by surface-modified nanostructured aluminosilicate compounds*. J Pharm Sci, 2009. **98**(7): p. 2390-400.
103. Lee, S., et al., *Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa**. Archives of Pharmacal Research, 2003. **26**(9): p. 719-722.
104. Lee, J.-H., et al., *Fucosterol, isolated from *Ecklonia stolonifera*, inhibits adipogenesis through modulation of FoxO1 pathway in 3T3-L1 adipocytes*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2017. **69**(3): p. 325-333.
105. Gan, S.Y., et al., *Fucosterol exerts protection against amyloid β -induced neurotoxicity, reduces intracellular levels of amyloid β and enhances the mRNA expression of neuroglobin in amyloid β -induced SH-SY5Y cells*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **121**: p. 207-213.
106. Meinita, M.D.N., et al., *Fucosterol of Marine Macroalgae: Bioactivity, Safety and Toxicity on Organism*. Mar Drugs, 2021. **19**(10).
107. Singh, A., *Sitosterol as an antioxidant in frying oils*. Food Chem, 2013. **137**(1-4): p. 62-7.
108. Shen, H.F., et al., *MiR-361-5p/abca1 and MiR-196-5p/arhgef12 Axis Involved in γ -Sitosterol Inducing Dual Anti-Proliferative Effects on Bronchial Epithelial Cells of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021. **16**: p. 2741-2753.
109. Seo, Y.K., et al., *Effects of p-coumaric acid on erythema and pigmentation of human skin exposed to ultraviolet radiation*. Clinical and Experimental Dermatology, 2011. **36**(3): p. 260-266.

110. Pragasam, S.J., V. Venkatesan, and M. Rasool, *Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effect of p-Coumaric Acid, a Common Dietary Polyphenol on Experimental Inflammation in Rats*. *Inflammation*, 2013. **36**(1): p. 169-176.
111. Filho, A., et al., *Inhibition of neutrophil migration and reduction of oxidative stress by ethyl p-coumarate in acute and chronic inflammatory models*. *Phytomedicine*, 2019. **57**: p. 9-17.
112. Kim, D.H., et al., *2-Methoxy-4-vinylphenol Attenuates Migration of Human Pancreatic Cancer Cells via Blockade of FAK and AKT Signaling*. *Anticancer Res*, 2019. **39**(12): p. 6685-6691.
113. Jeong, J.B., et al., *Anti-inflammatory effect of 2-methoxy-4-vinylphenol via the suppression of NF- κ B and MAPK activation, and acetylation of histone H3*. *Arch Pharm Res*, 2011. **34**(12): p. 2109-16.
114. report, I.s.a. *Human health tier II assessment*. 2020; Available from: <https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/Phenol%2C%20%2C%27-methylenebis%5B6-%281%2C1-dimethylethyl%29-4-methyl-Human%20health%20tier%20II%20assessment.pdf>.
115. Neelam, S., et al., *Interaction studies of coumaroyltyramine with human serum albumin and its biological importance*. *J Phys Chem B*, 2010. **114**(8): p. 3005-12.
116. Kim, D.K. and K. Lee, *Inhibitory effect of Trans-Np-coumaroyl tryamine from the twigs of Celtis chinensis on the acetylcholinesterase*. *Archives of pharmacol research*, 2003. **26**(9): p. 735-738.
117. Mata, R., et al., *Antimycobacterial Compounds from Piper s anctum*. *Journal of Natural Products*, 2004. **67**(12): p. 1961-1968.
118. Efdi, M., et al., *N-trans-feruloyltyramine as a melanin biosynthesis inhibitor*. *Biol Pharm Bull*, 2007. **30**(10): p. 1972-4.
119. Gao, X., et al., *Effects of N-trans-feruloyltyramine isolated from laba garlic on antioxidant, cytotoxic activities and H(2)O(2)-induced oxidative damage in HepG2 and L02 cells*. *Food Chem Toxicol*, 2019. **130**: p. 130-141.
120. Vidal. *Substance active Dronabinol*. 2013; Available from: <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/dronabinol-19917.html#:~:text=Dronabinol%20%3A%20M%C3%A9canisme%20d'action,un%20agoniste%20des%20r%C3%A9cepteurs%20cannabino%C3%AFdes>.
121. Appendino, G., et al., *Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: a structure-activity study*. *J Nat Prod*, 2008. **71**(8): p. 1427-30.
122. Evans, F.J., *Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis*. *Planta Med*, 1991. **57**(7): p. S60-7.
123. McPartland, J. and E. Russo, *Cannabis and Cannabis Extracts: Greater Than the Sum of Their Parts?* *J Cannabis Therapeutics*, 2001. **1**: p. 103-132.
124. Wilkinson, J.D. and E.M. Williamson, *Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis*. *J Dermatol Sci*, 2007. **45**(2): p. 87-92.
125. Cascio, M.G., et al., *Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent alpha2-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT1A receptor antagonist*. *Br J Pharmacol*, 2010. **159**(1): p. 129-41.
126. De Petrocellis, L. and V. Di Marzo, *Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2010. **5**(1): p. 103-21.
127. De Petrocellis, L., et al., *Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes*. *Br J Pharmacol*, 2011. **163**(7): p. 1479-94.
128. Evans, F.J., *Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis*. *Planta Med*, 1991. **57**(7 Suppl): p. S60-7.

129. Eisohly, H.N., et al., *Synthesis and antimicrobial activities of certain cannabichromene and cannabigerol related compounds*. J Pharm Sci, 1982. **71**(12): p. 1319-23.
130. Baek, S.H., et al., *Boron trifluoride etherate on silica-A modified Lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells*. Arch Pharm Res, 1998. **21**(3): p. 353-6.
131. de Lago, E. and J. Fernández-Ruiz, *Cannabinoids and neuroprotection in motor-related disorders*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2007. **6**(6): p. 377-87.
132. Hofmann, M.E. and C.J. Frazier, *Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: potential and challenges for improved therapeutic intervention*. Exp Neurol, 2013. **244**: p. 43-50.
133. Martín-Moreno, A.M., et al., *Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease*. Mol Pharmacol, 2011. **79**(6): p. 964-73.
134. Scuderi, C., et al., *Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders*. Phytother Res, 2009. **23**(5): p. 597-602.
135. Moreno-Sanz, G., *Can You Pass the Acid Test? Critical Review and Novel Therapeutic Perspectives of $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinolic Acid A*. Cannabis Cannabinoid Res, 2016. **1**(1): p. 124-130.
136. Rock, E.M. and L.A. Parker, *Synergy between cannabidiol, cannabidiolic acid, and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the regulation of emesis in the Suncus murinus (house musk shrew)*. Behav Neurosci, 2015. **129**(3): p. 368-70.
137. Russo, E.B., *Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(7): p. 1344-64.
138. Williams, S.J., J.P. Hartley, and J.D. Graham, *Bronchodilator effect of delta1-tetrahydrocannabinol administered by aerosol of asthmatic patients*. Thorax, 1976. **31**(6): p. 720-3.
139. Hampson, A.J., et al., *Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8268-73.
140. Neff, G.W., et al., *Preliminary observation with dronabinol in patients with intractable pruritus secondary to cholestatic liver disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(8): p. 2117-9.
141. Rock, E.M., et al., *Tetrahydrocannabinolic acid reduces nausea-induced conditioned gaping in rats and vomiting in Suncus murinus*. Br J Pharmacol, 2013. **170**(3): p. 641-8.
142. Moldzio, R., et al., *Effects of cannabinoids $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol, $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinolic acid and cannabidiol in MPP+ affected murine mesencephalic cultures*. Phytomedicine, 2012. **19**(8-9): p. 819-24.
143. Abrahamov, A., A. Abrahamov, and R. Mechoulam, *An efficient new cannabinoid antiemetic in pediatric oncology*. Life Sciences, 1995. **56**(23): p. 2097-2102.
144. Semlali, A., et al., *Effects of tetrahydrocannabinols on human oral cancer cell proliferation, apoptosis, autophagy, oxidative stress, and DNA damage*. Archives of Oral Biology, 2021. **129**: p. 105200.
145. DeLong, G.T., et al., *Pharmacological evaluation of the natural constituent of Cannabis sativa, cannabichromene and its modulation by $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol*. Drug Alcohol Depend, 2010. **112**(1-2): p. 126-33.
146. Pertwee, R.G. and M.G. Cascio, *115Known Pharmacological Actions of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and of Four Other Chemical Constituents of Cannabis that Activate Cannabinoid Receptors*, in *Handbook of Cannabis*, R. Pertwee, Editor. 2014, Oxford University Press. p. 0.
147. Ryz, N.R., D.J. Remillard, and E.B. Russo, *Cannabis Roots: A Traditional Therapy with Future Potential for Treating Inflammation and Pain*. Cannabis Cannabinoid Res, 2017. **2**(1): p. 210-216.
148. Sorrentino, G., *Introduction to emerging industrial applications of cannabis (Cannabis sativa L.)*. Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali, 2021. **32**(2): p. 233-243.

149. Roy, A., *Hairy Root Culture an Alternative for Bioactive Compound Production from Medicinal Plants*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2021. **22**(1): p. 136-149.
150. Farag, S. and O. Kayser, *Cannabinoids production by hairy root cultures of Cannabis sativa L.* *American Journal of Plant Sciences*, 2015. **6**(11): p. 1874.
151. Niazian, M., *Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants*. *Planta*, 2019. **249**(4): p. 953-973.
152. Luyckx, M., et al., *Silicon reduces cadmium absorption and increases root-to-shoot translocation without impacting growth in young plants of hemp (Cannabis sativa L.) on a short-term basis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021. **28**(28): p. 37963-37977.
153. Arru, L., et al., *Copper localization in Cannabis sativa L. grown in a copper-rich solution*. *Euphytica*, 2004. **140**(1): p. 33-38.
154. Rockström, J., et al., *Planetary boundaries: exploring the safe operating space for humanity*. *Ecology and society*, 2009. **14**(2).
155. laboratory, g.m. *Global monthly mean CO2*. 2022; Available from: <https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/global.html>.
156. Melosini, M., *La Canapa per Assorbire CO2 Atmosferica*. *DolceVita Magazine*, 2017.
157. Tedeschi, A., et al., *Soil fertilization with urea has little effect on seed quality but reduces soil N2O emissions from a hemp cultivation*. *Agriculture*, 2020. **10**(6): p. 240.
158. GIEC. *Rapport du GIEC*. 2019; Available from: <https://www.ipcc.ch/2018/10/08/summary-for-policymakers-of-ipcc-special-report-on-global-warming-of-1-5c-approved-by-governments/>.
159. Taghinasab, M. and S. Jabaji, *Cannabis Microbiome and the Role of Endophytes in Modulating the Production of Secondary Metabolites: An Overview*. *Microorganisms*, 2020. **8**(3): p. 355.
160. Ahmed, B., L.B. Smart, and M. Hijri, *Microbiome of Field Grown Hemp Reveals Potential Microbial Interactions With Root and Rhizosphere Soil*. *Frontiers in Microbiology*, 2021. **12**.
161. Wei, G., et al., *Compartment Niche Shapes the Assembly and Network of Cannabis sativa-Associated Microbiome*. *Frontiers in Microbiology*, 2021. **12**.
162. Peeri, H. and H. Koltai, *Cannabis Biomolecule Effects on Cancer Cells and Cancer Stem Cells: Cytotoxic, Anti-Proliferative, and Anti-Migratory Activities*. *Biomolecules*, 2022. **12**(4).
163. Cooray, R., V. Gupta, and C. Suphioglu, *Current Aspects of the Endocannabinoid System and Targeted THC and CBD Phytocannabinoids as Potential Therapeutics for Parkinson's and Alzheimer's Diseases: a Review*. *Mol Neurobiol*, 2020. **57**(11): p. 4878-4890.
164. Orsolini, L., et al., *Use of Medicinal Cannabis and Synthetic Cannabinoids in Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD): A Systematic Review*. *Medicina (Kaunas)*, 2019. **55**(9).
165. Wee, J.J., K. Mee Park, and A.S. Chung, *Biological Activities of Ginseng and Its Application to Human Health*, in *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, I.F.F. Benzie and S. Wachtel-Galor, Editors. 2011, CRC Press/Taylor & Francis

Copyright © 2011 by Taylor and Francis Group, LLC.: Boca Raton (FL).

166. Panossian, A., G. Wikman, and J. Sarris, *Rosenroot (Rhodiola rosea): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy*. *Phytomedicine*, 2010. **17**(7): p. 481-93.
167. Cai, X., et al., *Antimicrobial Effects and Active Compounds of the Root of Aucklandia Lappa Decne (Radix Aucklandiae)*. *Front Chem*, 2022. **10**: p. 872480.
168. Chandrashekar, B.S., et al., *Characterization of Rubia cordifolia L. root extract and its evaluation of cardioprotective effect in Wistar rat model*. *Indian J Pharmacol*, 2018. **50**(1): p. 12-21.
169. Wu, J.J., et al., *A systematic review of pharmacokinetic studies on herbal drug Fuzi: Implications for Fuzi as personalized medicine*. *Phytomedicine*, 2018. **44**: p. 187-203.
170. Amin, M.R. and D.W. Ali, *Pharmacology of Medical Cannabis*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1162**: p. 151-165.

171. Canada, S. *Un instantané des producteurs autorisés de cannabis*, 2016. 2017; Available from: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/daily-quotidien/180426/dq180426b-fra.htm>.
172. Canada, S. *Production de cannabis autorisée, Recensement de l'agriculture, 2021*. 2021; Available from: <https://doi.org/10.25318/3210038401-fra>.
173. Canada, S. *Farm income, 2021*. 2022; Available from: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/daily-quotidien/221128/dq221128b-eng.htm>.
174. Natasha R. Ryz, D.J.R.a.E.B.R., *Cannabis Roots: A traditional therapy with future potential for treating inflammation and pain*. Cannabis and Cannabinoid research, 2017. **2.1**.
175. Christoph Kornpointner, A.S.M., Silvija Marinovic, Christian Haselmair-Gosch, Polona Jamnik, Katharina Schrödes, Christian Löffke and Heidi Halbwirth, *Chemical composition and antioxidant potential of Cannabis sativa L. roots*. 2021.
176. David J. Slatkin, N.J.D., Louis S. Harris, Asaad N. Masoud, Maynard W. Quimby and Paul L. Schiff Jr., *Chemical constituents of Cannabis sativa L. Root*. Journal of pharmaceutical sciences, 1971.
177. Gruschow, A., *A comparaison of antioxidant potential, Total phenolic content, and Cannabidiol (CBD) content of Cannabis infused Hemp, MCT and olive oils*, in *Nutrition and food studies*. 2020, Montclair state University.
178. A.Slosse, F.V.D., N. Samyn, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *Evaluation of data preprocessings for the comparaison of GC-MS chemical profiles of seized cannabis samples*. Forensic science international, 2020.
179. de Andrade, J.P., et al., *Crinine-type alkaloids from Hippeastrum aulicum and H. calypttratum*. Phytochemistry, 2014. **103**: p. 188-195.
180. Hinneburg, I., H.D. Dorman, and R. Hiltunen, *Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices*. Food chemistry, 2006. **97**(1): p. 122-129.
181. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free radical biology and medicine, 1999. **26**(9-10): p. 1231-1237.
182. Bolanos de la Torre, A.A.S., et al., *A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey*. Food Chemistry, 2015. **174**: p. 119-123.
183. Scalbert, A., et al., *Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005. **45**(4): p. 287-306.
184. Arts, I.C. and P.C. Hollman, *Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 317s-325s.
185. Harvey, A.L., *The pharmacology of galanthamine and its analogues*. Pharmacol Ther, 1995. **68**(1): p. 113-28.
186. Sharma, K., *Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review)*. Mol Med Rep, 2019. **20**(2): p. 1479-1487.
187. Canada, S.A.d. *Les médicaments approuvés pour traiter la maladie d'Alzheimer au Canada*. 2023 16 mai 2023; Available from: <https://alzheimer.ca/fr/au-sujet-des-troubles-neurocognitifs/comment-traiter-les-troubles-neurocognitifs/les-medicaments>.
188. Baird, L. and M. Yamamoto, *The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway*. Mol Cell Biol, 2020. **40**(13).
189. Saha, S., et al., *An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation*. Molecules, 2020. **25**(22): p. 5474.
190. Olszowski, T., et al., *The effect of cadmium on COX-1 and COX-2 gene, protein expression, and enzymatic activity in THP-1 macrophages*. Biological trace element research, 2015. **165**: p. 135-144.
191. Hussain, T., et al., *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?* Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 7432797.

192. Judžentienė, A., R. Garjonytė, and J. Būdienė, *Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Various Extracts of Fibre Hemp (Cannabis sativa L.) Cultivated in Lithuania*. *Molecules*, 2023. **28**(13).
193. Li, Y., et al., *Mitochondrial dysfunction in microglia: a novel perspective for pathogenesis of Alzheimer's disease*. *J Neuroinflammation*, 2022. **19**(1): p. 248.
194. Dan Jin, K.D., Zhen Xie and Jie Chen, *Secondary metabolites profiled in Cannabis inflorescences, leaves, stem barks and roots for medicinal purposes*. *scientific reports*, 2020.
195. Pierre Luhata, L. and T. Usuki, *Antibacterial activity of β -sitosterol isolated from the leaves of *Odontonema strictum* (Acanthaceae)*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2021. **48**: p. 128248.
196. Bhambhani, S., K.R. Kondhare, and A.P. Giri, *Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids*. *Molecules*, 2021. **26**(11).
197. Masihuddin, M., et al., *Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of papaver somniferum with special reference of unani medicine an updated review*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2018. **8**(5-s): p. 110-114.
198. Sinding, C., *L'invention de l'insuline, entre physiologie, clinique et industrie pharmaceutique*. *médecine/sciences*, 2001. **17**(11): p. 1176-1181.
199. Kwon, Y.J., et al., *A Review of the Pharmacological Efficacy and Safety of Licorice Root from Corroborative Clinical Trial Findings*. *J Med Food*, 2020. **23**(1): p. 12-20.
200. Canada, C.a.C., *Impact of IBD in Canada Report*. 2023.