

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

**INVESTIGATION MÉTABOLOMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE DU
MÉTABOLISME SPÉCIALISÉ AZOTÉ DE *CANNABIS SATIVA* L.**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

**PAR
RAPHAËL BOUCHER**

SEPTEMBRE 2026

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.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

Maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire

Direction de recherche :

Isabel Desgagné-Penix

Prénom et nom

Directeur de recherche

Hugo Germain

Prénom et nom

Codirecteur de recherche

Jury d'évaluation :

Hugo Germain

Prénom et nom

Codirecteur de recherche

Simon Ricard

Prénom et nom

Évaluateur interne

Karine Pedneault

Prénom et nom

Évaluatrice externe

Remerciements

Nombreuses sont les personnes à qui je dois une reconnaissance. D'abord concernée est ma famille, ma mère, mon père et mon frère. Ils m'ont supporté, dans tous les sens du terme, au travers de la maîtrise. Je leur suis énormément reconnaissant d'avoir accordé autant d'importance à la valeur de l'instruction. Merci particulièrement à mon frère Axel, qui m'a épaulé dans la vie quotidienne.

Mes remerciements s'étendent également à mes collègues. Merci à Valérie Gagné de m'avoir assisté avec mes débuts en recherche en me partageant des protocoles, du matériel et des conseils. Merci à Karen C. Gonçalves dos Santos pour son esprit critique, sa patience et le partage de ses connaissances en bio-informatique. Merci à Sarah-Ève Gélinas, qui a énormément contribué au projet par les analyses HPLC-MS/MS, mais qui m'a aussi souvent été d'une grande aide dans la réflexion à mes problèmes expérimentaux. Merci à Vincent Lefebvre pour ses conseils techniques et son savoir en bouturage. Merci à Marie-Lee Audet pour ses conseils pertinents en chromatographie. Merci à Alexandre Custeau pour sa dédication à l'enseignement, lui qui a pris le temps de m'expliquer le fonctionnement du HPLC-MS et qui est toujours prêt à aider. Merci à Fatma Meddeb pour ses encouragements et son assistance dans la planification de mes expériences en début de parcours. Un chaleureux remerciement est envoyé à Professeur Simon Ricard pour ses précieux conseils techniques concernant la chromatographie et sa généreuse disposition.

Finalement, un grand merci est réservé à mes superviseurs de recherche, Professeure Isabel Desgagné-Penix et Professeur Hugo Germain, d'abord pour leur confiance et pour l'opportunité, mais surtout pour leur encadrement enrichissant, pour la merveilleuse équipe qu'ils ont cultivée et parce qu'ils me permettent de travailler dans quelque chose qui me tient à cœur.

Résumé

Énormément d'attention est accordée aux fleurs de *Cannabis*, tandis que plusieurs parties de la plante, qui ont une utilisation traditionnelle, ne sont plus aussi utilisées qu'avant, en partie dû à la criminalisation de la plante. *Cannabis sativa* produit d'innombrables molécules d'intérêt thérapeutique, dans ses fleurs comme dans ses autres organes. Les métabolites spécialisés azotés de *Cannabis* sont particulièrement pertinents pour ces propriétés thérapeutiques et on les retrouve surtout dans les racines.

La voie de biosynthèse de ces métabolites n'a jamais été caractérisée et plusieurs éléments sont manquants, dont les gènes et les précurseurs impliqués. Pour déterminer des gènes candidats dans la biosynthèse de composés spécialisés azotés, une analyse de co-expression a été réalisée en exploitant la connaissance de gènes guides, travaillant en amont des voies d'intérêt. Pour vérifier l'activité biologique des alcaloïdes de *Cannabis*, des racines ont été extraites et purifiées, aboutissant à la génération des spectres de fragmentation des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine connus de *Cannabis*, mais pas de test d'activité.

Ce projet ouvre la voie à l'élucidation et la caractérisation de la voie biosynthétique des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine, tout en consolidant les éléments de la littérature sur la purification et l'identification de ces alcaloïdes. Au sens large, il s'inscrit dans une approche qui se veut écoresponsable en cherchant à atténuer l'envergure du gaspillage industriel par l'identification de voies de valorisation de biomasse perçue comme indésirable.

Mots-clés : Cannabis, racines, alcaloïdes, inflammation, biosynthèse, spermidine, acides hydroxycinnamiques

Remerciements	iii
Résumé	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations, symboles, sigles et acronymes	xi
1 Chapitre I – Introduction	14
1.1 Mise en contexte	14
1.2 Sexualité	14
1.3 Qu’est-ce qu’elle offre?	15
1.4 Historique de sa criminalisation – obsession sur son aspect psychoactif	16
1.5 Métabolites spécialisés de Cannabis	19
1.5.1 Terpènes	19
1.5.2 Composés phénoliques	21
1.5.3 Alcaloïdes	22
1.5.4 Cas des cannabinoïdes	23
1.6 Facette oubliée de la plante – ses racines	25
1.6.1 Acides hydroxycinnamiques	26
1.6.2 Polyamines	27
1.6.3 Amides d’acide hydroxycinnamique	29
1.6.4 Lignanamides	30
1.6.5 Alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine	31
1.7 Problématique, question de recherche, hypothèses et objectifs	34
1.7.1 Problématique	34
1.7.2 Hypothèses :	35
1.7.3 Objectifs	35
2 Chapitre II – Article de recherche	37
2.1 Article scientifique	37
2.2 Contribution des auteurs	37
2.3 Résumé	38
2.4 Abstract	39
2.5 Background	40
2.6 Methods	43
2.6.1 Metabolomics	43
2.6.1.1 Chemicals	43
2.6.1.2 Dragendorff’s reagent	43

2.6.1.3	Plant material	43
2.6.1.4	Extraction and partitioning of <i>Cannabis</i> roots	43
2.6.1.5	Column purification	44
2.6.1.6	Preparative TLC	44
2.6.1.7	HPLC-MS/MS analysis	44
2.6.2	Transcriptomics	45
2.6.2.1	RNA Data processing	45
2.6.2.2	Co-expression Network Construction	46
2.7	Results	47
2.7.1	Metabolomics	47
2.7.2	Transcriptomic analysis	51
2.8	Discussion	58
2.9	Conclusion	64
2.10	Declarations	64
2.10.1	Acknowledgements	64
2.10.2	Author contribution statement	64
2.10.3	Competing interests' statement	65
2.10.4	Data availability statement	65
2.10.5	Funding statement	65
2.11	Article References	65
2.12	Supplementary Material	71
3	Chapitre III – Discussion	79
3.1	Métabolomique – retour sur la méthode	79
3.1.1	Matériel végétal	79
3.1.2	Broyage	80
3.2	Métabolomique – retour sur les résultats	80
3.3	Transcriptomique – retour résultats	84
3.4	Perspectives des alcaloïdes	88
3.5	Perspectives des racines	92
3.6	Perspective du <i>Cannabis</i>	93
4	Chapitre IV - Références	96
5	Annexe	108

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Exemples de terpènes de <i>C. sativa</i> avec un potentiel thérapeutique	20
Tableau 1.2 : Exemples de composés phénoliques de <i>C. sativa</i> avec un potentiel thérapeutique.....	21
Tableau 1.3 : Alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine de <i>C. sativa</i>	23
Tableau 1.4 : Exemples de cannabinoïdes communs chez <i>C. sativa</i>	25
Table 2.5 Reported Ion Fragments for Cannabis Alkaloids are Consistent Among Studies	50
Table 2.6 Distribution of selected RNA-seq samples across organs.....	51
Table 2.7: Genes of interest of nitrogenous specialized metabolism identified in module 14 of the co-expression network.	56
Supplementary table S2.8: Listing of selected bait genes and reason for their inclusion in the study	75

Liste des figures

Figure 1.1 : Les plants mâles produisent des étamines et les plants femelles, des pistils...	15
Figure 1.2 : Le nombre de publications scientifiques répertoriées sur PubMed concernant <i>C. sativa</i> explose au milieu des années 1960, puis augmente considérablement à partir des années 2000.....	17
Figure 1.3 : Voie de biosynthèse générale des cannabinoïdes chez <i>C. sativa</i>	24
Figure 1.4 : Résumé de la voie de biosynthèse proposée des acides hydroxycinnamiques	27
Figure 1.5 : Résumé de la voie de biosynthèse présumée de la spermidine	28
Figure 1.6 : Résumé de la voie de biosynthèse proposée des amides d'acide hydroxycinnamique.....	30
Figure 1.7 : Résumé de la voie de biosynthèse putative des lignanamides.	31
Figure 1.8 : La cannabissativine est présumée être biosynthétisée à partir d'une molécule de spermidine et d'un acide gras à 14 carbones.....	32
Figure 2.9: Proposed biosynthesis for precursors of <i>C. sativa</i> nitrogenous specialized metabolites	41
Figure 2.10: Expected reaction sequence of <i>C. sativa</i> macrocyclic spermidine alkaloids' biosynthesis.....	42
Figure 2.11: HPLC-MS/MS analysis of chromatographic and acid-base extraction purification steps of putative macrocyclic spermidine alkaloids.....	48
Figure 2.12: Detection of putative cannabissativine and anhydrocannabissativine in <i>Cannabis</i> roots.....	50

Figure 2.13: Public Cannabis RNA-seq samples cluster according to their organ of origin	52
Figure 2.14: Genes expected to be involved in the biosynthesis of macrocyclic spermidine alkaloids and hydroxycinnamic acid amides are overwhelmingly over-expressed in roots.....	53
Figure 2.15: Most variable genes are over-expressed and cluster in trichome, stem, and root	55
Figure 2.16: Putative biosynthetic pathway of macrocyclic spermidine alkaloids.....	61
Supplementary Figure S2.17: Pairwise gene correlation for co-expression network assembly.....	71
Supplementary Figure S2.18: Optimization of resolution for co-expression network construction.....	72
Supplementary Figure S2.19: F71.4 & F71.5 react positively to Dragendorff's reagent on thin layer chromatography	73
Supplementary Figure S2.20: Positive reaction of acid-base extract of F71.4 & F71.5 for Dragendorff's reagent on thin layer chromatography.	74
Supplementary Figure S2.21: F71.5 has two positive reactions for Dragendorff's reagent with near-identical R_f	75
Supplementary Figure S2.22: Bait genes rank amongst the highest variable genes.....	77
Supplementary Figure S2.23: Addition of sulfuric acid (2%) in F71 creates a semi-rigid foam	78
Figure 3.24 : Le patron de migration sur chromatographie sur couche mince des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine est visible sous lumière UV	81

Figure 3.25 : Un extrait d'Equisetum produit des résultats analogues à ceux d'extraits de racines de Cannabis.....	83
Figure 3.26 : La biosynthèse présumée de la cannabissativine requiert une condensation et une série d'oxydoréductions	87
Figure 3.27 : L'acide α -linoléique est probablement le précurseur des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine du genre Equisetum	88
Figure 3.28 : La cannabissativine et l'anhydrocannabissativine sont présumées être produites par oxygénation d'un alcène	89
Figure 3.29 : L'acide jasmonique est une oxylipine dérivée de l'acide α -linoléique servant de phytohormone.....	91
Figure 3.30 : Schéma de valorisation de la biomasse racinaire inspiré des utilisations traditionnelles.....	93

Liste des abréviations, symboles, sigles et acronymes

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
2-OG	2-oxoglutarate
4CL	4-coumarate-CoA ligase
Å	Angstrom
AIH	Agmatine iminohydrolase
AKR	Aldo-céto réductase
ALK	Fraction alcaloïde
AMPK	Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate
BBE	Berberine Bridge Enzyme
BIA	Alcaloïde benzylisoquinoline
C	Carbone
C3H	4-coumarate 3-hydroxylase
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase
CBCA	Acide cannabichroménique
CBCAS	Acide cannabichroménique synthase
CBDA	Acide cannabidiolique
CBDAS	Acide cannabidiolique synthase
CCM	Chromatographie sur couche mince
CoA	Coenzyme A
COMT	Caféoyl- <i>O</i> -méthyltransférase
CPA	Carbamoyl putrescine amidase
CuAO	Amine oxydase de cuivre
CYP450	Cytochrome P450
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESI	Electron Spray Ionization

F5H	Férulate 5-hydroxylase
FDA	Food and Drug Administration
FDR	False discovery rate
HTH	<i>N</i> -hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine <i>N</i> -(hydroxycinnamoyl) transférase
IL-6	Interleukine 6
kg	Kilogramme
mL	Millilitre
LPS	Lipopolysaccharide
LSD	Acide lysergique diéthylamide
MDMA	3,4-méthylènedioxyméthamphétamine
MIA	Alcaloïde indole monoterpénique
mm	Millimètre
MRM	Multiple reaction monitoring
ms	milliseconde
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MSA	Alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine
NAD	Dinucléotide nicotinamide-adénine
NBS	Norbelladine synthase
NR	Noroxomaritidine/norcraugsodine réductase
NSM	Métabolites spécialisés azotés
ODC	Ornithine décarboxylase
OMT	<i>O</i> -méthyltransférase
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
PAO	Polyamine oxydase
PCA	Analyse de composante principale
PFAM	Protein family domain

PSI	Livre par pouce carré
R _f	Facteur de rétention
RMSD	Root mean square deviation
SAM	<i>S</i> -adénosylméthionine
SAMa	<i>S</i> -adénosylméthioninamine
SAMDC	<i>S</i> -adénosylméthionine décarboxylase
SAQ	Société des alcools du Québec
SDR	Short-chain déshydrogénase/réductase
SPDS	Spermidine synthase
SQDC	Société Québécoise du <i>Cannabis</i>
THC	Tétrahydrocannabinol
THCA	Acide tétrahydrocannabinol
THCAS	Acide tétracannabinolique synthase
TLC	Thin Layer Chromatography
TPM	Transcrits par million
TYDC	Tyrosine décarboxylase
V	Volt
µm	Micromètre
ω-3	Acide gras oméga-3
ω-6	Acide gras oméga-6

1 Chapitre I – Introduction

1.1 Mise en contexte

De la famille des *Cannabaceae*, proche cousine du houblon (*Humulus lupulus*), *Cannabis sativa* est une plante extraordinaire (1). Sa domestication aurait eu lieu en Chine, il y a plus de 10 000 ans et elle est considérée parmi les premières plantes à avoir été domestiquées par l'*Homo sapiens* (2-4). Son origine naturelle est en Asie de l'Est, fort probablement dans le nord-est du plateau Tibétain (1, 5, 6). Sa dispersion étant intimement reliée à l'activité humaine, elle pousse dorénavant partout à travers le globe, dans des climats variés, caractéristiques de plusieurs régions du monde (3). Ces divers climats ont engendré plusieurs phénotypes, qui ont créé une confusion sur le nombre d'espèces dans le genre *Cannabis*, dont le débat existait à l'époque de Linnaeus et Lamarck (3). Historiquement, la plante est principalement utilisée pour ses fibres, ses graines et ses propriétés thérapeutiques (7). Ainsi, le chanvre fut baptisé *Cannabis sativa* – des langues Scythes « *kanab* » et du latin pour « cultivée » (8). Le phénotype ayant une résine aux propriétés psychoactives était connu comme *Cannabis indica* – signifiant cannabis de l'Inde, poussant plutôt en altitude dans les montagnes, où l'exposition accrue aux rayons UV stimulerait la production de phytocannabinoïdes (9). Or, avec d'innombrables croisements spontanés et dirigés entre ces phénotypes régionaux, ces appellations sont aujourd'hui dénuées de sens. Actuellement, la proposition adoptée est qu'il n'existe qu'une espèce monotypique hautement diversifiée, *Cannabis sativa* L. (10).

1.2 Sexualité

La plante présente des caractéristiques sexuelles inhabituelles. D'abord, elle est dioïque, ce qui signifie qu'il existe des plants mâles et des plants femelles, arborant des organes reproducteurs distincts (Figure 1.1) (11). De fait, *C. sativa* possède des chromosomes sexuels X et Y. Un plant mâle peut développer des fleurs femelles, et *vice versa*, via la modulation de l'éthylène, phénomène appelé la plasticité sexuelle (12). Il existe également des individus présentant de l'hermaphrodisme (13). Finalement, la pollinisation des plants femelles se fait le plus souvent par le vent, phénomène appelé l'anémophilie (3). Cette sexualité des individus est d'une importance capitale dans ses diverses applications industrielles et la compréhension de son évolution en tant qu'espèce. Par exemple, les femelles produisent plus de cannabinoïdes que les mâles (14). De plus, dans la production de biomasse florale, la présence de plants mâles dans la vicinity menace la qualité du produit final, car la pollinisation engendre la présence de graines, réduit la grosseur des fleurs, ainsi que la teneur en cannabinoïdes de celles-ci (15). Les plants mâles cultivés pour leurs fibres sont généralement plus grands, avec une croissance et un cycle de vie plus rapides que les femelles, tout en ayant des fibres plus fines (13). Certains cultivars monoïques sont d'ailleurs utilisés pour la production simultanée de fibres et de graines, étant donnée leur plus grande uniformité phénotypique. Tandis que du plant femelle

dérivent de nombreux produits économiquement importants, les plants mâles ne sont habituellement pas sélectionnés pour leurs qualités industrielles. Pour cette raison, la sélection tend à être à prédominance naturelle pour la population mâle et artificielle pour les femelles (16).

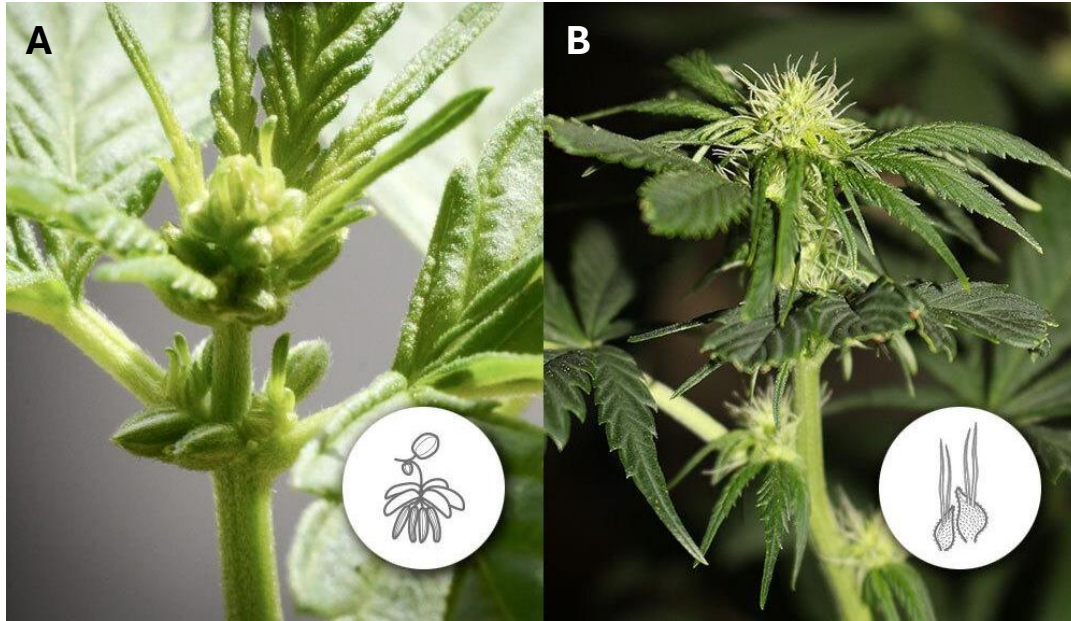


Figure 1.1 : Les plants mâles produisent des étamines et les plants femelles, des pistils.
A) Plant mâle, B) plant femelle.

1.3 Qu'est-ce qu'elle offre?

Chaque partie de la plante peut servir à quelque chose. La plante en elle-même est un excellent outil pour la détoxification des métaux lourds des sols, processus appelé la phytoremédiation, qui est favorisée par ses profondes racines, aidant par le fait même à aérer le sol, ce qui permet à un plus grand volume d'eau de s'y rendre (17). La fibre de sa tige sert à des fins textiles, elle se démarque par sa durabilité exceptionnelle, tout en conservant souplesse et douceur, par sa résistance à l'eau (d'où son utilisation autrefois répandue dans le secteur maritime), par ses propriétés antibactériennes et sa polyvalence artisanale (18). Les graines de chanvre sont d'usage pour l'alimentation, notamment grâce à leur huile qui constitue environ 30% de la masse de la graine, ainsi que sa forte teneur en protéines (~25%), qui constitue un apport significatif d'acides aminés essentielles, à savoir des acides aminés dont l'apport est insuffisant par biosynthèse (19). Elle est idéale pour l'alimentation humaine et animale avec un ratio d'acides gras insaturés de type ω -6/ ω -3 adéquat, possédant des fibres insolubles, ainsi que bon nombre de vitamines et minéraux (9, 20). Les feuilles et les fleurs sont utilisées à des fins thérapeutiques, ces premières l'étant historiquement pour traiter des blessures, la douleur et l'inflammation, pour les troubles nerveux et mentaux, pour les infections et les troubles gastro-intestinaux et alimentaires (7). Les racines, généralement préparées en cataplasmes ou en décoctions,

peuvent atténuer les raideurs et les douleurs articulaires, l'inflammation, la fièvre et les infections (21). Aujourd'hui, ce sont les fleurs qui sont le plus utilisées en médecine, notamment pour les troubles digestifs et pour stimuler l'appétit, comme anticancéreux, antiépileptique, analgésique et sédatif, tandis que les racines ont perdu leur valeur d'antan, du moins en médecine moderne (7, 22).

1.4 Historique de sa criminalisation – obsession sur son aspect psychoactif

Une plante évidemment pertinente et aux innombrables applications, cultivée depuis des millénaires, a cependant vu son prestige se ternir à partir de la deuxième moitié du XIX^e siècle et dans la première moitié du XX^e siècle. Au Dominion du Canada, *C. indica* a été criminalisé dès 1923 (23). Les raisons, ainsi que les responsables de son ajout à la liste des drogues interdites ne sont pas clairs; aucun débat n'aurait été entretenu pour le justifier et son utilisation n'aurait pas été particulièrement répandue au pays. Cependant, l'historienne Catherine Carstairs argumente que cette prohibition serait due à des conférences internationales, où des discussions sur les dangers de drogues comme l'opium, les opioïdes et la cocaïne avaient lieu. Ainsi, la prohibition du *Cannabis* aurait été anticipée par les autorités canadiennes. Or, les premières infractions répertoriées à la loi datent de 1937 (23).

Aussi en 1937, aux États-Unis, la loi intitulée *Marihuana Tax Act* amorça le début d'une ère de prohibition de tout ce qui se rapporte à cette plante dans ce pays. Tel que le nom l'indique, cette loi avait pour but de taxer les produits du chanvre, en plus de toute activité y étant reliée (p. ex. production, transformation, importation, exportation, prescription médicale). Les médecins et pharmaciens étaient alors contraints de payer de leur poche pour, dans un cas, prescrire, et dans l'autre, vendre des médicaments dérivés du *Cannabis*. Officieusement, la loi poussa les Américains à progressivement délaisser le chanvre pour d'autres alternatives face aux lourdes amendes encourues pour le non-respect de celle-ci. Le terme « *marihuana* » ou « *marijuana* » n'était pas non plus d'usage à l'époque. C'est véritablement l'avènement de ce projet de loi qui officialisera l'appellation grotesque que l'on entend encore près de 100 ans plus tard. Cette déclaration est corroborée par une recherche du terme en question sur PubMed. Pour des articles publiés entre 1840 et 1938, la recherche pour « marijuana » livre 28 articles, or aucun d'entre eux n'utilise le mot recherché. On peut y observer les termes « *Cannabis* » avec les suffixes suivants : « *Indica* », « *Sativa* » ou « *Americana* ». C'est un article publié en 1940 qui apparaît comme le premier à mentionné la plante sous ce nom dans son titre (24). Un article de 1939 sur les principes actifs de *C. indica* mentionne explicitement que le terme *marihuana* était un phénomène récent à l'époque et que sa consommation prenait de dangereuses proportions (25). Autour de 1967, les articles publiés sur PubMed trouvés avec la recherche « marijuana » connaissent une augmentation fulgurante (Figure 1.2A). La plupart des articles à ce moment se concentrent sur son aspect psychoactif, certaines fois avec une connotation négative, que ce soit face à la molécule de tétrahydrocannabinol (THC) elle-même, les addictions, les risques pour la santé, les réactions adverses à la consommation,

etc. Certains articles focalisent d'ailleurs simultanément sur le *Cannabis* et l'acide lysergique diéthylamide (LSD) (quoi que le contenu desdits articles ne me soit pas disponible) (26-28). À l'époque déjà, les bénéfices que pouvaient apporter le LSD en psychothérapie étaient pourtant bien connus (29-33). Puis, pour une dizaine d'années à partir de 1975, le nombre d'articles concernant le *Cannabis* diminua, pour réaugmenter drastiquement à partir de 2000 jusqu'à aujourd'hui (Figure 1.2B).

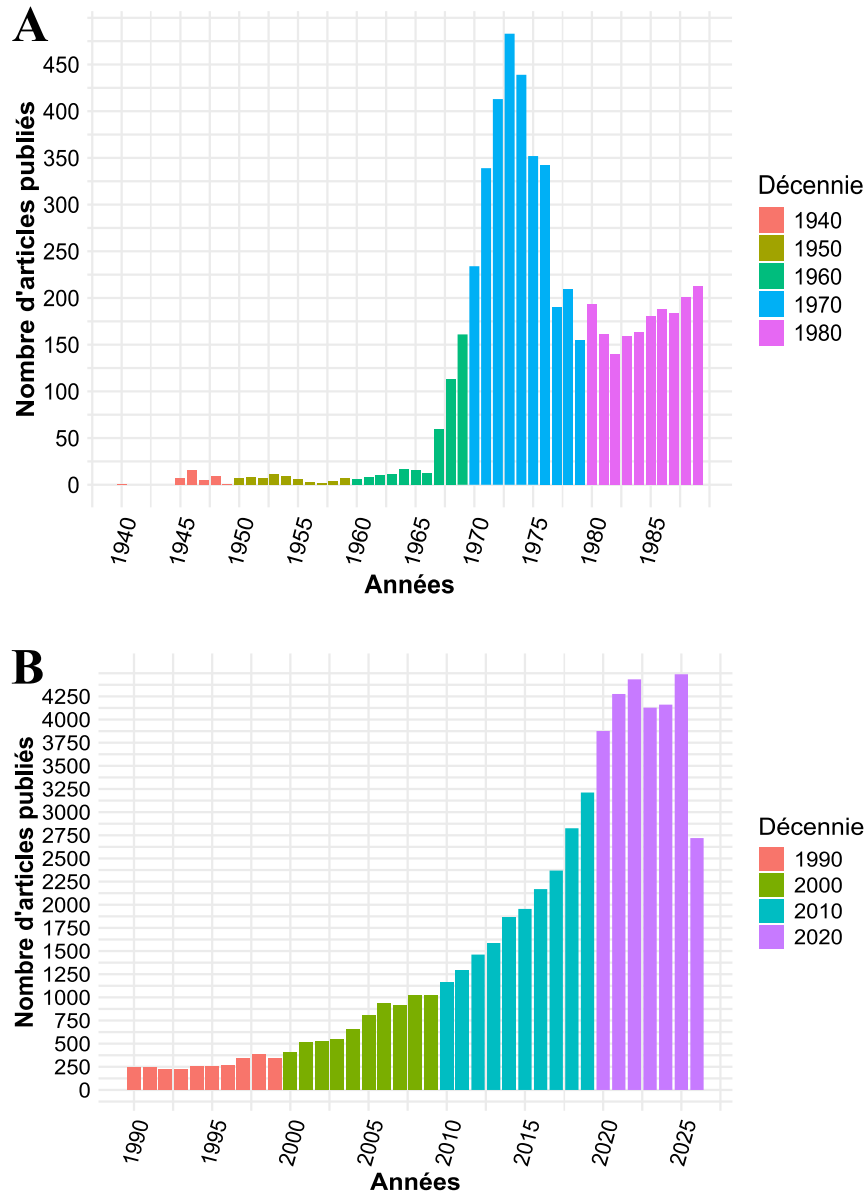


Figure 1.2 : Le nombre de publications scientifiques répertoriées sur PubMed concernant *C. sativa* explose au milieu des années 1960, puis augmente considérablement à partir des années 2000. Histogramme du nombres de publications scientifiques répertoriées sur PubMed en lien avec le terme *Marijuana* pour les années A) 1940 – 1989, et B) 1990 – 2026.

La décennie de 1960 fut défavorable à l'utilisation du *Cannabis*, particulièrement aux États-Unis. Avec quelques pays faisant pression pour un contrôle des stupéfiants durant des conventions internationales, il ne tarda pas pour que la plante de *Cannabis* soit criminalisée à l'échelle globale par le travail de l'Organisation des Nations Unies. La convention unique sur les stupéfiants de 1961 classe des substances en quatre catégories et ajoute des restrictions supplémentaires pour la plante de *Cannabis*, ainsi que pour le pavot à opium et le cocaïer, qui se retrouvent tous trois dans la catégorie I, la plus restrictive (34).

Aux États-Unis, la *Controlled Substances Act* de 1970 vient classer les substances préalablement régulées par le gouvernement fédéral en cinq annexes selon leur usage médical, leur potentiel d'abus et dangerosité, similairement au système des Nations Unies (35). Le projet de loi défini comme annexe I, une drogue sans aucune utilisation médicale acceptée et avec un fort potentiel d'abus (36). Contre toute trace de raison et de preuves scientifiques, le *Cannabis* fut classé (et persiste toujours) comme une annexe I. D'autres drogues étant classées comme annexe I sont : l'héroïne, le LSD, la 3,4-méthylène dioxyméthamphétamine (MDMA) et le peyote. Les substances d'annexe II, définies comme ayant un fort potentiel d'abus pouvant mener à une sévère dépendance psychologique ou physique, ont cependant un usage médical reconnu (15 mg ou moins). Certains exemples de cette annexe II sont la cocaïne, la méthamphétamine, l'oxycodone, le fentanyl et le Ritalin.

Cependant, la plupart des drogues listées dans l'annexe I sont assurément légitimes aux usages médicaux, notons le cas de la MDMA combinée à la psychothérapie dans le traitement du syndrome de stress post-traumatique persistant aux traitements conventionnels (37, 38). Le LSD et la psilocybine ont un potentiel dans le traitement du tabagisme, de l'alcoolisme et de l'apaisement de l'anxiété de fin de vie (39-41). D'autant plus que le LSD, la MDMA et la psilocybine figurent parmi les drogues les moins dangereuses pour le consommateur (42). Les psychédéliques sérotoninergiques comme la psilocybine, le LSD et la mescaline ne sont pas non plus tellement des drogues d'abus, contrairement à la propagande véhiculée, étant donné qu'ils n'ont pas d'effet direct sur le système dopaminergique (contrairement à la MDMA (43)), ce qui est typique des substances addictogènes. Les tentatives expérimentales faites avec des animaux pour valider le potentiel d'abus de substances psychédéliques étant généralement vouées à l'échec (44).

Bref, il y a historiquement un manquement sévère, voire de l'aveuglement volontaire dans la compréhension et l'utilisation rationnelle des substances psychédéliques, ayant dégénéré essentiellement en un tabou, qui mène alors à une conséquente ignorance tant qu'il perdure. Or, ces substances ont un potentiel bénéfique pour la santé, principalement mentale, mais cet accomplissement requiert une application mesurée et intentionnelle, ce qui ne se fait que par le savoir. Il en va de même pour *C. sativa*, à qui fut réservé pendant longtemps, et à tort, le même sort que plusieurs psychédéliques. Certains discours véhiculés ont eu un

effet marqué sur les consciences et la perception de la plante, en mettant l'emphasis sur son aspect psychoactif, qui est légitimement à la racine de problèmes de santé publique. Mais l'espèce est inéluctablement pertinente; elle peut être facilement cultivée, pratiquement toutes les parties de la plante peuvent être utilisées et leur application à l'échelle industrielle peut avoir un impact désirable dans de nombreux domaines, d'autant plus que sa cultivation est aussi pratique à petite échelle. Bien malheureusement, cette plante a été réduite à ses fleurs, au détriment de tout un chacun, en faisant complètement fi de ses autres qualités. Plus largement, cette attitude négatrice et condamnatoire face aux drogues cultive une ignorance, qui résulte en des pratiques réellement dangereuses vis-à-vis celles-ci, qu'on en condamne la consommation ou non. Il en convient alors que la recherche, l'approfondissement des connaissances et l'éducation se manifestent alors comme un impératif moral, notamment pour la santé publique.

1.5 Métabolites spécialisés de *Cannabis*

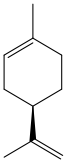
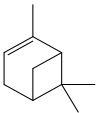
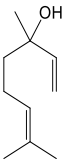
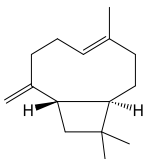
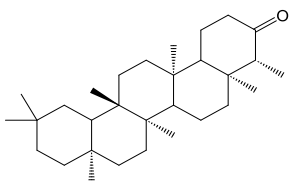
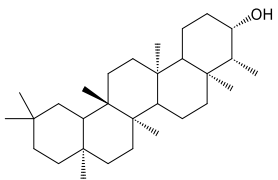
Même en ne considérant seulement que le secteur médical, *C. sativa* regorge de potentiel. Ses fleurs sont déjà bien étudiées, quoique de façon focalisée, tandis que plusieurs classes de molécules sont délaissées et possiblement à grand coût. Le métabolisme des êtres vivants répond aux stimuli environnementaux et partage conséquemment plusieurs voies métaboliques conservées. C'est ce qu'on réfère comme étant le métabolisme général, partagé entre les règnes du vivant. Ceci inclut notamment le métabolisme des sucres, des acides gras, des nucléotides et des acides aminés (non-essentiels). Dans leur adaptation à l'environnement, les végétaux produisent aussi des métabolites dits spécialisés. Ces métabolites sont taxonomiquement exclusifs et viennent en quelque sorte compléter le métabolisme général, en étant généralement favorables à la survie (ou à la reproduction) de l'organisme les produisant. Il existe trois grandes familles de métabolites spécialisés, soit les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (45). Puisque ces métabolites ont des rôles particuliers, généralement dans la défense, ils sont éparpillés à travers la plante, avec certains tissus plus concentrés en certains types de molécules.

1.5.1 Terpènes

Les terpènes contribuent à l'odeur puissante et caractéristique des fleurs de *Cannabis*, mais des terpènes plus volumineux et moins volatils se retrouvent également dans les racines (46) (Tableau 1.1). Les terpènes présentent une grande diversité structurale et ont une large gamme d'activités biologiques, notamment dans la médiation inter-espèces, par la gestion des microbes, l'attraction des pollinisateurs et la répulsion des herbivores (47, 48). Ils ont des activités insecticides, antimicrobiennes, antivirales, nématocides, mais également anti-inflammatoires, antioxydantes et antiprolifératives (49). Ils sont biosynthétisés à partir de deux unités isopréniques (5 carbones), soit le diméthylallyl-pyrophosphate et l'isopentényl-pyrophosphate, pouvant former des monoterpènes (10 carbones ou 10C), des sesquiterpènes (15C), des diterpènes (20C), des triterpènes (30C) et des tétraterpènes (40C) (47, 50). Cette caractéristique confère une lipophilie à ces molécules, les rendant

extractibles par plusieurs solvants organiques (par exemple méthanol, hexane, toluène, éther), mais difficilement dans les solvants polaires comme l'eau (51). En revanche, l'hydrodistillation est une méthode adéquate pour extraire les terpènes plus volatils sous forme d'huiles essentielles (52).

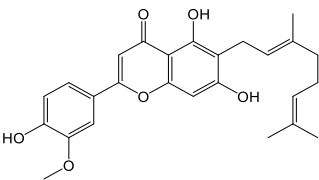
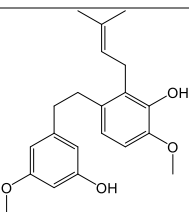
Tableau 1.1 : Exemples de terpènes de *C. sativa* avec un potentiel thérapeutique

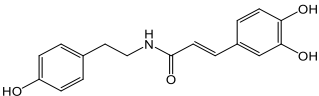
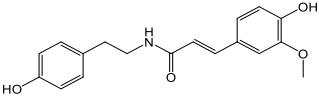
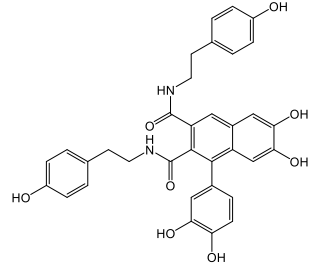
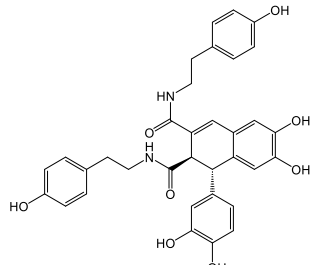
Type	Nom	Structure	Organes de stockage	Activités biologiques
Monoterpène	<i>d</i> -Limonène		Trichomes	Anti-inflammatoire, antiviral, antiprolifératif, antibactérien (53)
	α -Pinène		Trichomes	Anti-inflammatoire, antioxydant, antiprolifératif, antimicrobien, anticoagulant, antileishmanien, analgésique (54)
	Linalool		Trichomes	Anti-inflammatoire, anxiolytique, antiprolifératif, antimicrobien, analgésique, neuroprotecteur (55)
Sesquiterpène	β -Caryophyllène		Trichomes	Antiprolifératif, antioxydant, antimicrobien (56)
Triterpène	Friedéline		Racines, fibres	Anti-inflammatoire, antioxydant, antiprolifératif, hépatoprotecteur, neuroprotecteur (57)
	Épifriedélanol		Racines, fibres	Antimicrobien (58)

1.5.2 Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont aussi chimiquement très diversifiés et généralement antioxydants (Tableau 1.2) (59). Ils sont directement impliqués dans l'homéostasie du stress oxydatif, en plus d'aider dans la protection contre les UV, les pathogènes et les prédateurs, ils sont impliqués dans la signalisation cellulaire, tout en conférant de la rigidité, nécessaire à la survie des végétaux terrestres (60). Ainsi, on les retrouve pratiquement dans tous les organes de la plante. Ils présentent des activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiprolifératives, cardioprotectrices, antiallergiques, vasodilatatrices, parmi d'autres (59, 61). La plupart des phénoliques sont biosynthétisés via la voie des phénylpropanoïdes, mais d'autres voies sont impliquées dans leur production (59). Il existe de nombreux types de phénoliques, notamment les phénols simples, les acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques, les coumarines, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignans, qui est une énumération non-exhaustive (62). Étant donné la grande diversité structurelle de ces composés, la méthode d'extraction doit être planifiée en fonction des métabolites ciblés. Par exemple, les amides d'acide hydroxycinnamique et les lignanamides peuvent être extraits avec de l'éthanol et requièrent une plus grande proportion d'alcool. Les flavonoïdes peuvent être extraits avec de l'alcool également, mais semblent être plus favorables à des solvants à plus grande polarité (par la constitution aqueuse ou l'utilisation de méthanol ou d'acétone) (63). Ceux-ci peuvent être glycosylés, ainsi ce genre de flavonoïdes serait sans doute mieux extrait avec une plus grande proportion aqueuse. L'utilisation d'un mélange d'eau : méthanol : acétone (6 : 7 : 7) procure une plus grande quantité totale de composés phénoliques, probablement due à l'étendue de polarité couverte (63). Bref, beaucoup d'entre eux sont extractibles avec des solvants polaires comme l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle et le chloroforme (64).

Tableau 1.2 : Exemples de composés phénoliques de *C. sativa* avec un potentiel thérapeutique

Type	Nom	Structure	Organes de stockage	Activités biologiques
Flavonoïde	Cannflavine A		Fleurs, feuilles	Anti-inflammatoire, antileishmanien, neuroprotecteur, antiprolifératif, antinociceptif (65)
Stilbène	Canniprène		Feuilles	Anti-inflammatoire, antiprolifératif (65)

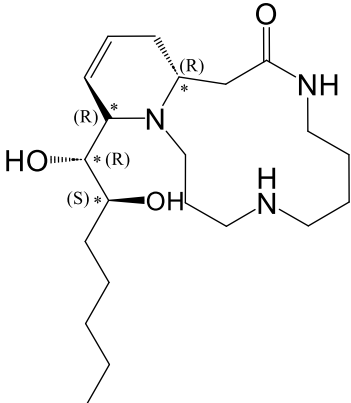
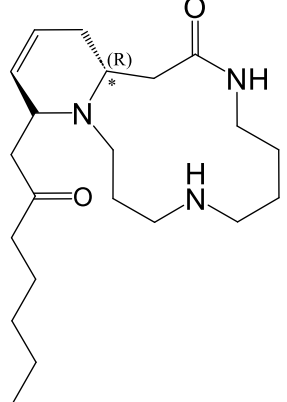
Amide d'acide hydroxy-cinnamique	<i>N</i> -caféoyltyramine		Racines, graines, fleurs, feuilles	Antiprolifératif, antioxydant, anti-inflammatoire, agent lipophagique, neuroprotecteur (65)
Amide d'acide hydroxy-cinnamique	<i>N</i> -féruloyltyramine		Racines, graines, fleurs, feuilles	Antiprolifératif, antioxydant, anti-inflammatoire, agent lipophagique, neuroprotecteur (65)
Lignanamide	Cannabisin A		Graines, fleurs	Antioxydant, anti-tyrosinase (65)
Lignanamide	Cannabisin B		Racines, graines, fleurs	Antioxydant, antiprolifératif, anti-tyrosinase (65)

1.5.3 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont caractérisés par un atome d'azote, formant généralement un hétérocycle (Tableau 1.3). Ils sont conséquemment de nature basique, ce qui leur confère un goût amer (66). Cette caractéristique est indicative de leur rôle biologique dans la défense contre les prédateurs, mais également des insectes et pathogènes (67). C'est une classe de molécules ayant un rôle de prédilection en médecine, traditionnelle comme moderne, mais également utilisée historiquement en tant que poison. Les alcaloïdes ont des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératives, analgésiques antivirales, immunomodulatrices, antimicrobiennes et antidiabétiques, pour en nommer quelques-unes (67, 68). Ils sont majoritairement biosynthétisés à partir d'acides aminés, couramment la tyrosine, le tryptophane, la lysine, l'ornithine et l'histidine (68). Cependant, des classes d'alcaloïdes ne sont pas dérivés des acides aminés, notamment les alcaloïdes puriques, terpéniques et les flavo-alcaloïdes (69). Généralement, les alcaloïdes ne sont pas très solubles dans l'eau, nécessitant plutôt des alcools, comme le méthanol ou l'éthanol. Dû à leurs propriétés

alcalines, l'utilisation d'acide inorganique (p. ex. HCl, H₂SO₄) permet leur protonation, augmentant drastiquement leur hydrosolubilité (70). Une technique classique dans l'extraction des alcaloïdes est donc l'extraction acido-basique.

Tableau 1.3 : Alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine de *C. sativa*

Type	Nom	Structure	Organes de stockage	Activités biologiques
Dérivés de la spermidine	Cannabisativine		Racines, feuilles	Antibutryl-cholinestérase (71)
Dérivés de la spermidine	Anhydrocannabisativine		Racines, feuilles	Antibutryl-cholinestérase (71)

1.5.4 Cas des cannabinoïdes

Les cannabinoïdes sont des molécules bioactives lipophiles, à l'interface entre les composés phénoliques et terpéniques, à savoir : des méroterpènes, dont ils sont un fameux exemple. Ils sont biosynthétisés dans les trichomes glandulaires de *C. sativa*, ils sont donc particulièrement concentrés dans les inflorescences et à un moindre degré dans les feuilles (Tableau 1.4) (72). Ils sont fortement impliqués dans la défense et la gestion des stress, notamment lumineux, de températures élevées et de faible humidité (73). Ces molécules ont des activités analgésique, anxiolytique, antiémétique, antipsychotique, anticonvulsive, antirhumatismale et anti-inflammatoire (73). La grande majorité des cannabinoïdes ont comme précurseur l'acide cannabigérolique (Figure 1.3). Celui-ci est biosynthétisé par la condensation de l'acide olivetolique et d'un groupement géranyle. L'acide olivetolique est obtenu par l'action de la tétracétide synthase, qui ajoute consécutivement trois

groupements de malonyl-CoA à l'hexanoyl-CoA, formant temporairement le 3,5,7-trioxododécanoyl-CoA, qui sera cyclisé en acide olivetolique par l'acide olivetolique cyclase. Les cannabinoïdes peuvent être extraits avec des solvants relativement polaires, généralement des alcools, comme le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol et des éthers (74). Ils sont aussi solubles dans des solvants plus hydrophobes comme le propane et le butane, généralement utilisés en industrie. Les phytocannabinoïdes étant biosynthétisés avec une fonction acide carboxylique, il est également possible de réaliser une extraction acido-basique où l'alcalinité (pH ~ 13) favorise leur diffusion dans la phase aqueuse, comparable à leur diffusion dans le méthanol (75).

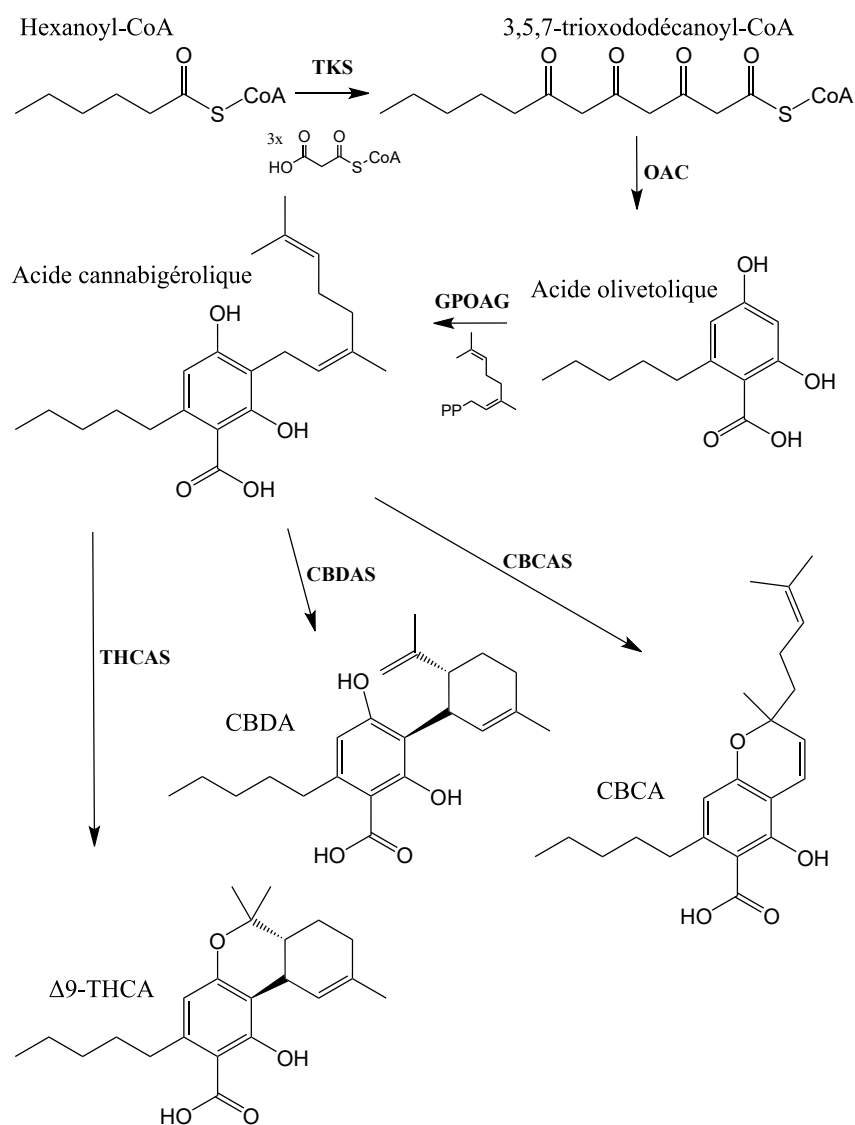
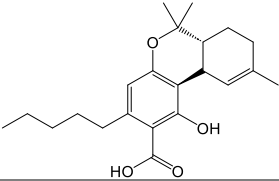
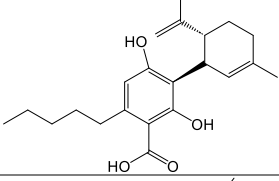
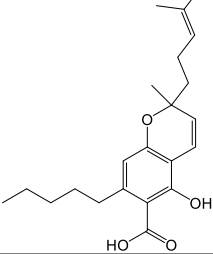


Figure 1.3 : Voie de biosynthèse générale des cannabinoïdes chez *C. sativa*. TKS, tétracétide synthase. OAC, acide olivetolique cyclase. GPOAG, pyrophosphate de géranyle – acide olivetolique géranyltransférase. THCAS, acide Δ⁹tétrahydrocannabinolique synthase. CBDAS, acide cannabidiolique synthase. CBCAS, acide cannabichroménique synthase.

Tableau 1.4 : Exemples de cannabinoïdes communs chez *C. sativa*

Type	Nom	Structure	Organes de stockage	Activités biologiques
Cannabinoïde	THCA		Trichomes	Analgésique, psychoactif, antiémétique (76)
Cannabinoïde	CBDA		Trichomes	Anti-inflammatoire, anxiolytique, neuroprotecteur (76)
Cannabinoïde	CBCA		Trichomes	Anti-inflammatoire, analgésique, neuroprotecteur (76)

THCA, acide tétrahydrocannabiolique; CBDA, acide cannabidiolique; CBCA, acide cannabichroménique.

1.6 Facette oubliée de la plante – ses racines

Dans le contexte canadien actuel, où le *Cannabis* est disponible à être vendu à la population générale adulte, il devient attirant d'entreprendre la culture de la plante à des fins commerciales. La biomasse la plus désirée est la fleur femelle non pollinisée, riche en cannabinoïdes, qui peut servir à des fins thérapeutiques et/ou récréatives. Bien évidemment, la production de fleurs exige la maturité sexuelle de la plante et ceci engendre nécessairement une plante entière. Cependant, la réglementation entourant le *Cannabis* est relativement stricte et cela complexifie la transformation et le recyclage de la biomasse, autant des fleurs que des autres organes de la plante. Il est compréhensible alors que certains soient découragés d'explorer cette avenue, particulièrement au niveau de la recherche et du développement, où les coûts peuvent être élevés et les bénéfices, incertains. Or, vu leur faible teneur en cannabinoïdes (< 0,1%), les racines ne sont pas considérées comme du *Cannabis* par la loi canadienne, facilitant alors grandement leur exploitation commerciale. Malgré cela, elles sont carrément traitées comme des déchets de production, par ignorance faut-il croire.

Celles-ci ont une longue histoire ethno-pharmacologique, ayant servi dans le traitement de diverses conditions, de près ou de loin inflammatoires, notamment la goutte, la dysménorrhée, les brûlures, l'arthrite et bien d'autres (21). La première mention du *Cannabis* à des fins thérapeutique proviendrait d'un recueil Chinois, attribué à Shennong,

il y a quelques millénaires (77). Cependant, on ne sait pas à quel organe de la plante cette utilisation faisait référence. Dans tous les cas, l'emploi de racines de *Cannabis* pour traiter des maladies remonte à loin et a été répandu à travers le globe.

Ces racines représentent de 30 à 50% de la biomasse de la plante mature (78). Les fleurs sont convoitées pour leur profil chimique, or les racines présentent un profil chimique tout aussi intéressant, certes pour différentes raisons. Elles contiennent une panoplie de métabolites spécialisés azotés. Ceux-ci ne sont pas en tous cas exclusifs à ce tissu, mais y sont particulièrement concentrés. Plusieurs de ces métabolites sont également produits par d'autres espèces, mais quelques-uns n'ont été identifiés que chez *Cannabis*. Parmi ces molécules azotées d'intérêt on retrouve des amides d'acide hydroxycinnamique (phénylamides), des lignanamides et des alcaloïdes à proprement dit. Ces molécules ont des activités biologiques établies, mais demeurent grandement inexplorées.

1.6.1 Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques sont membres de la grande famille des phénylpropanoïdes. Ils ont un groupement phényle, avec une ramification acide carboxylique de 3 carbones (propanoïque), formant un squelette C6-C3 (Figure 1.4A) (60). Le précurseur des acides hydroxycinnamiques est l'acide cinnamique, qui est lui-même obtenu de l'acide aminé L-phénylalanine par l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL, Figure 1.4B) (61). Les acides hydroxycinnamiques les plus communs sont l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique (79). Les acides hydroxycinnamiques ont plusieurs activités biologiques, la plus frappante est leur capacité antioxydante, influencée par la position et le nombre des hydroxylations sur la portion aromatique (Figure 1.4B) (79). Étant présents dans les fruits et les légumes, ils contribuent à la prévention de maladies issues du stress oxydatif, notamment cardiovasculaires, neurodégénératives et cancéreuses (60). Les acides hydroxycinnamiques présentent également des activités anti-inflammatoire, antiproliférative, anti-âge et antiplaquettaire, parmi d'autres (79). Ces activités biologiques sont reflétées dans les métabolites dérivés des acides hydroxycinnamiques (Tableau 1.2). Dans un contexte cellulaire, ces derniers se retrouvent généralement condensés ou estérifiés; la condensation implique le plus souvent des amines, issues des acides aminés aromatiques ou des polyamines (79-81). Les acides hydroxycinnamiques ont une potentielle application en nutraceutique, notamment dû à leurs activités antioxydante, anti-inflammatoire, anti-élastase, anti-tyrosinase et photoprotectrices (82).

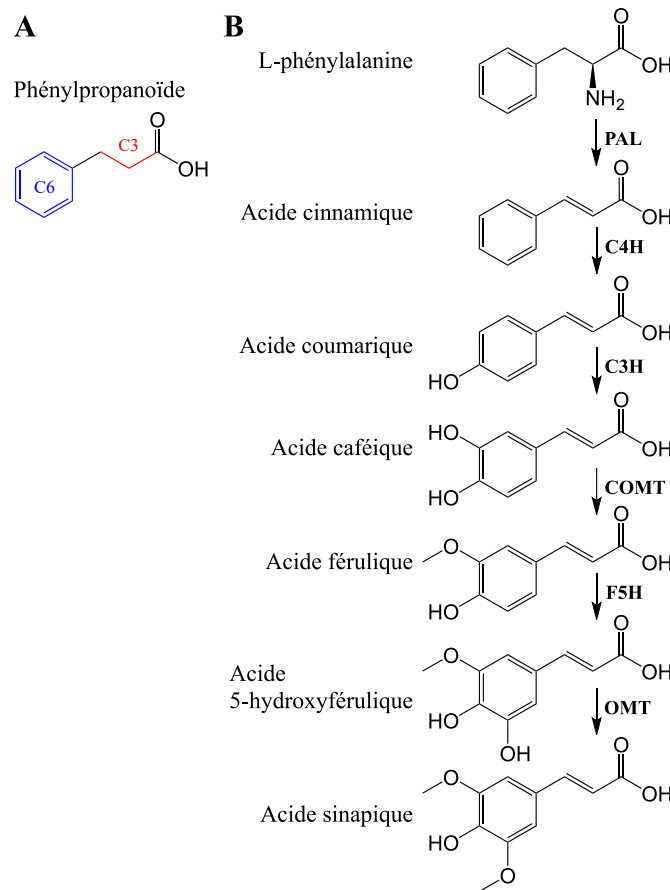


Figure 1.4 : Résumé de la voie de biosynthèse proposée des acides hydroxycinnamiques.

A) Schéma d'un phénylpropanoïde. B) Voie biosynthétique proposée des acides hydroxycinnamiques. La voie du shikimate aboutit à la production d'acide aminé aromatique, dont la L-phénylalanine. La PAL engage la L-phénylalanine dans la voie des phénylpropanoïdes par sa désamination, formant l'acide cinnamique. Plusieurs hydroxylations peuvent être réalisées à partir de l'acide cinnamique, formant l'acide coumarique (*-p*, *-o*, *-m* dépendamment de la position) et la C3H produit de l'acide caféique. Ce dernier peut être méthylé en position 3 pour former l'acide férulique. Puis, une fois hydroxylé en position 5 par la F5H, l'acide 5-hydroxyférulique peut être méthylé sur ce même groupement, formant l'acide sinapique. PAL, phénylalanine ammonia-lyase. C4H, cinnamate 4-hydroxylase. C3H, 4-coumarate 3-hydroxylase. COMT, Caféoyl-*O*-méthyltransférase. F5H, férulate 5-hydroxylase. OMT, *O*-méthyltransférase.

1.6.2 Polyamines

Les polyamines sont des métabolites généraux, caractérisées par la présence d'au moins deux groupements amine sur une chaîne aliphatique (80). Elles sont nécessaires au bon fonctionnement cellulaire et leur ubiquité atteste de leur nécessité (83). Elles sont produites à partir de la putrescine et d'un donneur de groupement aminopropyle. La putrescine elle-même est obtenue via les acides aminés L-arginine et L-ornithine, ce dernier étant non-protéinogène, tandis que le groupement aminopropyle provient d'une *S*-

adénosylméthionine (SAM) décarboxylée (Figure 1.5). Comme elles portent plusieurs atomes d'azote, les polyamines ont une capacité cationique en conditions physiologiques. Cette propriété des polyamines leur confère un rôle de prédilection dans la gestion des stress de natures diverses et la stabilisation de macromolécules, leur implication dans la gestion du stress oxydatif est d'ailleurs bien établie (84). Leur anabolisme permet la capture des espèces réactives à l'oxygène (ERO), tandis que leur catabolisme génère ces mêmes ERO par l'entremise de deux types d'enzymes, les diamines oxydases de cuivre (CuAOs) et les polyamines oxydases (PAOs) (84). Elles sont également produites dans des conditions carencielles, de températures extrêmes, de salinité élevée, de sécheresse, *etc.* (84). Les polyamines sont impliquées dans de nombreux processus, entre autres la réplication cellulaire, la mort cellulaire programmée, le mûrissement des fruits et la différenciation du xylème (85-87). Ainsi, les polyamines assimilées par l'alimentation sont d'une importance élevée pour la santé et la prévention de maladies, particulièrement celles se développant avec l'âge, comme les maladies cardiovasculaires et les cancers (88). Cette classe de molécules possède un potentiel dans les secteurs agricole, cosmétique, alimentaire et de la santé.

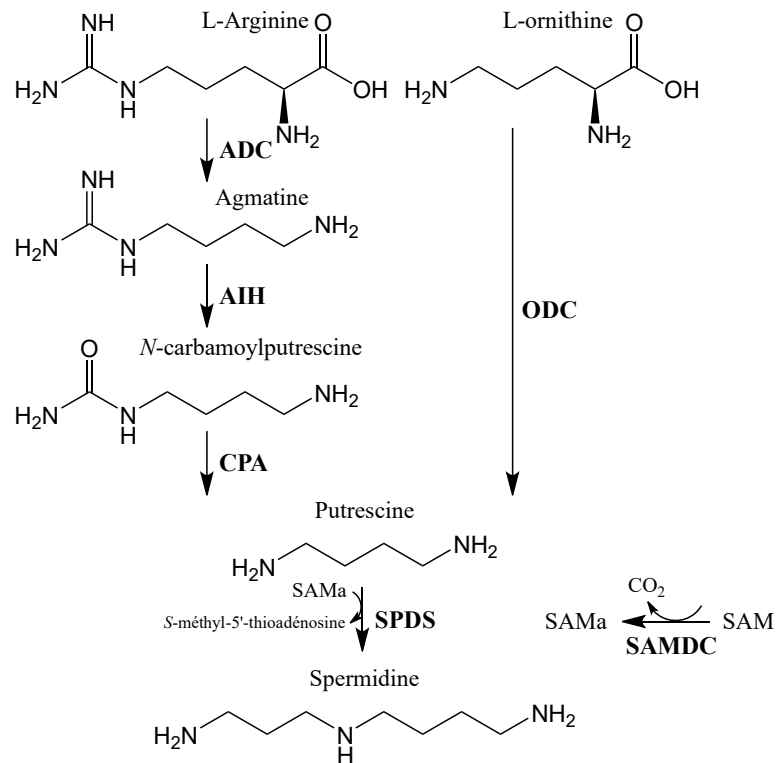


Figure 1.5 : Résumé de la voie de biosynthèse présumée de la spermidine.

La putrescine peut être produite en une étape par la décarboxylation de l'ornithine. L'arginine décarboxylée par l'ADC produira de l'agmatine. Celle-ci sera hydrolysée via l'AIH, libérant de l'ammoniaque et du N-carbamoylputrescine. La putrescine peut être obtenue par la libération d'ammoniaque et de CO_2 du N-carbamoylputrescine par la CPA. Un groupement aminopropyle

est nécessaire à la SPDS. Celui-ci est obtenu par la décarboxylation de SAM par la SAMDC pour former SAMa. La SPDS vient ajouter le groupement aminopropyle de SAMa à la putrescine, formant la spermidine. ADC, arginine décarboxylase. AIH, agmatine imino-hydrolase. CPA, *N*-carbamoylputrescine amidase. SAM, S-adenosylméthionine. SAMa, S-adenosylméthioninamine. SPDS, spermidine synthase. ODC, ornithine décarboxylase.

1.6.3 Amides d'acide hydroxycinnamique

Les amides d'acide hydroxycinnamique sont une famille de molécules répandue dans le règne végétal, issues de la condensation entre une amine et un acide hydroxycinnamique (Figure 1.6) (81). Comme les acides hydroxycinnamiques et les amines pouvant être condensés sont multiples, notamment puisque les polyamines peuvent être multi-substituées, les amides d'acide hydroxycinnamique présentent une diversité considérable. Une enzyme appelée *N*-hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transférase (HTH) est responsable de la condensation d'un acide hydroxycinnamique avec la tyramine chez les *Solanaceae* (89, 90). Cependant, aucun gène n'a été caractérisé chez *C. sativa* pour la production des amides d'acide hydroxycinnamique. Ces derniers sont fortement impliqués dans la défense végétale, où leur accumulation vient participer à l'enclenchement de la réponse hypersensible, un mécanisme végétal de mort cellulaire visant à limiter l'étendue d'une infection (91, 92). Ainsi, ces molécules peuvent servir de biomarqueurs de résistances à des pathogènes. Ils sont aussi impliqués dans différents processus physiologiques, comme l'embryogénèse, l'organogénèse, l'initiation et le développement de la floraison, la sénescence des feuilles et le mûrissement des fruits (80, 93). Pour les plantes, ils exercent une activité antimicrobienne, à la fois directe et indirecte, notamment due à l'entrave générée par leur présence dans la paroi cellulaire, qui s'y voit par ailleurs renforcée (80). D'un point de vue médical, plusieurs activités ont été rapportées pour les amides d'acide hydroxycinnamique du *Cannabis*, les plus notables étant anti-inflammatoire, antiproliférative, antioxydante, anti-diabétique, anti-tyrosinase, anticholinestérase et neuroprotectrice (Tableau 1.2) (65).

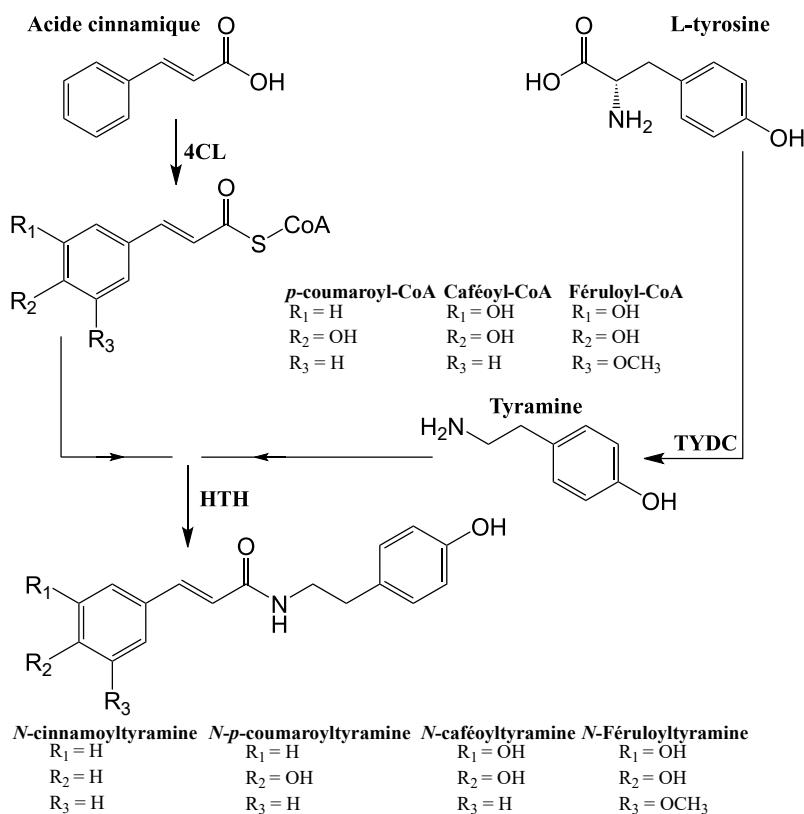


Figure 1.6 : Résumé de la voie de biosynthèse proposée des amides d'acide hydroxycinnamique.

La L-tyrosine produite par la voie du shikimate est décarboxylée en tyramine par la TYDC. Les acides hydroxycinnamiques peuvent être condensés à la tyramine par une HTH, seulement une fois qu'ils sont sous forme de thioester par l'action d'une 4CL. La *N*-cinnamoyltyramine et la *N*-sinapoyltyramine n'ont pas été rapportés chez *C. sativa*. TYDC, tyrosine décarboxylase. 4CL, 4-coumarate CoA ligase. HTH, *N*-hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transférase.

1.6.4 Lignanamides

Les lignanamides sont dérivés des amides d'acide hydroxycinnamique et sont trouvés abondamment chez les *Cannabaceae* et les *Solanaceae* (Figure 1.7) (94). Ils constituent une classe de molécules fortement impliquées dans la défense contre les pathogènes, particulièrement les champignons (94), mais sont également produits en réponse à des stress abiotiques (95). Ils présentent des activités d'intérêt médical *in vitro*, comme anti-inflammatoire, anti-oxydant, anticholinestérase, antiprolifératif et anti-tyrosinase (Tableau 1.2) (65, 94, 96). En revanche, les études sur leur activités *in vivo* sont éparées. Un couplage oxydatif serait responsable de leur biosynthèse, or aucune enzyme pouvant catalyser cette réaction n'a été caractérisée chez *Cannabis*, ni dans d'autres espèces à ce jour. Cependant, certains chercheurs ont émis l'hypothèse que des protéines dirigeantes, qui comme leur nom suggère, confèreraient la stéréosélectivité en dirigeant les substrats, pourraient être

impliquées, tandis que des cytochromes P450 (CYP450) ou des laccases oxyderaient les substrats (Figure 1.7) (94). La plupart des lignanamides sont homodimériques, mais on retrouve aussi des exemples hétérodimériques.

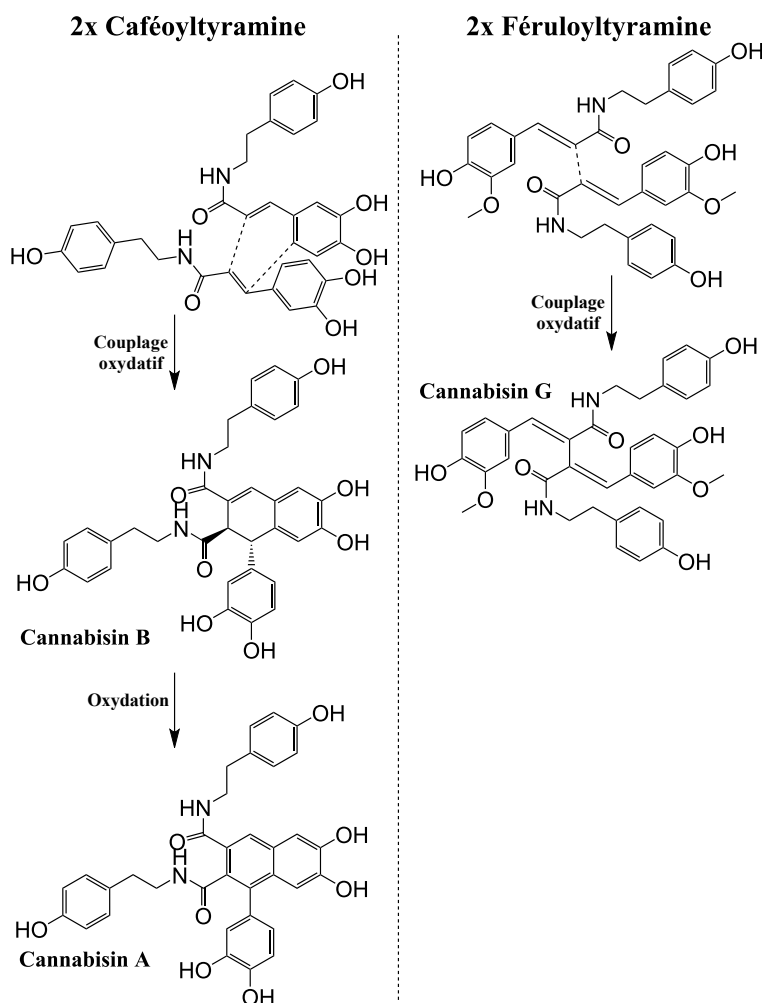


Figure 1.7 : Résumé de la voie de biosynthèse putative des lignanamides.

Les lignanamides sont formés à partir d'unités d'amides d'acide hydroxycinnamique. Le couplage oxydatif putatif engendre parfois de la chiralité.

1.6.5 Alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine

Les alcaloïdes caractérisés chez *C. sativa* sont au nombre de deux, très similaires en structure. Ils semblent être constitués d'une molécule de spermidine formant un hétérocycle de 13 atomes avec un acide gras de 14 carbones (Figure 1.8) (45). La spermidine est une triamine, faisant donc partie de la famille des polyamines. Cette molécule participe donc à la croissance et au développement cellulaire, en plus d'alléger le fardeau de divers stress. Elle est directement impliquée dans la santé de la cellule, du début à sa fin. Elle est active lors de la division cellulaire, où elle est nécessaire à l'hypusination. Additionnellement, la spermidine jouerait un rôle dans le développement des tubes

polliniques, où des amides d'acide hydroxycinnamique de spermidine serviraient à leur croissance (97). Elle participe également dans la régulation de la maturation des fruits et la prévention de la sénescence.

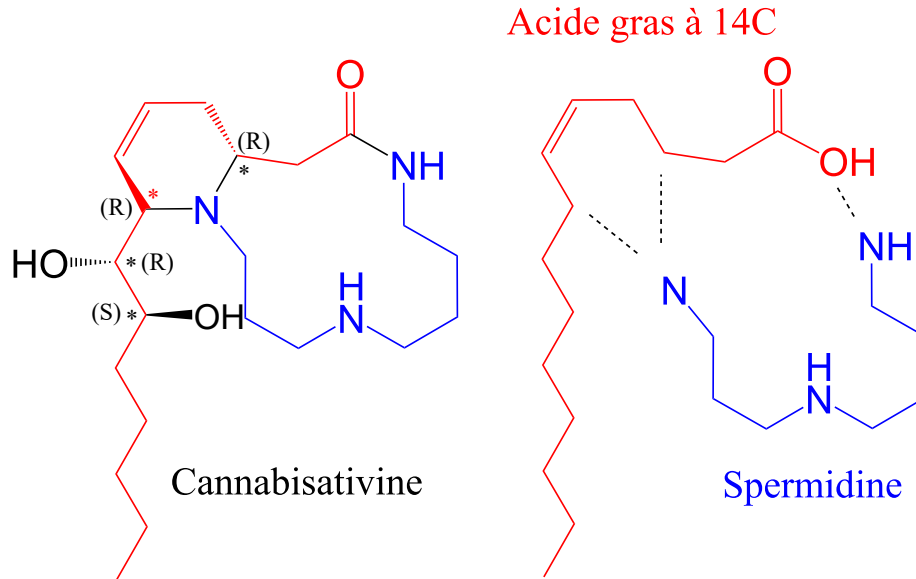


Figure 1.8 : La cannabissativine est présumée être biosynthétisée à partir d'une molécule de spermidine et d'un acide gras à 14 carbones.

La cannabissativine et l'anhydrocannabissativine ont été caractérisées en 1976 et 1978 respectivement (98, 99). Elles ont toutes deux été purifiées des racines et des feuilles de *C. sativa*. Les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine ont des analogues dans des espèces du genre *Equisetum*, mais demeurent *a priori* uniques à *C. sativa*. Malgré un bon moment depuis leur découverte et la notoriété des alcaloïdes en général, étrangement peu d'engouement suivit.

Depuis les 10 dernières années, les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine de *C. sativa* apparaissent dans une poignée d'articles testant des extraits de racines, où les alcaloïdes sont identifiés par leur spectre de masse lors d'analyses HPLC-MS/MS. Dans une publication de 2022, quatre extraits aqueux de racines ont été testés sur des souris mâles dans des modèles de toux induite par l'acide citrique et d'expectorations au phénol rouge. Tous les extraits présentaient une activité antitussive et expectorante, bien que variable en efficacité, selon la variabilité de la composition des extraits (100). Dans une autre étude testant des extraits aqueux de racines sur un modèle de dysménorrhée primaire, les chercheurs ont observé une diminution du nombre de contractions induites par l'ocytocine, sans élargissement significatif de l'utérus, pour des extraits de racines à 25 et 50 mg/kg (101). De plus, lorsque des médicaments pour la dysménorrhée étaient

administrés en sous-doses (acide méfénamique, scopolamine, nifédipine), 12,5 mg/kg de l'extrait produisait un effet significatif sur la réduction des contractions, suggérant un effet adjuvant.

Une étude de notre groupe de recherche à l'UQTR, publiée en 2024, a testé différents extraits de racines, à savoir aqueux, éthanolique et acide-base, afin de vérifier leur potentiel antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobien et anticholinestérase (78). Les extraits de racines, soit cultivées en terre ou en hydroponie, ont été testés sur des cellules THP-1 activées par des lipopolysaccharides (LPS), afin de vérifier leur activité anti-inflammatoire. Les LPS, se retrouvant à la surface de bactéries Gram négatives, sont des toxines qui sont exploitées pour stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires, servant dans le développement de modèles inflammatoires animal (102). Dans le cas de Gagné *et al.* (2024), l'interleukine 6 (IL-6) a été mesurée par ELISA et les extraits acido-basique et aqueux de racines cultivées en terre ont significativement réduit leur concentration. Cet effet n'a cependant pas été observé pour les extraits de racines hydroponiques. La galanthamine, un alcaloïde des *Amaryllidaceae*, dont la prodroque (Zunveyl®) est approuvée par la U.S. Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des symptômes de la maladie d'Alzheimer, avait été utilisée comme contrôle positif. Les extraits de racines cultivées en terre avaient une activité inhibitrice comparable à la galanthamine pour l'enzyme butyrylcholinestérase et une inhibition presque deux fois plus importante pour l'acétylcholinestérase. Cette étude a également avancé un potentiel antimicrobien des extraits de racines, particulièrement contre les champignons. Dans la même veine, des chercheurs de l'Argentine ont publié en 2025 les résultats de tests biologiques d'extraits enrichis en alcaloïdes de racines de *C. sativa* (extraits acido-basiques). Ils sont parvenus à isoler les deux alcaloïdes connus de *Cannabis* et à valider leur activité d'inhibition de la butyrylcholinestérase. Dans cette étude, une sous-fraction de l'extrait enrichi en alcaloïdes possède une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) plus faible pour la butyrylcholinestérase ($13,40 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$) que les alcaloïdes macrocycliques isolés ($26,38 \pm 0,95$ et $24,97 \pm 1,08 \mu\text{g/mL}$ pour la cannabissativine et l'anhydrocannabissativine respectivement) (71). Ceci suggère que la sous-fraction était plus efficace pour inhiber l'enzyme que les alcaloïdes seuls, il est donc possible que d'autres molécules contribuent à l'effet global observé ou que les alcaloïdes en question soient plus efficaces lorsque combinés.

Les résultats de ces récentes études suggèrent des activités anti-dysménorrhée, antitussive, expectorante, neuroprotectrice, anti-inflammatoire, antimicrobienne et antioxydante des racines, comme le suggère les applications traditionnelles. Cependant, la diversité chimique des extraits ne nous permet pas de connaître les molécules responsables de ces activités.

1.7 Problématique, question de recherche, hypothèses et objectifs

1.7.1 Problématique

Les réalités contemporaines nous confrontent à plusieurs enjeux auxquels *C. sativa* peut contribuer positivement. L'environnement, les troubles de santé physique et mentale, le logement, le gaspillage industriel et la malnutrition pour en nommer quelques-uns. Nous sortons à peine d'une ère prohibitive pour le *Cannabis* et commençons à prendre conscience de l'ampleur de notre ignorance sur cette espèce. Cette ignorance, tel que j'ai tenté de l'illustrer à la section 1.4, est selon mon estimation le produit d'une attention disproportionnée sur l'aspect psychoactif de la plante, plus précisément sur le THC. De nombreuses études ont été menées pour mieux comprendre ce cannabinoïde, mais au final on ne connaît pas mieux la plante en tant qu'espèce, seulement en tant que drogue. D'autant plus que *C. sativa* fait partie de la même famille qu'une autre espèce commercialement importante, le houblon commun (*H. lupulus*). Ne serait-il pas avantageux d'en savoir plus sur ces espèces pour mieux les utiliser? Et n'est-il pas vrai que d'en savoir sur les espèces leur ressemblant le plus le serait également? Considérant d'ailleurs qu'avec le temps, *C. sativa* deviendra aussi une espèce économiquement imposante, il est impératif d'explorer des avenues de revalorisation de sa biomasse, sans quoi le gaspillage crève-cœur qui s'opère actuellement en industrie, qui est encore très axée sur son activité psychoactive, ne fera que continuer à s'aggraver.

À travers ses organes, la plante produit un nombre impressionnant de molécules aux activités biologiques puissantes et relatives à des conditions prévalentes, qui pourraient aisément trouver une application. Parmi elles, dans la mire de ce travail, les métabolites spécialisés azotés de racines, plus précisément les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine. Ces molécules ont un potentiel dans le traitement de maladies qui prennent de l'ampleur (p. ex. maladie d'Alzheimer). Or très peu est connu sur ces molécules, et sans doute pour cette raison, peu d'études sont publiées à leur sujet; cette réalité limite leur visibilité et conséquemment, la réalisation de leur potentiel. Ils ont été caractérisés chimiquement, mais leur rôle biologique *in planta*, leur voie de biosynthèse, leur activité biologique et ce qui stimule leur production demeurent essentiellement inconnus. La connaissance des gènes (et conséquemment des enzymes) qui permettent la biosynthèse des alcaloïdes du *Cannabis* représenterait une percée très pertinente. Une telle découverte faciliterait précisément la dissipation du brouillard régnant sur ces molécules : leur rôle biologique, leur(s) tissu(s) de biosynthèse, le point culminant de leur accumulation, tout en ouvrant la voie à la possibilité d'élucider la voie de biosynthèse complète. Dans l'éventualité d'une caractérisation totale d'une voie biosynthétique, il est possible de la transposer dans un organisme hétérologue, afin de produire des métabolites d'intérêt dans des conditions plus contrôlées et dans certains cas, plus écoresponsables. En théorie, il serait relativement aisé de déterminer l'activité biologique de ces alcaloïdes et de quantifier leur abondance dans différents organes de la plante avec un standard chimique. Cependant,

il nous fut très difficile de trouver de telles offres pour la cannabissativine et son analogue. Conséquemment, le peu d'offres disponibles présentait des prix irréalistes pour nos moyens (qui d'ailleurs auraient servi à démarrer la production des standards, pour donner une idée de leur inaccessibilité).

Question de recherche :

Par l'entremise de quels gènes et précurseurs biosynthétiques *C. sativa* arrive-t-elle à produire des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine? Plus largement, la question de recherche implique aussi les gènes biosynthétiques des phénylamides et des lignanamides.

1.7.2 Hypothèses :

- Les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine de *C. sativa* peuvent être suffisamment purifiés pour produire des standards chimiques par l'emploi de techniques chromatographiques.
- Les gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites spécialisés azotés peuvent être mis en évidence par une analyse de co-expression regroupant ces premiers avec des gènes présumés être impliqués en amont de leur voie, notamment les gènes biosynthétiques de la spermidine, des acides gras polyinsaturés et des acides hydroxycinnamiques.

1.7.3 Objectifs

Objectifs généraux :

1. Réaliser une revue de littérature sur les métabolites spécialisés azotés des racines de *C. sativa*.
2. Isoler les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine.
3. Identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites spécialisés azotés.

Objectifs spécifiques :

- 2.1 Extraire les alcaloïdes des racines de *Cannabis*.
- 2.2 Purifier l'extrait de racines en employant diverses techniques chromatographiques, notamment la chromatographie sur colonne et sur couche mince préparative.
- 2.3 Isoler les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine du *Cannabis* afin de produire des standards chimiques pour palier à leur manque.
- 2.4 Détecter les alcaloïdes par HPLC-MS/MS et générer leur spectre de masse.

- 3.1 Parcourir les bases de données publiques pour construire une librairie de données transcriptomiques pertinentes.
- 3.2 Construire un réseau de co-expression afin de déterrer des gènes possiblement impliqués dans la biosynthèse de métabolites spécialisés azotés du *Cannabis*.
- 3.3 Valider la candidature des gènes dévoilés par phylogénie, analyse de séquences multiples et comparaison des structures tertiaires.

La poursuite de ces objectifs de recherche a mené à la publication d'un article de revue de littérature sur les métabolites spécialisés azotés et phénoliques du *Cannabis* (Chapitre V – Annexe) dans le journal *Plants*. De plus, les résultats de cette recherche ont débouché à la rédaction d'un manuscrit, présenté au chapitre suivant.

2 Chapitre II – Article de recherche

Co-expression network analysis reveals candidate genes associated with Nitrogenous Specialized Metabolism of *Cannabis sativa* L. Roots.

2.1 Article scientifique

Raphaël Boucher¹, Karen C. Gonçalves dos Santos¹, Sarah-Ève Gélinas¹, Alexandre Custeau¹, Hugo Germain¹ & Isabel Desgagné-Penix¹

¹ Département de chimie, biochimie, physique et sciences forensiques, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada

* Correspondence: Isabel.Desgagne-Penix@uqtr.ca

Keywords: Alkaloids¹; hydroxycinnamic acids²; plant defense³; transcriptomics⁴; cannabisativines⁵.

Le manuscrit constituant ce chapitre est en cours de préparation et sera éventuellement soumis au journal scientifique BMC Plant Biology.

2.2 Contribution des auteurs

Le projet, supervisé par la Professeure Isabel Desgagné-Penix, a été conçu par celle-ci, ainsi que Raphaël Boucher, Karen C. Gonçalves dos Santos et Sarah-Ève Gélinas. L'écriture initiale du manuscrit fut entreprise par Raphaël Boucher. Le travail d'extraction et de purification fut réalisé par Raphaël Boucher. Les analyses HPLC-MS/MS furent effectuées par Sarah-Ève Gélinas et Alexandre Custeau. L'acquisition des données transcriptomiques a été faite par Raphaël Boucher. Le traitement des données transcriptomiques et la construction du réseau de co-expression ont été réalisés par Karen C. Gonçalves dos Santos. Le réseau de co-expression fut analysé par Raphaël Boucher. Le manuscrit a été révisé par la totalité des auteurs.

2.3 Résumé

Background : *Cannabis sativa* L. produit des centaines de métabolites spécialisés, les phytocannabinoïdes étant sans doute les plus connus. Cependant, ses métabolites azotés spécialisés restent largement sous-explorés. Particulièrement concentrés dans les racines, les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine et les amides d'acide hydroxycinnamique suscitent un intérêt particulier en raison de leurs activités biologiques rapportées. Afin d'identifier de nouveaux gènes candidats dans la biosynthèse de métabolites spécialisés azotés du *Cannabis*, une investigation métabolomique des racines, combinée à une analyse de co-expression avec des données transcriptomiques publiques ont été réalisées.

Résultats : La chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) a permis l'identification putative des alcaloïdes dérivés de la spermidine cannabissativine et anhydrocannabissativine dans des racines cultivées en hydroponie. Le réseau de co-expression généré à partir du quintile le plus variable de gènes exprimés a révélé un module enrichi dans les racines, contenant des *Tyrosine Décarboxylases* ainsi que des gènes codant pour des oxydoréductases putatives telles que des *Mono- et Dioxygénases*, une *Berberine Bridge Enzyme*, des *Cytochromes P450*, ainsi qu'une *Spermidine Acyltransférase*, une *Dirigent-like Protein*, *Short-chain Dehydrogenases* et des *Bet v1*.

Conclusion : Ces résultats amènent des gènes candidats associés au métabolisme spécialisé azoté de *C. sativa* L. et établissent une avenue pour la caractérisation fonctionnelle de la voie de biosynthèse des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine.

2.4 Abstract

Background: *Cannabis sativa* L. produces hundreds of specialized metabolites, phytocannabinoids being the most well known, yet its nitrogenous specialized metabolites remain largely unexplored. Among these compounds, macrocyclic spermidine alkaloids and hydroxycinnamic acid amides have attracted interest because of their reported biological activities and apparent enrichment in roots. To identify novel biosynthetic candidate genes potentially involved in *Cannabis* nitrogenous specialized metabolism, we combined metabolomic analyses of roots with transcriptome-wide co-expression network analysis using publicly available transcriptomic datasets.

Results: High-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) provided putative identification of the macrocyclic spermidine alkaloids cannabissativine and anhydrocannabissativine in hydroponically grown roots. A co-expression network generated from the most variable quintile of expressed genes revealed a root-enriched module containing *Tyrosine Decarboxylases* together with genes encoding putative oxidoreductases like *Mono- and Dioxygenases*, a *Berberine Brige Enzyme-like*, *Cytochrome P450s*, alongside a *Spermidine Acyltransferase*, *Dirigent-like Protein*, *Short-chain Dehydrogenases* and *Bet v1* genes.

Conclusions: These findings provide candidate genes associated with *C. sativa* L. nitrogenous specialized metabolism and establish a framework for future functional characterization of macrocyclic spermidine alkaloid biosynthesis.

2.5 Background

Cannabis sativa L., an iconic plant amongst the oldest domesticated species, has been exploited by human civilizations for millennia (3). It is a multifunctional crop cultivated around the world, surviving in vastly different climates, with applications including nutraceutical, medical, textile and construction (2, 22, 103-106). *C. sativa*'s specialized metabolism allows it to deal with abiotic stresses and fight invasions and infections of various origins (107). So far, over 550 compounds have been isolated from this species (22, 106), including over a hundred cannabinoids and terpenic compounds, dozens of phenolic compounds, and nearly a dozen nitrogenous specialized metabolites (NSM) (22, 108, 109). Additionally, three other NSM were reported, but never fully characterized (Klein, Rapoport, and Elliott 1971). Whilst significant attention is devoted to major phytocannabinoids tetrahydrocannabinolic acid and cannabidiolic acid, many *C. sativa* specialized metabolites are severely neglected in research, namely alkaloids.

Many studies have reported the presence of NSM in leaves, seeds, and especially in roots of several *Cannabis* cultivars (21, 65, 98, 99, 106, 110, 111). Among these compounds are macrocyclic spermidine alkaloids (MSA) and hydroxycinnamic acid amides (phenylamides) (Figure 2.9). The MSA cannabissativine and anhydrocannabissativine, as well as hydroxycinnamic acid amides and their dimers (e.g. cannabissins), evoke therapeutic potential because of reported biological activities (71, 98, 99). Hydroxycinnamic acid amides are the condensation products of a phenolic acid (e.g. hydroxycinnamic acid) with an amine (aromatic or polyamine) by inducible hydroxycinnamoyl transferases (80), and pathogen infection favors their production in plants (112-114), (Figure 2.9). These amides and their dimers are reported to exhibit antiproliferative, anti-inflammatory, neuroprotective and antimicrobial activities (65). Spermidine-derived alkaloids can be aliphatic or cyclic, and they occur commonly in nature, possessing a very large taxonomical range, reported in bacteria, marine organisms, plants, fungi, and animals (115, 116). They typically exhibit structures suggesting a condensation between spermidine and hydroxycinnamic acids or fatty acids of various sizes. MSA can display heterocycles of many sizes, ranging from 7 to 24 atoms; *C. sativa* MSA classify as 13-atom heterocycles, forming a dihydroperiphyllin skeleton, allegedly from spermidine and a 14C α,β -unsaturated fatty acid, (Figure 2.10) (116). Regarding the pharmacology of spermidine alkaloids, the polyamine moiety suggest they may be bioactive, showing potential in neuroprotection, inflammation mitigation and hypoglycemia through AMPK pathway activation (116, 117). *Cannabis* MSA in particular have been reported

as potential drug candidates for butyrylcholinesterase inhibition, a molecular target in Alzheimer's disease treatment (71).

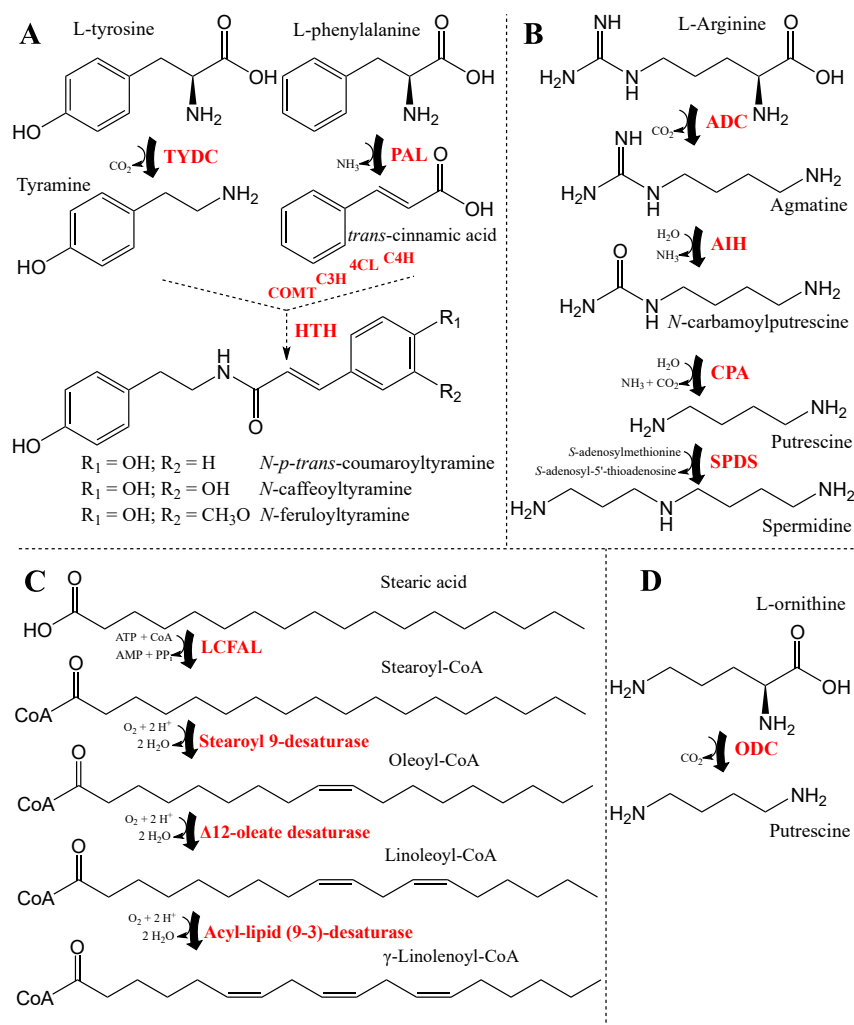


Figure 2.9: Proposed biosynthesis for precursors of *C. sativa* nitrogenous specialized metabolites.

Putative biosynthetic pathway for A) hydroxycinnamic acid amides, B) spermidine, C) polyunsaturated fatty acids, and D) putrescine. Enzymes are shown in red. A solid arrow represents one enzymatic reaction whereas a dashed arrow represents multiple enzymatic steps. Abbreviations are TYDC, tyrosine decarboxylase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, $trans$ -cinnamate 4-monooxygenase; C3H, 4-coumarate 3-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate-CoA ligase; COMT, caffeate O-methyltransferase; HTH, N -hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N -(hydroxycinnamoyl)transferase; ADC, arginine decarboxylase; AIH, agmatine deiminase; CPA, N -carbamoylputrescine amidase; SPDS, spermidine synthase, LCFAL, long-chain fatty acid CoA-ligase; ODC, ornithine decarboxylase.

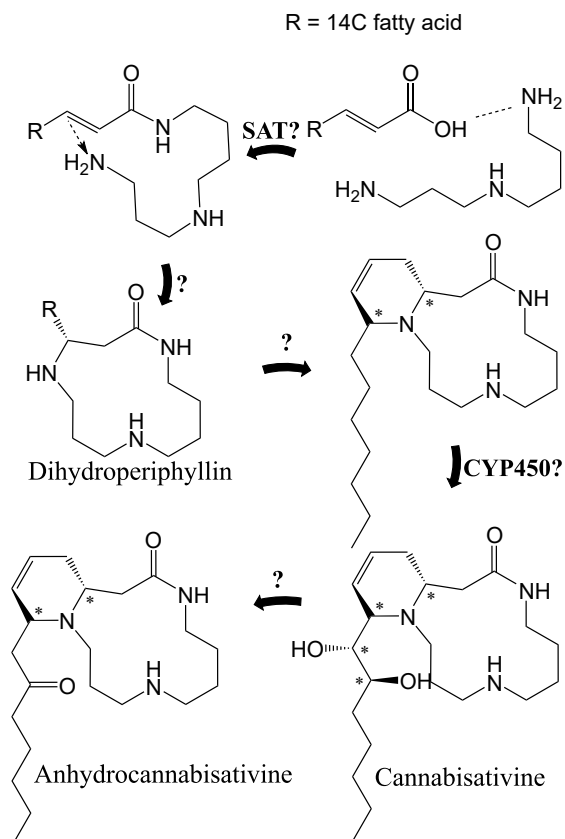


Figure 2.10. Expected reaction sequence of *C. sativa* macrocyclic spermidine alkaloids' biosynthesis. Gap in knowledge and expected sequence in biosynthesis of cannabisativine. Question marks represent expected but unknown enzymes. SAT, spermidine acyltransferase; CYP450, cytochrome P450.

Even with valuable bioactivity of *Cannabis* NSM, little research has been conducted on their biosynthesis. In addition, roots inevitably produced by cultivators in the legal cannabis market are often considered as waste despite their lengthy therapeutical history and contemporary relevance (111). Identification of genes involved in NSM biosynthetic pathways could help the understanding of their biological role *in planta*, allow identification of their precursors, and facilitate studies on their therapeutic properties. It would allow deepened elicitation studies, permitting measurement of metabolite levels, but also gene expression.

Given the potential applications of NSM, they could be useful for drug discovery in semi synthesis. However, extraction of natural products has its share of complexities and constraints, such as low yields and efficiency, high cultivation demand, and solvent usage. Heterologous expression is a decent alternative for drug production, but as pathway elucidation is a prerequisite, biosynthetic genes must first be known.

Here, we extracted two known MSA from *C. sativa* roots and, through gene co-expression analysis, uncovered genes which may be involved in the biosynthesis of NSM, paving the way for *C. sativa* MSA biosynthetic pathway elucidation.

2.6 Methods

2.6.1 Metabolomics

2.6.1.1 Chemicals

The following chemicals were acquired and used to generate the results presented in this manuscript. Methanol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), chloroform (Honeywell, Charlotte, USA), diethyl ether (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), glacial acetic acid (Anachemia, Montréal, Canada), bismuth (III) nitrate pentahydrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), potassium iodide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), sulfuric acid (Avantor, Radnor, USA), ammonium hydroxide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), *N-p-trans*-coumaroyltyramine (MedChemExpress, New Jersey, USA), SilicaFlash F60 irregular silica gels (Silicycle, Québec, Canada), TLC aluminium sheets 20x20 cm silica gel 60 F₂₅₄ indicator (Merck, Darmstadt, Germany), glass backed TLC 60Å, 20X20 cm, 2000 µm, F₂₅₄ indicator (Silicycle, Québec, Canada), LC-MS grade methanol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), LC-MS grade formic acid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

2.6.1.2 Dragendorff's reagent

The Dragendorff's reagent was prepared by combining solution A and solution B. Solution A consists of 0.01 M of bismuth subnitrate in 20% acetic acid. Solution B consists of 2.4 M of KI. The reagent was applied dropwise with a pipette, in quantities sufficient to cover the TLC plate.

2.6.1.3 Plant material

C. sativa roots of high tetrahydrocannabinolic acid-producing variety Garlic Chem grown hydroponically (37 kg fresh weight) were obtained from a commercial grower (SUMO Cannabis, Trois-Rivières, Québec, Canada) and were air-dried (21-23°C) until friable (1.5 kg).

2.6.1.4 Extraction and partitioning of *Cannabis* roots

Cannabis roots were ground to a powder (1 mm pore size) using an industrial grinder. This powder was extracted with methanol using a ratio of approximately 12 mL per gram (dry weight). Vacuum filtration was used to separate the extract from root powder, taking care to strain the roots with cheesecloth first to avoid clogging the filter. Crude extract, obtained after filtration and rotovap (Heidolph, Schwabach,

Germany) evaporation of the methanol, was partitioned using chloroform and deionized water (1:1). The chloroform fraction was recovered, evaporated and again equally partitioned between diethyl ether and methanol-water (9:1). Both fractions were recovered for further purification steps.

2.6.1.5 Column purification

The methanol-water fraction was purified with a silica chromatography column of 50 x 5 cm². The silica filled up to 38 cm of the column. Eluant used for the separation of the fractions containing putative cannabistatine and anhydrocannabistatine constituted of a mix of chloroform and methanol, ranging from 0 to 10% methanol. The methanol was gradually increased by 2% every 250 mL of eluent. After 1.5 L of eluent, as 10% methanol was reached, it was periodically increased by 10% methanol to 100%, every 250 mL to flush out the column. Air pressure of 2.5 psi was added on top of the column to increase separation speed. 300 fractions of around 5 mL were collected, and a preliminary TLC analysis was performed on the collected fractions. Samples were pooled based on the preliminary TLC results, resulting in 26 fractions.

2.6.1.6 Preparative TLC

The putatively alkaloid-containing fraction F71 was dissolved in 1 mL of methanol and carefully deposited on the silica. Six sequential elutions were performed on F71 with a drying time of at least 24h between runs. The eluant was firstly chloroform, followed up by small (~2%) and irregular increases in methanol content up to 8%. UV light (254 nm and 365 nm) was used for revelation and selection of targeted compounds. Silica was retrieved by scraping it off with a small spatula and metabolites were extracted from the silica with methanol. Eight fractions were collected from F71. Purified fractions were analyzed on TLC using eluant ethyl acetate: methanol: water (8:1:1). Fractions reacting positively to the Dragendorff's reagent were subjected to an acid-base extraction following the method of Turner *et al.* (1976).

2.6.1.7 HPLC-MS/MS analysis

Analyses were performed using an Agilent Technologies 1260 Infinity II high-performance liquid chromatography (HPLC) system coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) detector and Agilent Jet Stream ionization source (Agilent, QC, Canada).

Separation of analytes was achieved using an Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18 column (4.6 x 100 mm, 2.7 mm) maintained at 30 °C, with an Agilent EC-C18 (4.6 x 5 mm, 2.7 µm) guard column (Agilent Technologies, QC, Canada). Five microliters of sample were injected per analysis, and mobile phases were made of (A) MilliQ H₂O

with 0.1 % HPLC-MS grade formic acid and (B) HPLC-MS/MS grade methanol with 0.1 % LC-MS grade formic acid, with a flow of 0.4 mL/min. The HPLC gradient program was set as follows: 0 min, 10 % B; 10.0 min, 10 % B; 20.0 min, 100 % B; 25.0 min, 100 % B. The total run time per sample was 30.0 min.

The parameters used for the MS/MS source were set as follows: gas flow rate 10 L/min, gas temperature 300 °C, nebulizer pressure 45 psi, sheath flow rate 11 L/min, sheath gas temperature 300 °C, capillary voltage +4000 V in ESI+ and nozzle voltage 500 V. Acquisition was done in positive ion mode. Agilent MassHunter Data Acquisition (version 1.2) and MassHunter Qualitative Analysis (version 10.0) softwares were employed for data acquisition and data analysis respectively. *N-p-coumaroyltyramine* was identified using a chemical standard. Since no chemical standard were available to confirm the identity of putative alkaloids, preliminary analyses were performed in full scan mode to allow targeting of compounds by extracting the $[M+H]^+$ of cannabistatine ($[M+H]^+ = 382$ m/z), and anhydrocannabistatine ($[M+H]^+ = 364$ m/z). Range of scan was set at 50-650 m/z, with a scan time of 500 ms, and fragmentor voltage of 100 V. HPLC-MS/MS fragmentation patterns of targeted compounds were obtained in Product Ion mode using the mass-to-charge ratio (m/z) of corresponding analyte, a fragmentor voltage of 100 V and a collision energy of 20 V.

2.6.2 Transcriptomics

2.6.2.1 RNA Data processing

Read files with plants grown in normal conditions were downloaded from NCBI's Sequence Read Archive and filtered and trimmed for quality control using fastp (version 0.23.4 (118)) with the following parameters: “--qualified_quality_phred 20 --unqualified_percent_limit 30 --cut_front_window_size 5 --cut_right_window_size 4 --cut_right_mean_qual 15 --length required 50”; for reads from bioproject PRJNA80055 (which were single-end reads of 35 bases) and sample SRR351932 (composed of single-end reads of 38 bases), minimum length post-trimming was set to 30 bases. Reads were aligned to *C. sativa*'s female genome (downloaded from Ensembl Plants release 61) using STAR (version 2.7.11b, (119)). Given the difference in average read lengths between the datasets, the genome indexing was done using several values for the splice junction overhang length: 30, 70, 90 and 144. After read mapping, read count files were combined into a count matrix using R 4.4.0 and the tidyverse package (version 2.0.0 (120)), which was used to compute Transcripts per Million (TPM) levels with rtracklayer and GenomicRanges.

For TPM computation, the GTF file was used to compute gene lengths (through exon overlap) using the Bioconductor (v3.20) packages rtracklayer version 1.66.0 (121) and GenomicRanges version 1.58.0 (122). An initial principal component analysis (PCA) was performed to assess distribution of samples, removing genes with undetectable expression across all samples. Minimum expression threshold was computed with the data-adaptive flag method (123) (implemented in the package CustomSelection version 1.1. (124)), which was used to remove weakly expressed genes. A principal component analysis was performed to assess distribution of samples using $\log_{10}$ TPM values.

2.6.2.2 Co-expression Network Construction

Co-expression network was computed with the SimpleTidy_GeneCoEx method (125). Briefly, mean TPM values were computed for each tissue, then the relative TPM variance of each gene across the tissues was calculated. The top 20% most variable genes were selected for construction of the network. Tissues' mean TPM values were converted into z-score, and these values were used for computation of a gene Pearson correlation matrix (using the package future version 1.34.0 (126)). Correlation significance was computed with T test and p-values were adjusted with False Discovery Rate (FDR), and correlations with $FDR < 0.01$ were considered significant, (Supplementary Figure S2.17). The correlation coefficient threshold selected was the lowest for which at least 90% of the gene-gene correlations were significant. Only positive correlations were considered for the network construction.

The network was then constructed using igraph version 2.0.2 (127) and clusters were detected with the function cluster_leiden from the leiden package version 0.4.3.1. Only clusters containing at least five genes were considered. To optimize the resolution parameter, cluster detection was performed with resolution ranging from 0.25 to 5.00, with 0.25 interval size. The best resolution was considered as the highest that still kept all genes in the network, (Supplementary Figure S2.18).

For genes in the modules of interest, predicted encoded protein sequences were retrieved from Ensembl Plants release 61 using biomaRt version 2.62.1 (128, 129). Protein domain search was performed using hmmer version 3.4 (130) against Pfam database release 37.0 (130). BLASTp was performed using blast+ version 2.14.0 against Uniprot SwissProt release 2024_01, with $e\text{-value} < 10^{-5}$ and $\text{max_target_seqs}=1$.

2.7 Results

2.7.1 Metabolomics

We first investigated *C. sativa* roots for NSM, more precisely MSA. The protocol from Turner *et al.* (1976) for extraction and chromatographic method was used, but it was modified by periodically increasing eluant polarity. A total of 26 fractions were collected from column purification, from which only nine fractions containing the targeted mass-to-charge ratios are shown, (Figure 2.11A). The fractions were analysed by HPLC-MS/MS and the hydroxycinnamic acid amide *N-p*-coumaroyltyramine (paprazine) was identified in fractions 13 & 20. We also detected two metabolites with corresponding $[M+H]^+$ consistent with cannabissativine and anhydrocannabissativine, 382 and 364 respectively. The amount of putative cannabissativine was highest in fraction 71 (F71), around 50% higher than the second highest one (*i.e.* F61), with the compound spanning across six consecutive fractions. Putative anhydrocannabissativine was highest in F41, spanning three consecutive fractions, and 11 times less abundant in F71 than F41. Thus, F71 was purified using preparative TLC to isolate putative cannabissativine.

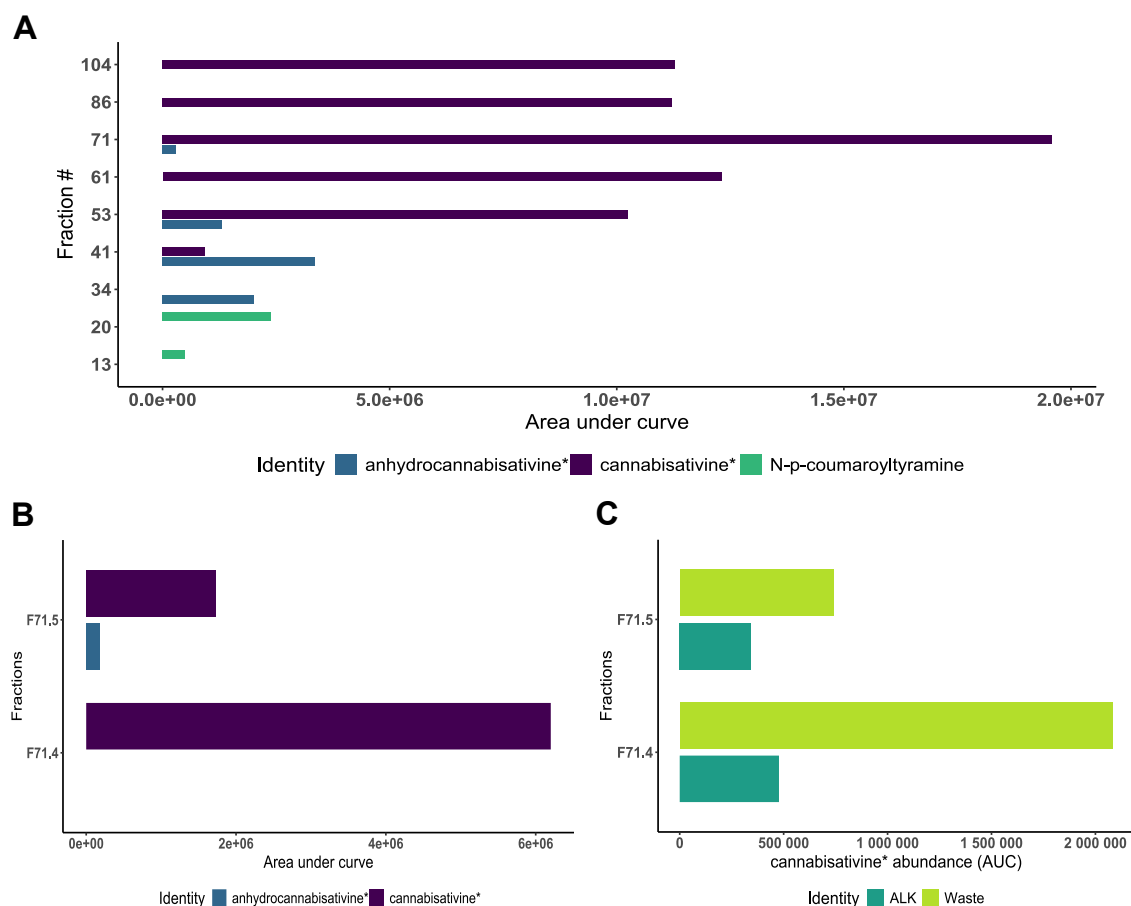


Figure 2.11: HPLC-MS/MS analysis of chromatographic and acid-base extraction purification steps of putative macrocyclic spermidine alkaloids.

Compounds marked with an asterisk (*) are putative and were identified based on precursor ion $[M+H]^+$ detected by HPLC-MS/MS in ESI+ mode. **A)** Column chromatography purification, anhydrocannabisativine* ($[M+H]^+ = 364$ m/z); cannabisativine* ($[M+H]^+ = 382$ m/z); *N-p-coumaroyltyramine*, **B)** Preparative TLC purification, **C)** Acid-base extraction purification, ALK: Alkaloid fraction, obtained with chloroform after alkalization of acidic aqueous fraction. Waste: Waste fraction, obtained with chloroform in acidic conditions, before alkalization of aqueous fraction.

From F71, eight sub-fractions were produced by retrieving the silica where metabolites were detected under UV lighting. All F71 sub-fractions were submitted to HPLC-MS/MS analysis, (Figure 2.11B). Putative cannabisativine was present both in F71.4 and F71.5, being 3.5 times higher in F71.4, whilst putative anhydrocannabisativine was detected only in F71.5. The Dragendorff's reagent, which forms a non-specific complex with certain alkaloids (131), reacted sharply with F71.4 & F71.5, and we therefore hypothesized the reaction must have been due to

spermidine alkaloids (Supplementary Figure S2.19). To further explore this proposition, the samples have been subjected to an acid-base extraction, expecting the spermidine alkaloids would be protonated in acidic conditions, (Figure 2.11C).

Fractions 71.4 ALK and F71.5 ALK were visualized on TLC with the Dragendorff's reagent, and they appeared even more vividly than prior to acid-base extraction, (Supplementary Figure S2.20 & S2.21). Many positive reactions were noted for F71.5, with retention factors (R_f) of 0.04; 0.05 & 0.18 using the eluent system [H_2O : MeOH: ethyl acetate (1:1:8)]. Only one positive reaction was observed for F71.4 ALK, with a calculated R_f of 0.04. An HPLC-MS/MS analysis was performed on both fractions, with F71.5 ALK generating the fragmentation pattern for each targeted alkaloid, (Figure 2.12).

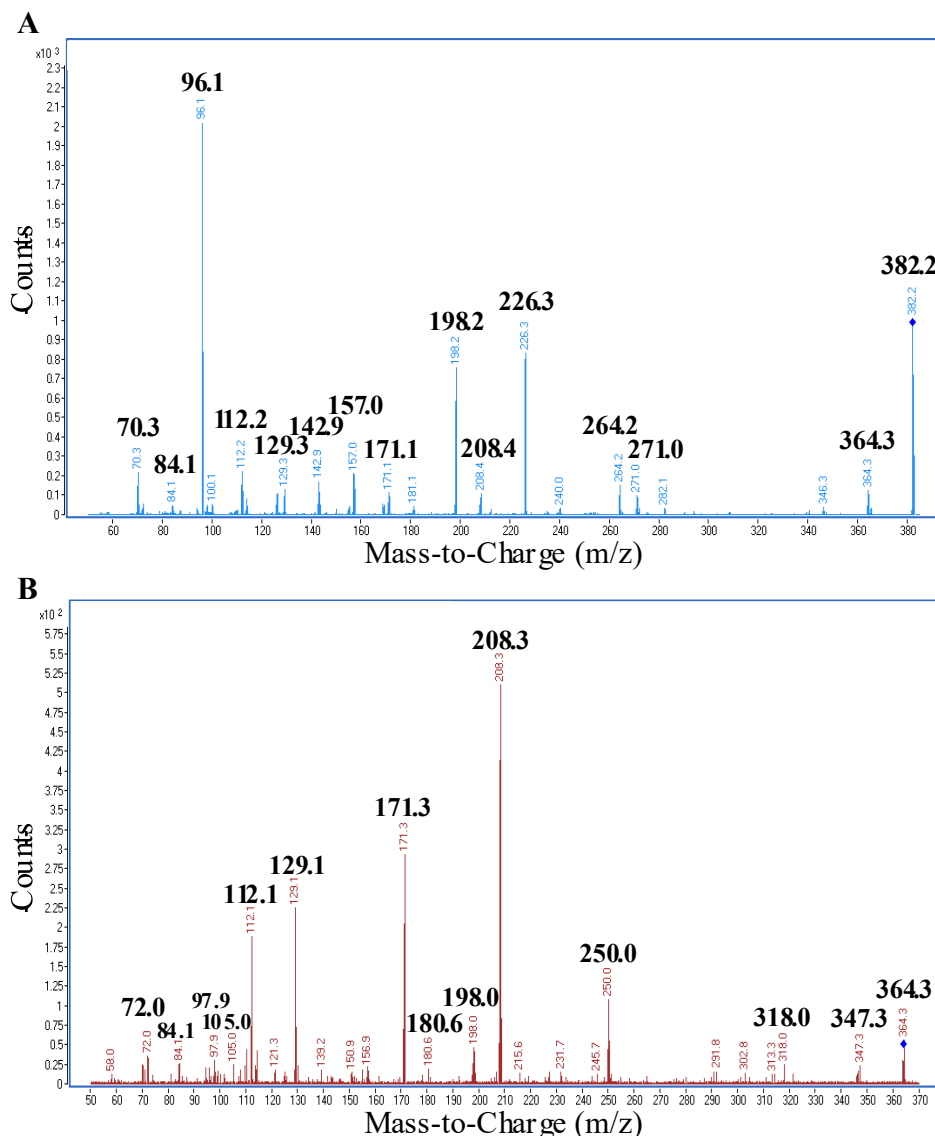


Figure 2.12. Detection of putative cannabissativine and anhydrocannabissativine in *Cannabis* roots.

HPLC-MS/MS fragmentation pattern of **A)** putative cannabissativine ($[M+H]^+ = 382$ m/z; retention time = 10.8 min) and **B)** putative anhydrocannabissativine ($[M+H]^+ = 364$ m/z; retention time = 17.0 min).

Several abundant fragments (m/z 112, 129, 171, 198, 208 and 364) correspond to ions previously reported for cannabissativine and are considered diagnostic features of this metabolite class, (Table 2.5).

Table 2.5 Reported Ion Fragments for *Cannabis* Alkaloids are Consistent Among Studies

Reference	MS/MS Ion Fragment (m/z)	
	Cannabissativine	Anhydrocannabissativine
Turner <i>et al.</i> (1976)	381, 363, 352, 310, 280, 250, 208, 198, 171, 129, 114, 112, 96, 94, 84, 80, 72, 70, 55	NA
Elsohly <i>et al.</i> (1978)	NA	363, 348, 292, 264, 250, 208, 198, 192, 171, 84, 80, 70, 43
Lima <i>et al.</i> (2021)	382, 264, 226, 198, 158, 112	NA
Araújo <i>et al.</i> (2024)	364, 264, 226, 198, 112	362, 264, 224, 198, 157, 115
Present work	382, 364, 271, 264, 226, 208, 198, 171, 157, 142, 129, 112, 96, 84, 70	364, 347, 318, 250, 208, 198, 180, 171, 129, 112, 105, 97, 84, 72

Although authentic standards were unavailable, multiple independent observations support the presence of cannabissativine-like metabolites in *Cannabis* roots, including expected precursor ion masses, fragmentation patterns consistent with published reports, enrichment during purification, positive Dragendorff staining, and extraction behavior characteristic of nitrogen-containing compounds. Nevertheless, definitive structural confirmation will require the use of authentic reference standards combined with high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance analyses.

2.7.2 Transcriptomic analysis

Raw transcriptomic data were obtained from datasets published on NCBI SRA (Table 2.6). Datasets were selected for being grown in normal conditions (*i.e.* not willfully exposed to biotic or abiotic stress), so negative controls of salinity stress experiments were included (PRJNA1108719). After quality filtering, reads were mapped to *Cannabis* reference genome and read counts were then transformed into Transcripts per Million (TPM). A principal component analysis (PCA) was performed on the data post removal of weakly expressed genes for visual detection of potential biases, (Figure 2.13).

Table 2.6 Distribution of selected RNA-seq samples across organs.

BioProject (Reference)	Root	Petiole	Stem	Meristem	Leaf		Flower		Trichome
					Young	Mature	Female	Male	
PRJNA80055 (132)	4	2	2	0	4	4	8	0	0
PRJNA73819 (133)	1	0	2	0	0 ^a		5	0	0
PRJNA560453 (134)	2	0	0	0	4 ^a		28	6	24
PRJNA1126191 (135)	0	0	0	20	0 ^a		0 ^a		0 ^a
PRJNA1173925 (136)	3	0	3	0	0	3	3	0	0
PRJNA1108719 (137)	0	0	0	0	3	0	0	0	0

^a Columns were fused whenever it was unknown which organ characteristic applied, or to simplify the table.

Most samples cluster according to organ, with a “Y” shape distribution: *Root* cluster at the very bottom, *Stem* above it, followed by *Leaf* and then *Flower* on the very top, (Figure 2.13). Given that there are only two petiole samples in the available datasets, and these were similar to the *Stem* samples, these samples were classified as *Stem*. It is important to note that *Trichome* and *Meristem* samples both originate from a single study, PRJNA560453 (+) and PRJNA1126191 (Δ) respectively. Thus, it is not possible to evaluate if the samples cluster together because of their biology or because of technical biases. Considering that samples’ distribution is in agreement with their organ of origin, all samples were kept for downstream analyses.

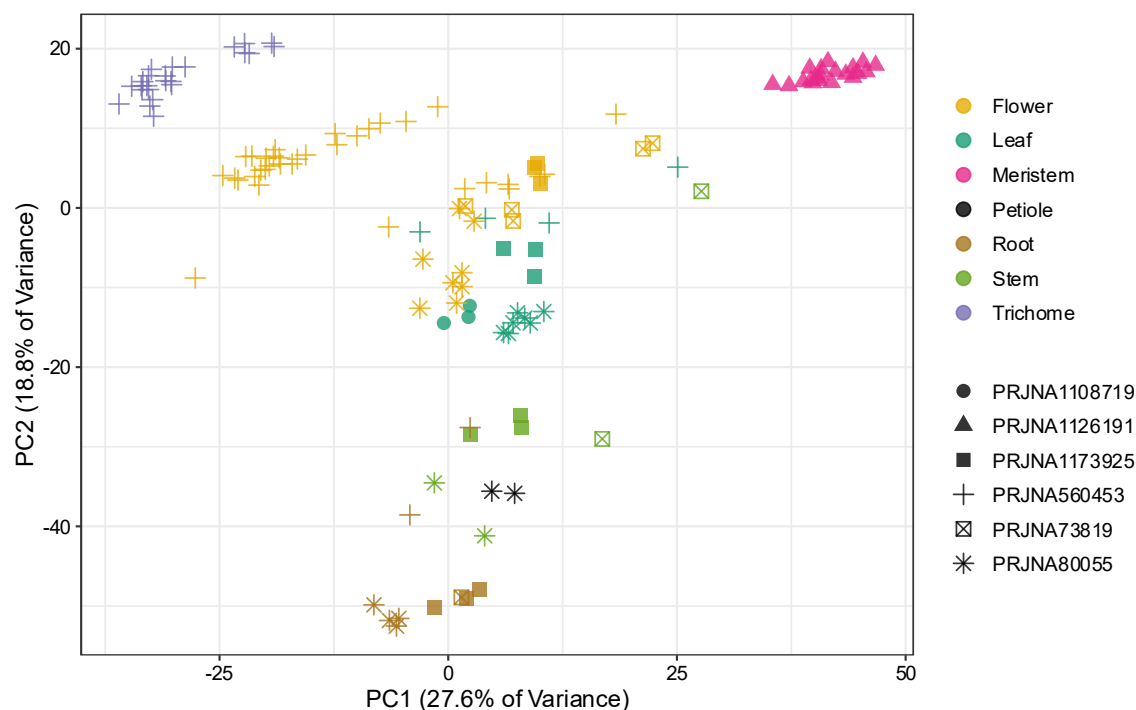


Figure 2.13. Public *Cannabis* RNA-seq samples cluster according to their organ of origin. Principal component analysis was computed using log-transformed TPM expression levels of publicly available. Samples are categorized into organs (colors) and study's origin (BioProject accession numbers, symbols).

A co-expression network analysis was performed to identify novel NSM biosynthetic genes using as guides, the genes expected to be involved in the biosynthesis of precursors (Figure 2.9, Supplementary Table S2.8). Figure 2.14A shows standardized expression levels of the guide genes. Guide genes were overrepresented in roots, with 14 guide genes most expressed in this tissue, almost thrice as many as if they were partitioned equally across tissues. *Arginine Decarboxylase (ADC)* and *Agmatine Deiminase (AIH)*, involved in the biosynthesis of putrescine, show different patterns of expression, with the first predominantly expressed in *Root*, and to an extent *Trichome*, whilst *AIH* was most expressed in *Leaf*, then *Root*, then *Stem*. *Ornithine Decarboxylase (ODC)*, an alternative route to produce putrescine, was mainly expressed in *Root*. *Spermidine synthase 1 (SPDS)* is especially expressed in *Root* and *Stem* tissues. Finally, several isoforms of *Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL)* and *Tyrosine Decarboxylase (TYDC)* were also found overexpressed in *Root*. The coordinated root-enriched expression of precursor biosynthetic genes and transcripts for candidate pathway enzymes is consistent with roots being a major site of NSM such as MSA and hydroxycinnamic acid amides in *Cannabis*.

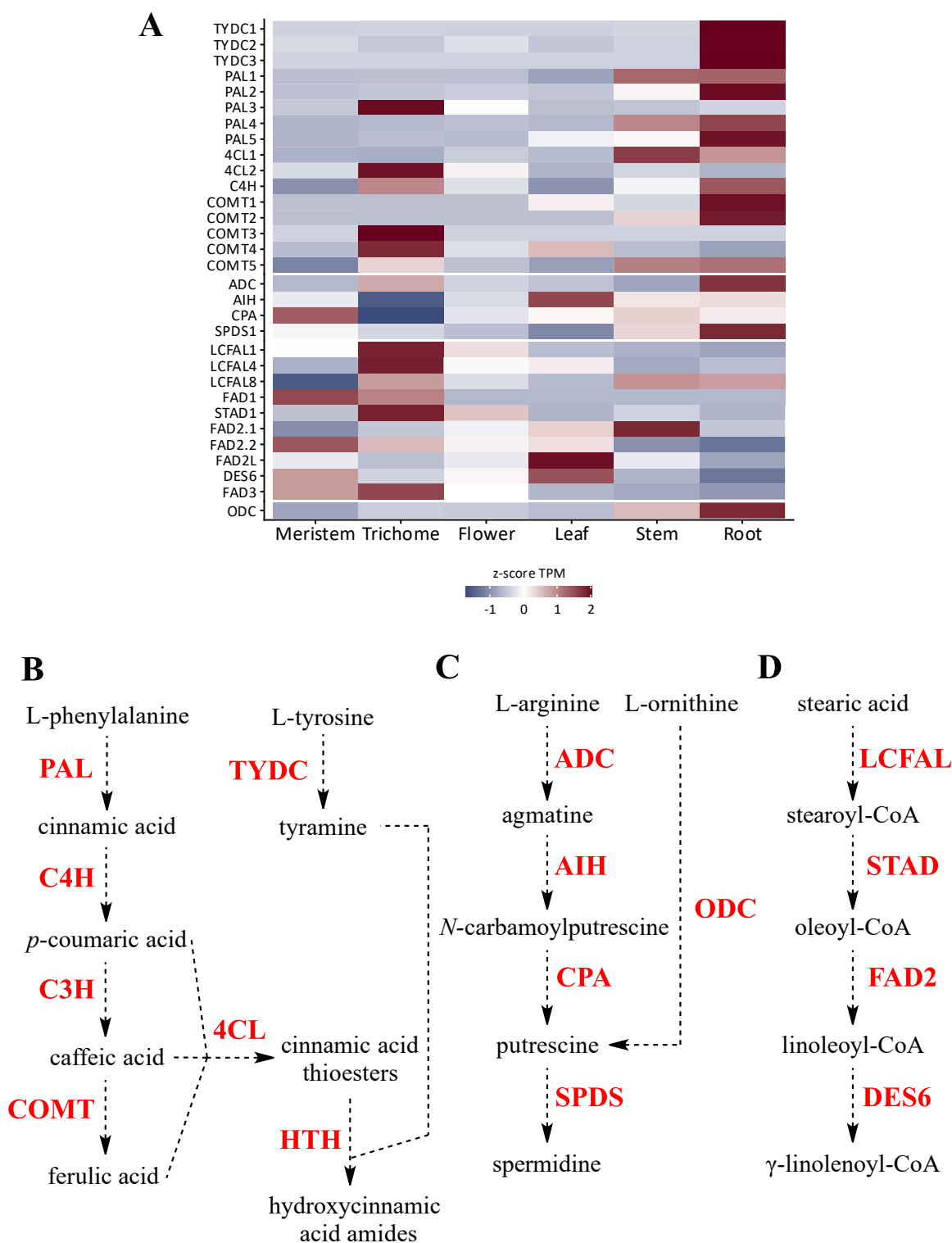


Figure 2.14. Genes expected to be involved in the biosynthesis of macrocyclic spermidine alkaloids and hydroxycinnamic acid amides are overwhelmingly over-expressed in roots.
A) Relative expression levels of guide genes. TYDC, tyrosine decarboxylase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; 4CL, 4-coumarate-CoA ligase; C4H, trans-cinnamate 4-

monooxygenase; COMT, caffeine *O*-methyltransferase; ADC, arginine decarboxylase; AIH, agmatine deiminase; CPA, *N*-carbamoylputrescine amidase; SPDS, spermidine synthase; LCFAL, long-chain fatty acid CoA-ligase; FAD1, fatty acid desaturase type 1 (Δ^8 -fatty acid desaturase); STAD, Stearoyl 9-desaturase; FAD2, fatty acid desaturase type 2 (Δ^{12} -oleate desaturase); FAD2L, fatty acid desaturase type 2-like (Δ^{12} -oleate desaturase-like); DES6, Δ^6 -desaturase (acyl-lipid (9-3)-desaturase); FAD3, Acyl-lipid omega-3 desaturase (cytochrome b5) endoplasmic; ODC, ornithine decarboxylase. Expected biosynthetic pathway for **B**) hydroxycinnamic acid amides, C3H, 4-coumarate 3-hydroxylase; HTH, *N*-hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase, **C**) spermidine, and **D**) polyunsaturated fatty acids.

From the 27 249 protein-encoding genes of the *Cannabis* genome, 16 632 were retained after removal of lowly expressed genes. Since production of specialized metabolites varies greatly *in vivo*, being often tissue-specific, time-specific or stress-specific, the 20% most variable genes across tissues, totaling 3 326 genes, were selected to generate the co-expression network, as guide genes were also among the most variable (Supplementary Figure S2.22). Pairwise gene correlations were computed using the normalized expression across tissues and an *r*-score threshold of 0.98635 was selected to limit false-positive correlations, (Supplementary Figure S2.17), leading to the exclusion of 571 genes with no significant positive correlations with other genes. Finally, the co-expression network was constructed with 2 755 genes and a resolution of 1.75, (Supplementary Figure S2.18).

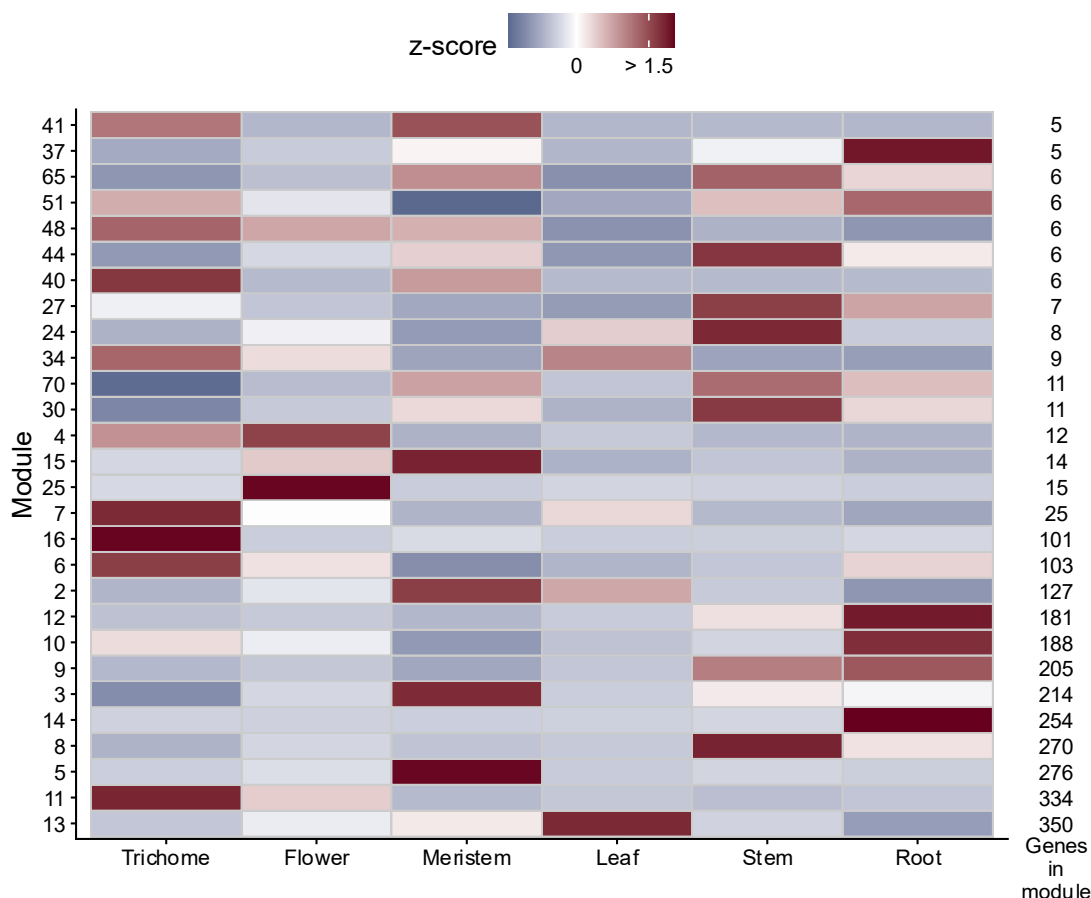


Figure 2.15 Most variable genes are over-expressed and cluster in trichome, stem, and root. Relative average expression of modules of genes across six plant tissues. Network constructed with gene-gene correlation $r\text{-score} \geq 0.98635$ and resolution = 1.75. Mean TPM of all genes in a module in each tissue was computed, then this value was then used to calculate the mean and standard deviation of a module in each tissue for z-transformation.

Half of the guide genes (16) made it into the network, mostly those relating to the phenylpropanoid pathway and a few from fatty acid metabolism. Most notably, all three *TYDC* were found in module 14, *PAL2* and *PAL5* were in module 12. Module 9 contained *PAL1* and *PAL4*, and module 10 contained *ADC*. These guides were over-expressed in roots, as shown in Figure 2.15, and cluster in module also over-expressed in roots. We subsequently retrieved the protein family domain (PFAM) and protein BLAST annotations for the proteins encoded by the genes in the network. Modules 9, 10, 12 & 14 were explored based on these annotations. In module 14, we identified several transcripts from the *Pathogen-Related Bet v1* Protein family. Specifically, two *Bet v1-domain proteins* transcripts showed highest similarity to

characterized Norbelladine Synthases (NBS) from *Amaryllidaceae* species (138, 139). Because Bet v1-like proteins can participate in specialized metabolite binding or condensation reactions, these genes represent intriguing candidates for NSM, although their biochemical activity in *Cannabis* remains unknown. Also, five additional *Pathogen-Related Bet v1*, a *Spermidine Coumaroyl-CoA Acyltransferase*, one *Dirigent-like Protein*, one *Berberine Bridge Enzyme (BBE)*, one *Aldo-keto Reductase (AKR)*, four *Monoxygenases*, four *Cytochrome P450*, two *Dioxygenases*, and four *Secoisolariciresinol Dehydrogenases* were identified (Table 2.7).

Table 2.7: Genes of interest of nitrogenous specialized metabolism identified in module 14 of the co-expression network.

Gene ID	Uniprot Accession	BLASTp	PFAM
evm.TU.07.394	A0A803Q4X8	<i>Prunus avium</i> Major allergen Pru av 1	Pathogenesis-related protein Bet v 1
evm.TU.07.391	A0A7J6HED2	<i>Betula pendula</i> Major pollen allergen Bet v 1- G	Pathogenesis-related protein Bet v 1
evm.TU.02.1087	A0A803NS69	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> Norbelladine synthase	Pathogenesis-related protein Bet v 1, Polyketide cyclase / dehydrase and lipid transport
novel_gene_539_5bd9a17a	A0A803RCL8	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> Norbelladine synthase	Pathogenesis-related protein Bet v 1
evm.TU.10.823	A0A803QQI4	<i>Arabidopsis thaliana</i> Major Latex Protein-like protein 43	Pathogenesis-related protein Bet v 1
evm.TU.10.806	A0A7J6EBP3	<i>Arabidopsis thaliana</i> Major Latex Protein-like protein 43	Pathogenesis-related protein Bet v 1, Domain of unknown function (DUF4961)
novel_gene_3709_5bd9a17a	A0A803RAH4	<i>Arabidopsis thaliana</i> Major Latex Protein-like protein 43	Pathogenesis-related protein Bet v 1
novel_gene_2971_5bd9a17a	A0A803R6T1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Spermidine coumaroyl-CoA acyltransferase	Transferase, Trichothecene 3- O-acetyltransferase-like N- terminal domain
evm.TU.02.3254	A0A803P0I2	<i>Cannabis sativa</i> Dirigent protein 9	Dirigent-like protein

evm.TU.09.1318	A0A803QE24	<i>Arabidopsis thaliana</i> Berberine bridge enzyme-like 28	FAD binding domain, Berberine and berberine like
evm.TU.07.646	A0A803Q5V5	<i>Nicotiana tabacum</i> Auxin-induced protein PCNT115	Aldo/keto reductase
evm.TU.05.1586	A0A7J6EQ44	<i>Cannabis sativa</i> Flavonoid 3'-monooxygenase CYP75B137	Cytochrome P450
novel_gene_1808_5bd9a17a	A0A803QZX4	<i>Arabidopsis thaliana</i> Monooxygenase 3	Flavin containing amine oxidoreductase, lycopene cyclase protein, ThiF, Thi4, Glucose inhibited division protein A, tryptophan halogenase, alanine dehydrogenase/PNT domain, L-lysine 6-monooxygenase/L-ornithine 5-monooxygenase
evm.TU.01.850	A0A803NR30	<i>Arabidopsis thaliana</i> Probable flavin-containing monooxygenase 1	Flavin containing amine oxidoreductase, Shikimate/quinic acid 5-dehydrogenase, ThiF, Thi4, Glucokinase regulatory protein, Mur ligase MurD-like
evm.TU.03.1602	A0A803P5Y3	<i>Cannabis sativa</i> 3,9-dihydroxy-pterocarpan 6A-monooxygenase-like	Cytochrome P450
evm.TU.05.1251	A0A803PKK9	<i>Papaver somniferum</i> (S)-N-methylcocclaurine 3'-hydroxylase-like protein	Protein of unknown function (DUF819)
evm.TU.04.317	A0A803PH18	<i>Cannabis sativa</i> Cytochrome P450 71B34-like	Cytochrome P450
evm.TU.06.1626	A0A803PVA9	<i>Cannabis sativa</i> Cytochrome P450 86A1	Cytochrome P450 Lipid metabolic process
evm.TU.04.312	A0A803PH13	<i>Arabidopsis thaliana</i> Cytochrome P450 71B34	Cytochrome P450
evm.TU.07.310	A0A803Q4N6	<i>Cannabis sativa</i> Gibberellin 2-beta-dioxygenase 2	non-haem dioxygenase in morphine synthesis

evm.TU.07.51	A0A803Q5A8	<i>Cannabis sativa</i> 1-amino- cyclopropane-1- carboxylate oxidase	2OG-Fe(II) oxygenase superfamily non-haem dioxygenase in morphine synthesis N- terminal
evm.TU.10.2231	A0A803QMN4	<i>Forsythia</i> <i>intermedia</i> Secoisolarici- resinol dehydrogenase	Short chain dehydrogenase, Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase
evm.TU.10.2239	A0A803QMP3	<i>Forsythia</i> <i>intermedia</i> Secoisolarici- resinol dehydrogenase	Short chain dehydrogenase, Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase
evm.TU.10.200	A0A7J6I742	<i>Forsythia</i> <i>intermedia</i> Secoisolarici- resinol dehydrogenase	Short chain dehydrogenase, Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase, KR domain, 3- hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, S-adenosyl-L- homocysteine hydrolase, NAD binding domain, Tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase
evm.TU.10.205	A0AB40E572	<i>Forsythia</i> <i>intermedia</i> Secoisolarici- resinol dehydrogenase	Short chain dehydrogenase, Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase, KR domain, 3- hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, NAD binding domain

2.8 Discussion

Cannabis NSM have great potential, including MSA, yet their biosynthetic pathway remains largely uncharacterized. Consequently, we investigated these alkaloids: we obtained MS/MS mass spectra for putative cannabisativine and anhydrocannabisativine by HPLC-MS/MS from a root extract, and generated a co-expression network to retrieve candidate genes by exploiting biosynthetic genes of precursors to orient our analysis. The network revealed a gene cluster over-expressed in roots, containing three *Tyrosine Decarboxylases*, along two genes similar to *Norbelladine Synthase*, a *Spermidine Coumaroyl-CoA Acyltransferase*, a *Dirigent-like Protein*, one *Berberine Bridge Enzyme-like*, one *Aldo-keto Reductase*, four *Monooxygenases*, including two *Flavin-containing Monooxygenases*, two *Dioxygenases*, and four *Secoisolariciresinol Dehydrogenases* (module 14, Table 2.7).

The HPLC-MS/MS fragmentation pattern of cannabisativine, (Figure 2.12a), exhibits peaks at 382.2, 364.3, 271.0, 264.2, 226.3, 208.4, 198.2, 171.1, 157.0, 142.9, 129.3,

112.2, 96.1, 84.1 and 70.3 m/z. The observed peaks are in accordance with the literature, with recurrent ones being 382, 198, and 112 m/z (98, 101, 140), along several peaks found only in the 1976 original article for cannabissativine (*i.e.* 171, 129, 96 and 70 m/z) (Table 2.5). The HPLC-MS/MS fragmentation pattern of anhydrocannabissativine, (Figure 2.12b), presents peaks at 364.3, 347.3, 318.0, 250.0, 208.3, 198.0, 180.6, 171.3, 129.1, 112.1, 105.0, 97.9, 84.1, 72.0, and ~70 m/z. Observed peaks for anhydrocannabissativine were comparable to literature, notably those of the original article published in 1978 (*i.e.* 363, 348, 250, 208, 198, 181, 171, 129, 112, 84, 70 m/z) (71, 99, 101) (Table 2.5). Given resemblance between the spectra, combined with TLC observations and acid-base extraction evidence (Figure S2.20-22), our data strongly suggest the compounds in question are the two known *C. sativa* MSA, cannabissativine and anhydrocannabissativine. However, nuclear magnetic resonance and HPLC-MS/MS analysis using authentic reference standards would be required to confirm this beyond any doubt.

A notable observation that must be highlighted is the retention time for these targeted compounds, which even though obtained employing the same method, differed in each subsequent analysis. This phenomenon is possibly due to matrix effects (141). It could be that targeted MSA were retained longer than usual in the column because of the complex matrix, particularly by lipophilic compounds. The proportion of MSA in each sample tested is expected to have increased following chromatography steps, which could explain why the retention times got lower the more downstream of purification. The most purified samples (F71.4 & F71.5) have retention times that are stabilized through analyses (~10 min. for cannabissativine; ~17 min. for anhydrocannabissativine), which would be in concordance with this explanation.

The acid-base extraction was not very efficient, as putative cannabissativine was around 4 times more abundant in the waste fraction of F71.4, than the alkaloid fraction. This means the compound did not solubilize well in the aqueous phase after sulfuric acid was added, which is unexpected for an alkaloid, particularly one that has two protonatable amines. However, these amines are part of the macrocycle, which could hinder their accessibility. Additionally, a semi-rigid insoluble foam is formed after acid addition (Supplementary Figure S2.23). It is insoluble in both organic and aqueous phases. It thus seems that the MSA of *C. sativa* may form supramolecular structures via diverse non-covalent interactions, particularly because they have amphiphilic structures (142). This is possibly the reason why acid-base extraction is inefficient. It would be beneficial to investigate other purification methods selective for these compounds.

The structure of palustridiene, a MSA reported in *Equisetum palustre*, indicates the presence of multiple double bonds in its 10-carbon fatty acid precursor (Figure 2.16a) (143). In their case, an alkene is positioned on the same carbon as the one forming the 6-atom heterocycle ($C_{17}-N_1$), yet such double bond is nonexistent in the expected biosynthesis of *C. sativa* MSA, (Figure 2.16b). *C. sativa* MSA are in another way different of those of *E. palustre*: the alkene in the small heterocycle is positioned at C_{15} instead of C_{14} . Furthermore, the fatty acid moiety of palustridiene indicates that the precursor for *Equisetum* MSA is an ω -3 (likely α -linolenic acid, 18C:3 n-3) (144). Again, *Cannabis* MSA do not present this ω -3 bond. These observations suggest different biosynthetic pathways, and more than likely, different catalytic steps to achieve similar metabolomic results.

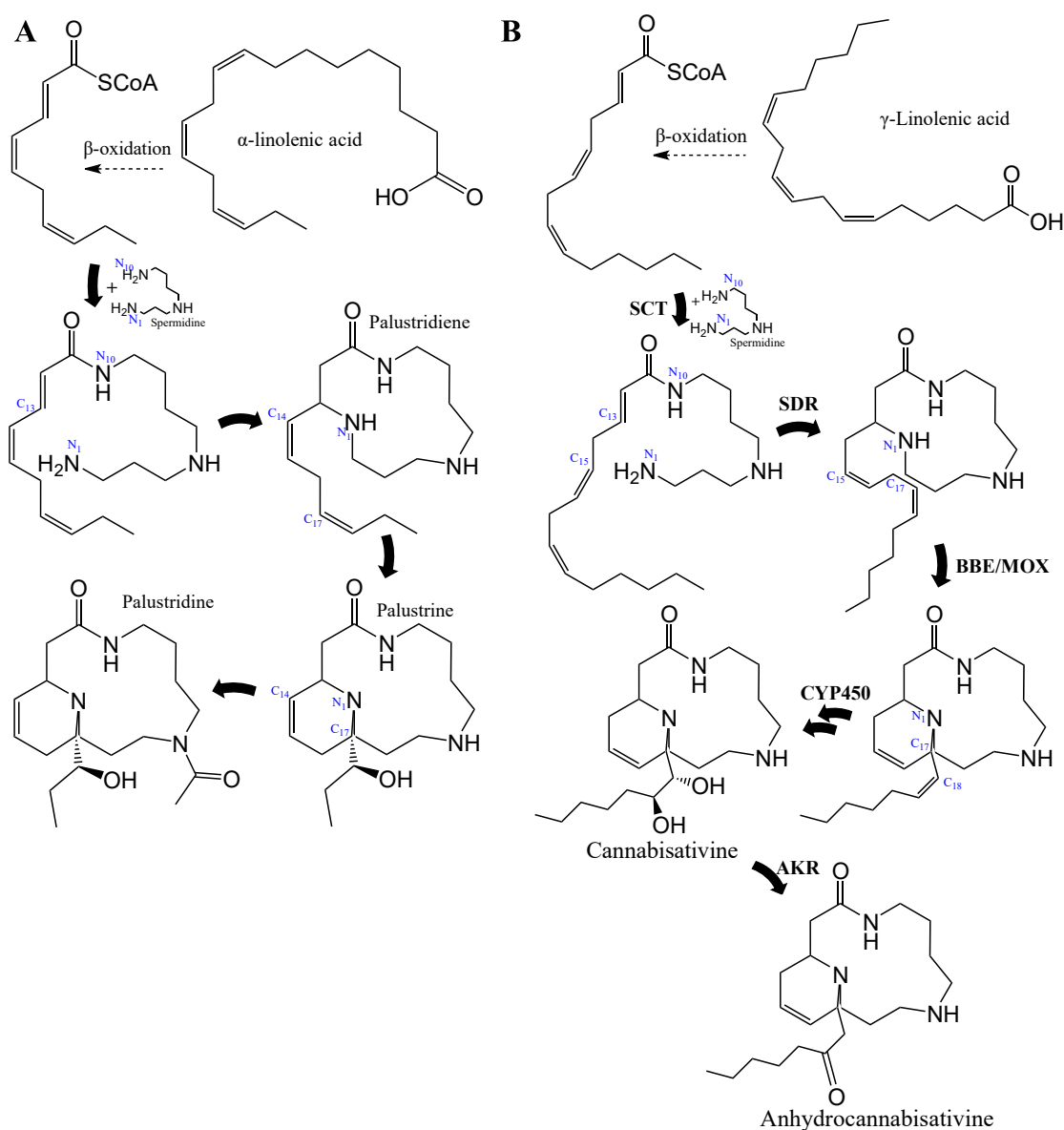


Figure 2.16: Putative biosynthetic pathway of macrocyclic spermidine alkaloids

A) of *E. palustre*. **B)** of *C. sativa*. SCT, spermidine coumaroyl-CoA acyltransferase; SDR, short-chain dehydrogenase/reductase; BBE, berberine-bridge enzyme; MOX, monooxygenase; CYP450, cytochrome P450.

Candidate genes of Table 2.7 were selected and explored based on their BLASTp and PFAM annotations. NBS is an enzyme involved in *Amaryllidaceae* alkaloids biosynthesis, producing norbelladine via condensation of tyramine and 3,4-dihydroxybenzaldehyde, although in low efficiency (145). The expression patterns of identified *Bet v 1* genes vary considerably and share multiple tissues, but all of them are overexpressed in roots, with one being expressed only in roots (evm.TU.07.394).

A *Spermidine Coumaroyl-CoA Acyltransferase* was expected in the putative biosynthetic route of MSA for initial condensation. Our analysis revealed one such gene, expressed exclusively in the roots. As such, this enzyme could very well correspond to the first catalytic step of MSA biosynthesis, thereby suggesting MSA pathway initiation occurs in roots. Its annotation is also consistent with other spermidine-derived alkaloids that utilize hydroxycinnamic acids instead of polyunsaturated fatty acids (116).

Dirigent proteins play the role of guide in oxidative radical coupling reactions, by which they instill stereoselectivity (146). Dirigent-like proteins have been reported to be involved in many specialized metabolites' biosynthesis, such as lignin and lignan, aromatic diterpenoids, and isoflavonoids. The *Dirigent-like Protein* identified in this study is expressed mostly in roots, and slightly in stem. As it is co-expressed with phenylpropanoid biosynthetic genes, and in tissues where we find NSM, this gene could potentially be implicated in lignanamide biosynthesis.

BBE-like are a protein family catalyzing various oxidation reactions and consequently involved in biosynthesis of numerous specialized metabolites, notably monolignols, cannabinoids and benzyloquinoline alkaloids (BIA) (147). A *BBE-like* gene was found expressed exclusively in roots. Its expression pattern is unlike what is expected for cannabinoid-producing enzymes, *i.e.* expressed in glandular trichomes, although major phytocannabinoids have indeed been reported in roots, but in low concentrations (72). Given the role of BBE-like enzymes in specialized metabolism, and their mechanistical coherence with expected biosynthetic steps for MSA and lignanamide production, this candidate *BBE* could be responsible for some NSM.

The *AKR* identified is expressed predominantly in roots, and slightly in trichomes, followed by leaf, then stem. Genes with such annotations play diverse roles in stress responses, such as detoxification, membrane transport, as well as osmolyte and

specialized metabolites production (148). Notable AKRs are *Codeinone Reductase* from *P. somniferum*, catalyzing the conversion of codeinone into codeine (149) and AKRs from *Amaryllidaceae* species are capable of converting narwedine and demethylnarwedine into galantamine and demethylgalantamine respectively (150, 151). Unterlinner *et al.* reported sequence similarity of codeinone reductase enzyme with the reductase subunit of 6'-deoxychalcone synthase complex of *Glycine max*. This coincides with the flavonoid-related annotations of some identified CYP450s.

The gene annotated as *Flavonoid 3'-Monooxygenase* has an expression pattern null in all tissues, except *Root*. Flavonoids are present in numerous tissues of *C. sativa*, but they are thought to be absent of roots as no metabolomic report of flavonoids in them exist, despite being well-known compounds (152). Furthermore, another monooxygenase was found in the gene cluster, this one expressed principally in roots and little in trichomes, and it is annotated as a 3,9-dihydroxypterocarpan 6A-monooxygenase-like. Pterocarpanes are phytoalexins derived from isoflavonoids that possess antifungal and antibacterial properties (153). It is to be considered that the flavonoid descriptives may be inadequate, and these proteins could be involved in a NSM pathway.

The annotations of the two *Flavin-containing Monooxygenase* suggest they could be involved in NSM pathways. *Thi4* and *ThiF* are associated with thiamine production and a ThiF-like protein in *Streptococcus pneumoniae* was reported as catalyzing the formation of an intra-peptide indolylamide bond (154). Monooxygenases generally incorporate a molecular oxygen into a compound (155), however in the case of *Cannabis* MSA, it is possible that N₁ might be hydroxylated, just to be subsequently dehydrated with a hydrogen of C₁₇, thus closing the smaller heterocycle. Otherwise, these monooxygenases could be responsible for the hydroxylation of C₁₈ and C₁₉ of cannabistatine. They are weakly expressed in *Stem* and *Trichome*, and the *Monooxygenase 3* (A0A803QZX4) is expressed in *Meristem* and *Flower* as well, but both are overexpressed in *Root*.

A CYP450 annotated as a *(S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase-like*, which is involved in BIA biosynthesis, was found expressed solely in roots (156). This enzyme (A0A803PKK9) is part of the CYP76 family, which are involved in terpenoid metabolism, although not exclusively (157). Geraniol 8-hydroxylase, a CYP76B6 from *Catharanthus roseus*, is responsible for the production of 8-hydroxygeraniol, itself an upstream precursor to secologanin in monoterpene indole alkaloids (MIA) biosynthesis, and therein plays a regulatory role (158, 159). A CYP76A2L from potato is responsible for the detoxification of multiple sesquiterpene phytoalexins of

Solanaceae family via hydroxylation (160). Coincidentally, hydroxylation of a multicyclic alkaloid is expected in *C. sativa* MSA biosynthesis.

The four genes annotated as *Secoisolariciresinol Dehydrogenase* could possibly be involved in lignanamide and MSA products formation, as they encode for proteins predicted to have short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) and enoyl-(acyl carrier protein) reductase domains. All these genes are overexpressed in roots, two of them exclusively, one is slightly expressed in stem as well (evm.TU.10.2239), and another one is expressed in all tissues (evm.TU.10.205), but mostly roots, stem and leaf. The SDR is a family of enzymes capable of catalyzing varied chemical reactions, notably C=C, C=O, and C=N bond reductions (161). Noroxomaritidine reductase (NR) is an enzyme with the SDR domain involved in the *Amaryllidaceae* alkaloid pathway that works in tandem with NBS to produce norbelladine. *In vitro*, NBS and NR produce more alkaloids together than they do on their own (145). Many other examples exist of SDR in alkaloid biosynthesis, including noscapine synthase in the BIA pathway (162), as well as PsDeHase, a dehydrogenase expected to form papaverine in *P. somniferum* (163), a SDR was reported to produce a novel MIA in *C. roseus* (164), and iridoid synthase catalyzes ring closure of a heterocycle from an alkene in *Gardenia jasminoides* (165). The formation of the dihydroperiphyllin skeleton in MSA pathway is expected to require such activity, and it is also consistent with the structures of lignanamides.

We propose a biosynthetic route for cannabissativine (Figure 2.16b), supported by transcriptomic and metabolomic evidence. We expect γ -linolenic acid (18:3, ω -6), which was reported in *Cannabis*, may be responsible for MSA biosynthesis (166). γ -linolenic acid would in theory be β -oxidized in peroxisomes to obtain a 14C polyunsaturated fatty acid, which could then be condensed via identified *Spermidine Coumaroyl-CoA Acyltransferase* on spermidine (N₁₀), (Figure 2.16b). To generate the dihydroperiphyllin skeleton, an oxidation of N₁ of spermidine would be required, and we suggest a *SDR* of Table 2.7 could be responsible. We suspect a BBE or even a monooxygenase could be involved in the cyclization of the small heterocycle, because of the hydride transfer ostensibly involved (167). According to the route of Figure 2.16b, there would remain an alkene on C₁₈ of the precursor for cannabissativine, which would logically be involved in dihydroxylation. We indeed identified multiple CYP450 in light of the co-expression analysis. We expect two CYP450s to produce the stereospecific hydroxylations. Finally, to obtain anhydrocannabissativine, an oxidation reaction of the hydroxyl groups could generate a ketone on C₁₉, possibly from the identified *AKR*.

It was reported that *Equisetum* MSA titer variability was mainly due to ontogeny, with highest concentrations found during early development (143). If the same applies for *C. sativa* remains unknown. Our results demonstrate that *Cannabis* MSA may be found in the late stages of development of hydroponically grown root samples. As the transcriptomic results seem to suggest, the module in which we identified candidate genes contains many genes involved in biotic resistance and defence. We suppose that *Cannabis* MSA play a critical role in inter-species mediation, and that they possess activity related to microbes, but also that their production could possibly be involved in regulatory pathways. Spermidine regulates many processes, both ontogenically and against stresses, therefore it is not unreasonable to expect the same from spermidine alkaloids (168). It is still unknown if the entirety of the alkaloids' biosynthesis occurs in the roots, since the presence of MSA is not specific to this organ, as leaves were also reported to contain both alkaloids. The involvement of transporters can thus be expected.

Future studies on their biosynthesis should seek to validate the involvement of candidate genes. Determining when MSA titers are highest would also be of interest, as it could favor efficient applications of root extracts and reduce biomass wastage.

2.9 Conclusion

Mass spectra generated in this study suggest the presence of cannabissativine and anhydrocannabissativine in hydroponic root samples. Co-expression analysis highlighted candidate genes associated with tyramine production and NSM, including numerous oxidoreductases and a candidate *Spermidine Acyltransferase*. The results of this study facilitate the exploration and characterization of spermidine alkaloids pathway enzymes.

2.10 Declarations

2.10.1 Acknowledgements

The authors thank Simon Ricard for technical advice on chromatography.

2.10.2 Author contribution statement

Conceptualization, R.B., K.C.G.S., H.G. and I.D.-P.; writing – original draft, R.B.; writing – review & editing, R.B., K.C.G.S., S.E.G., A.C., H.G. and I.D.-P.; data curation, K.C.G.S.; visualization, R.B., K.C.G.S., S.E.G.; formal analysis, K.C.G.S.; investigation, R.B., K.C.G.S.; methodology, R.B., K.C.G.S., S.E.G., A.C.; software, K.C.G.S.; resources, H.G., I.D.-P.; supervision, H.G., I.D.-P.; project administration, I.D.-P.; funding acquisition, I.D.-P.

2.10.3 Competing interests' statement

The authors declare there are no competing interests.

2.10.4 Data availability statement

Metabolomic data generated or analyzed during this study are provided in full within the published article and its supplementary materials.

Transcriptomic data generated or analyzed during this study are available in the [KarenGoncalves/Cannabis_Raphael] repository, [[GitHub](#) - [KarenGoncalves/Cannabis_Raphael · GitHub](#)].

2.10.5 Funding statement

The authors acknowledge financial support to I.D.-P from the Canada Foundation for Innovation (CFI) John R. Evans Leaders Fund (Project #37853) and the Government of Québec through the Ministère de l'Économie, de l'Innovation et de l'Énergie (MEIE) for the acquisition of the Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC-MS) system used in this study. This work was also supported by the Université du Québec à Trois-Rivières—Annexe C program to I.D.-P.

2.11 Article References

- Agarwal, Parul, Sumya Pathak, Ravi Shankar Kumar, Yogeshwar Vikram Dhar, Sudhir Shukla, Mehar Hasan Asif, and Prabodh Kumar Trivedi. 2020. 'Short-chain dehydrogenase/reductase, PsDeHase, from opium poppy: putative involvement in papaverine biosynthesis', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143: 431-40.
- Araujo, T. C. L., P. M. N. Menezes, T. F. Ribeiro, C. A. F. Macedo, N. A. C. Souza, K. S. B. Lima, H. F. Figueredo, F. S. Silva, and L. A. Rolim. 2024. 'Cannabis sativa L. roots from Northeast Brazil reduce abdominal contortions in a mouse model of primary dysmenorrhea', *J Ethnopharmacol*, 318: 116891.
- Bautista, J. L., S. Yu, and L. Tian. 2021. 'Flavonoids in Cannabis sativa: Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnology', *ACS Omega*, 6: 5119-23.
- Bengtsson, Henrik. 2021. 'A Unifying Framework for Parallel and Distributed Processing in R using Futures', *The R Journal*, 13.
- Boucher, R., H. Germain, and I. Desgagne-Penix. 2025. 'Exploring the Lesser-Known Bioactive Natural Products of Plant Species of the Genus Cannabis L.: Alkaloids, Phenolic Compounds, and Their Therapeutic Potential', *Plants (Basel)*, 14.
- Braich, S., R. C. Baillie, L. S. Jewell, G. C. Spangenberg, and N. O. I. Cogan. 2019. 'Generation of a Comprehensive Transcriptome Atlas and Transcriptome Dynamics in Medicinal Cannabis', *Sci Rep*, 9: 16583.
- Camagna, M., M. Ojika, and D. Takemoto. 2020. 'Detoxification of the solanaceous phytoalexins rishitin, lubimin, oxylubimin and solavetivone via a cytochrome P450 oxygenase', *Plant Signal Behav*, 15: 1707348.

- Chen, J., C. Ullah, D. Giddings Vassao, M. Reichelt, J. Gershenzon, and A. Hammerbacher. 2021. 'Sclerotinia sclerotiorum Infection Triggers Changes in Primary and Secondary Metabolism in *Arabidopsis thaliana*', *Phytopathology*, 111: 559-69.
- Chen, S., Y. Zhou, Y. Chen, and J. Gu. 2018. 'fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor', *Bioinformatics*, 34: i884-i90.
- Chen, X., and P. J. Facchini. 2014. 'Short-chain dehydrogenase/reductase catalyzing the final step of noscapine biosynthesis is localized to laticifers in opium poppy', *Plant J*, 77: 173-84.
- Clarke, Robert C., and Mark D. Merlin. 2017. 'Cannabis Domestication, Breeding History, Present-day Genetic Diversity, and Future Prospects', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35: 293-327.
- Collu, G., N. Unver, A. M. Peltenburg-Looman, R. van der Heijden, R. Verpoorte, and J. Memelink. 2001. 'Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis', *FEBS Lett*, 508: 215-20.
- Cortese, M., M. R. Gigliobianco, F. Magnoni, R. Censi, and P. D. Di Martino. 2020. 'Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review', *Molecules*, 25.
- Cramer, L., L. Ernst, M. Lubienski, U. Papke, H. M. Schiebel, G. Jerz, and T. Beuerle. 2015. 'Structural and quantitative analysis of *Equisetum* alkaloids', *Phytochemistry*, 116: 269-82.
- Csárdi, Gábor; Nepusz, Tamás; Müller, Kirill; Horvát, Szabolcs; Traag, Vincent; Zanini, Fabio; , and Daniel Noom. 2024. 'igraph for R: R interface of the igraph library for graph theory and network analysis', *bioRxiv*.
- Da Porto, C., D. Decorti, and F. Tubaro. 2012. 'Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide', *Industrial Crops and Products*, 36: 401-04.
- Daniel, B., B. Konrad, M. Toplak, M. Lahham, J. Messenlehner, A. Winkler, and P. Macheroux. 2017. 'The family of berberine bridge enzyme-like enzymes: A treasure-trove of oxidative reactions', *Arch Biochem Biophys*, 632: 88-103.
- Department of Bio-Health Convergence, Kangwon National University. 2024. 'Transcriptomic Responses of *Cannabis sativa* L. to *Trichoderma hamatum* Treated under Drought Conditions'.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=GSE266916>.
- Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T. R. Gingeras. 2013. 'STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner', *Bioinformatics*, 29: 15-21.
- Dos Santos, K. C. G., I. Desgagne-Penix, and H. Germain. 2020. 'Custom selected reference genes outperform pre-defined reference genes in transcriptomic analysis', *BMC Genomics*, 21: 35.
- Durinck, S., Y. Moreau, A. Kasprzyk, S. Davis, B. De Moor, A. Brazma, and W. Huber. 2005. 'BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis', *Bioinformatics*, 21: 3439-40.

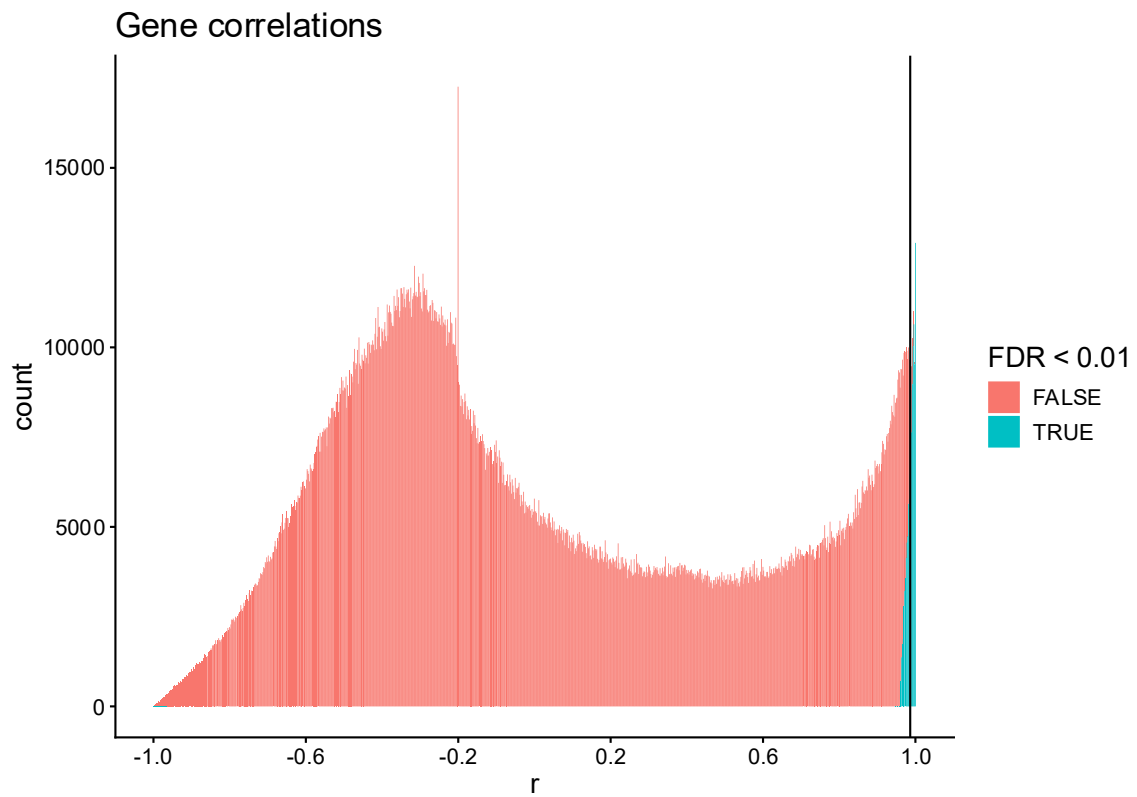
- Durinck, S., P. T. Spellman, E. Birney, and W. Huber. 2009. 'Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt', *Nat Protoc*, 4: 1184-91.
- Elsohly, M. A., C. E. Turner, C. H. Phoebe, Jr., J. E. Knapp, P. L. Schiff, Jr., and D. J. Slatkin. 1978. 'Anhydrocannabisativine, a new alkaloid from Cannabis sativa L', *J Pharm Sci*, 67: 124.
- Fordjour, E., C. F. Manful, A. A. Sey, R. Javed, T. H. Pham, R. Thomas, and M. Cheema. 2023. 'Cannabis: a multifaceted plant with endless potentials', *Front Pharmacol*, 14: 1200269.
- Gagne, V., N. Boucher, and I. Desgagne-Penix. 2024. 'Cannabis Roots: Therapeutic, Biotechnological and Environmental Aspects', *Cannabis Cannabinoid Res*, 9: 35-48.
- Gao, Y., L. Guo, X. Liu, N. Chen, X. Yang, and Q. Zhang. 2024. 'Advances in the synthesis and applications of macrocyclic polyamines', *R Soc Open Sci*, 11: 231979.
- George, N. I., and C. W. Chang. 2014. 'DAFS: a data-adaptive flag method for RNA-sequencing data to differentiate genes with low and high expression', *BMC Bioinformatics*, 15: 92.
- Halpin-McCormick, A., T. M. Maaz, M. B. Kantar, K. E. Barton, R. R. Masalia, N. Batora, K. Law, and E. J. Kuntz. 2025. 'Species distribution of Cannabis sativa: Past, present and future', *PLoS One*, 20: e0306007.
- Hofer, R., B. Boachon, H. Renault, C. Gavira, L. Miesch, J. Iglesias, J. F. Ginglinger, L. Allouche, M. Miesch, S. Grec, R. Larbat, and D. Werck-Reichhart. 2014. 'Dual function of the cytochrome P450 CYP76 family from Arabidopsis thaliana in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides', *Plant Physiol*, 166: 1149-61.
- Hourfane, S., H. Mechqoq, A. Y. Bekkali, J. M. Rocha, and N. El Aouad. 2023. 'A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities', *Plants (Basel)*, 12.
- Jiménez-González, Leticia, Miriam Álvarez-Corral, Manuel Muñoz-Dorado, and Ignacio Rodríguez-García. 2007. 'Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties', *Phytochemistry Reviews*, 7: 125-54.
- Khan, A., F. Kanwal, S. Ullah, M. Fahad, L. Tariq, M. T. Altaf, A. Riaz, and G. Zhang. 2025. 'Plant Secondary Metabolites-Central Regulators Against Abiotic and Biotic Stresses', *Metabolites*, 15.
- Kim, S. B., L. Van den Broeck, S. Karre, H. Choi, S. A. Christensen, G. F. Wang, Y. Jo, W. K. Cho, and P. Balint-Kurti. 2021. 'Analysis of the transcriptomic, metabolomic, and gene regulatory responses to Puccinia sorghi in maize', *Mol Plant Pathol*, 22: 465-79.
- Klein, F. K., H. Rapoport, and H. W. Elliott. 1971. 'Cannabis alkaloids', *Nature*, 232: 258-9.
- Lamichhane, Basanta, Archana Niraula, Natacha Merindol, Sarah-Eve Gélinas, Patrick Lagüe, Simon Ricard, Hugo Germain, and Isabel Desgagné-Penix. 2026. 'A Golgi-Localized N-Methyltransferase and Reversible Aldo-Keto Reductases

- Coordinate Dual Terminal Routes in Galanthamine Biosynthesis', *The Plant Journal*.
- Lawrence, M., R. Gentleman, and V. Carey. 2009. 'rtracklayer: an R package for interfacing with genome browsers', *Bioinformatics*, 25: 1841-2.
- Lawrence, M., W. Huber, H. Pages, P. Abouyou, M. Carlson, R. Gentleman, M. T. Morgan, and V. J. Carey. 2013. 'Software for computing and annotating genomic ranges', *PLoS Comput Biol*, 9: e1003118.
- Li, C., N. C. Deans, and C. R. Buell. 2023. "'Simple Tidy GeneCoEx": A gene co-expression analysis workflow powered by tidyverse and graph-based clustering in R', *Plant Genome*, 16: e20323.
- Li, Z., B. Cheng, Y. Zhao, L. Luo, Y. Zhang, G. Feng, L. Han, Y. Peng, and X. Zhang. 2022. 'Metabolic Regulation and Lipidomic Remodeling in Relation to Spermidine-induced Stress Tolerance to High Temperature in Plants', *Int J Mol Sci*, 23.
- Lima, K. S. B., Megdc Silva, T. C. L. Araujo, Cpdf Silva, B. L. Santos, L. A. A. Ribeiro, P. M. N. Menezes, M. G. Silva, E. M. Lavor, F. S. Silva, X. P. Nunes, and L. A. Rolim. 2021. 'Cannabis roots: Pharmacological and toxicological studies in mice', *J Ethnopharmacol*, 271: 113868.
- Majhi, B. B., S. E. Gelin, N. Merindol, S. Ricard, and I. Desgagne-Penix. 2023. 'Characterization of norbelladine synthase and noroxomaritidine/norcraftsodine reductase reveals a novel catalytic route for the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids including the Alzheimer's drug galanthamine', *Front Plant Sci*, 14: 1231809.
- Majhi, Bharat Bhusan, Sarah-Eve Gélina, Natacha Mérindol, and Isabel Desgagné-Penix. 2022. 'Characterization of norbelladine synthase and noroxomaritidine/norcraftsodine reductase reveals a novel catalytic route for the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids including the Alzheimer's drug galanthamine', *bioRxiv*: 2022.07.30.502154.
- Meng, Q., S. J. Kim, M. A. Costa, S. G. A. Moinuddin, R. M. Celoy, C. A. Smith, J. R. Cort, L. B. Davin, and N. G. Lewis. 2023. 'Dirigent protein subfamily function and structure in terrestrial plant phenol metabolism', *Methods Enzymol*, 683: 101-50.
- Muller, J., P. M. Puttich, and T. Beuerle. 2020. 'Variation of the Main Alkaloid Content in *Equisetum palustre* L. in the Light of Its Ontogeny', *Toxins (Basel)*, 12.
- Ortiz, Javier E., Camila W. Adarvez-Feresin, Olimpia Llalla-Cordova, Diego Cristos, Adriana Garro, and Gabriela E. Feresin. 2025. 'Novel Butyrylcholinesterase Inhibitor Alkaloids from Cannabis sativa Roots: Bioguided Isolation and In Silico Study', *Compounds*, 5.
- Pap, N., L. Hamberg, J. M. Pihlava, J. Hellstrom, P. Mattila, M. Eurola, and A. Pihlanto. 2020. 'Impact of enzymatic hydrolysis on the nutrients, phytochemicals and sensory properties of oil hemp seed cake (*Cannabis sativa* L. FINOLA variety)', *Food Chem*, 320: 126530.
- Potter, S. C., A. Luciani, S. R. Eddy, Y. Park, R. Lopez, and R. D. Finn. 2018. 'HMMER web server: 2018 update', *Nucleic Acids Res*, 46: W200-W04.

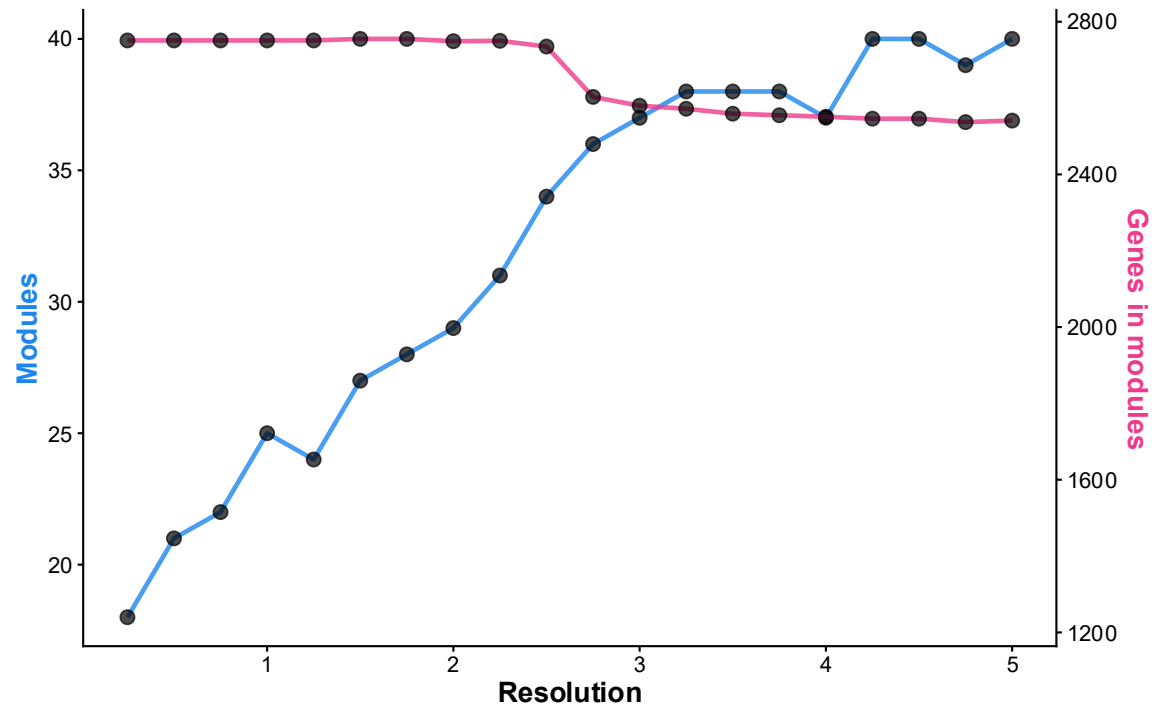
- Qureshi, M., T. Mokkawes, Y. Cao, and S. P. de Visser. 2024. 'Mechanism of the Oxidative Ring-Closure Reaction during Gliotoxin Biosynthesis by Cytochrome P450 GliF', *Int J Mol Sci*, 25.
- Radwan, M. M., S. Chandra, S. Gul, and M. A. ElSohly. 2021. 'Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis', *Molecules*, 26.
- Rajput, A., K. S. Butler, D. A. Springer, and J. R. Chekan. 2025. 'Indolylamide Macrocyclization by a Streptococcus pneumoniae ThiF-like Enzyme Family Member', *Org Lett*, 27: 5765-70.
- Roth, S., M. B. Kilgore, T. M. Kutchan, and M. Muller. 2018. 'Exploiting the Catalytic Diversity of Short-Chain Dehydrogenases/Reductases: Versatile Enzymes from Plants with Extended Imine Substrate Scope', *Chembiochem*, 19: 1849-52.
- Rull, Valentí. 2022. 'Origin, early expansion, domestication and anthropogenic diffusion of Cannabis, with emphasis on Europe and the Iberian Peninsula', *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 55.
- Ryz, N. R., D. J. Remillard, and E. B. Russo. 2017. 'Cannabis Roots: A Traditional Therapy with Future Potential for Treating Inflammation and Pain', *Cannabis Cannabinoid Res*, 2: 210-16.
- Saragoça, Andreia, Ana Cláudia Silva, Carla M. R. Varanda, Patrick Materatski, Alfonso Ortega, Ana Isabel Cordeiro, and José Telo da Gama. 2025. 'Current Context of Cannabis sativa Cultivation and Parameters Influencing Its Development', *Agriculture*, 15.
- science, Chinese academy of agriculture. 2024. 'Cannabis sativa Transcriptome or Gene expression'. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1173925>.
- Sengupta, D., D. Naik, and A. R. Reddy. 2015. 'Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: A structure-function update', *J Plant Physiol*, 179: 40-55.
- Shi, J., M. Toscani, C. A. Dowling, S. Schilling, and R. Melzer. 2025. 'Identification of genes associated with sex expression and sex determination in hemp (Cannabis sativa L.)', *J Exp Bot*, 76: 175-90.
- Shi, Y. J., J. Zhang, Y. W. Wang, K. Ding, Y. Yan, C. Y. Xia, X. X. Li, J. He, W. K. Zhang, and J. K. Xu. 2022. 'The untapped potential of spermidine alkaloids: Sources, structures, bioactivities and syntheses', *Eur J Med Chem*, 240: 114600.
- Singh, A., Massicotte, M-A., A. Garand, L. Tousignant, V. Ouellette, G. Bérubé, and I. Desgagné-Penix. 2018. 'Cloning and characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis.', *BMC Plant Biology*, 18: 338-50.
- Sreevidya, Narasimhan, and Shanta Mehrotra. 2003. 'Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff's Reagent in Plant Materials', *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86: 1124-27.
- Stavrinides, A. K., E. C. Tatsis, T. T. Dang, L. Caputi, C. E. M. Stevenson, D. M. Lawson, B. Schneider, and S. E. O'Connor. 2018. 'Discovery of a Short-Chain Dehydrogenase from Catharanthus roseus that Produces a New Monoterpene Indole Alkaloid', *Chembiochem*, 19: 940-48.
- Tahir, M. N., F. S. Raz, S. Rondeau-Gagne, and J. F. Trant. 2021. 'The biosynthesis of the cannabinoids', *J Cannabis Res*, 3: 7.

- Toronto, University of. 2018. 'Cannabis sativa genome and transcriptome sequencing project'. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA73819>.
- Turner, C. E., M. H. Hsu, J. E. Knapp, P. L. Schiff, Jr., and D. J. Slatkin. 1976. 'Isolation of cannabistatine, an alkaloid, from Cannabis sativa L. root', *J Pharm Sci*, 65: 1084-5.
- University, Michigan State. 2011. 'Cannabis sativa RNA-Seq - Medicinal Plants Consortium'. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA80055>.
- Unterlinner, B., R. Lenz, and T. M. Kutchan. 1999. 'Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy Papaver somniferum', *Plant J*, 18: 465-75.
- Wang, L. N., H. W. Jiang, J. L. Li, and J. Y. Li. 2018. 'Enhancement of Glucose Utilization by Loesenerine through AMPK Activation in Myotubes', *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 66: 885-86.
- Whitney, K., G. Gracia-Gomez, J. A. Anderson, and S. Simsek. 2022. 'Time Course Metabolite Profiling of Fusarium Head Blight-Infected Hard Red Spring Wheat Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time of Flight/MS', *J Agric Food Chem*, 70: 4152-63.
- Wickham, Hadley, Mara Averick, Jennifer Bryan, Winston Chang, Lucy McGowan, Romain François, Garrett Golemund, Alex Hayes, Lionel Henry, Jim Hester, Max Kuhn, Thomas Pedersen, Evan Miller, Stephan Bache, Kirill Müller, Jeroen Ooms, David Robinson, Dana Seidel, Vitalie Spinu, Kohske Takahashi, Davis Vaughan, Claus Wilke, Kara Woo, and Hiroaki Yutani. 2019. 'Welcome to the Tidyverse', *Journal of Open Source Software*, 4.
- Xiang, Y., X. Jiang, J. Li, B. Sun, Z. Liu, D. Li, M. Wu, R. Wang, and S. Xu. 2026. 'Functional characterization of aldo-keto reductase genes from Lycoris aurea that participate in galantamine biosynthesis', *Plant Sci*, 363: 112869.
- Xu, C., P. Ye, Q. Wu, S. Liang, W. Wei, J. Yang, W. Chen, R. Zhan, and D. Ma. 2022. 'Identification and functional characterization of three iridoid synthases in Gardenia jasminoides', *Planta*, 255: 58.
- Yildiz, Ibrahim. 2024. "“Stepwise or concerted or a hybrid mechanism for berberine bridge enzyme?”: A computational mechanistic study by QM-MM and QM methods', *Journal of Molecular Structure*, 1300.
- Zeiss, D. R., L. A. Piater, and I. A. Dubery. 2021. 'Hydroxycinnamate Amides: Intriguing Conjugates of Plant Protective Metabolites', *Trends Plant Sci*, 26: 184-95.
- Zhang, Liang, Chenxi Gu, and Jianqun Liu. 2022. 'Nature spermidine and spermine alkaloids: Occurrence and pharmacological effects', *Arabian Journal of Chemistry*, 15.
- Zhang, Q., X. Chen, H. Guo, L. M. Trindade, E. M. J. Salentijn, R. Guo, M. Guo, Y. Xu, and M. Yang. 2018. 'Latitudinal Adaptation and Genetic Insights Into the Origins of Cannabis sativa L', *Front Plant Sci*, 9: 1876.
- Zhao, W., J. Liu, and Y. Chen. 2025. 'Advances in the biosynthesis of naturally occurring benzyloquinoline alkaloids', *Front Plant Sci*, 16: 1548471.
- Zhu, W., B. Yang, S. Komatsu, X. Lu, X. Li, and J. Tian. 2015. 'Binary stress induces an increase in indole alkaloid biosynthesis in Catharanthus roseus', *Front Plant Sci*, 6: 582.

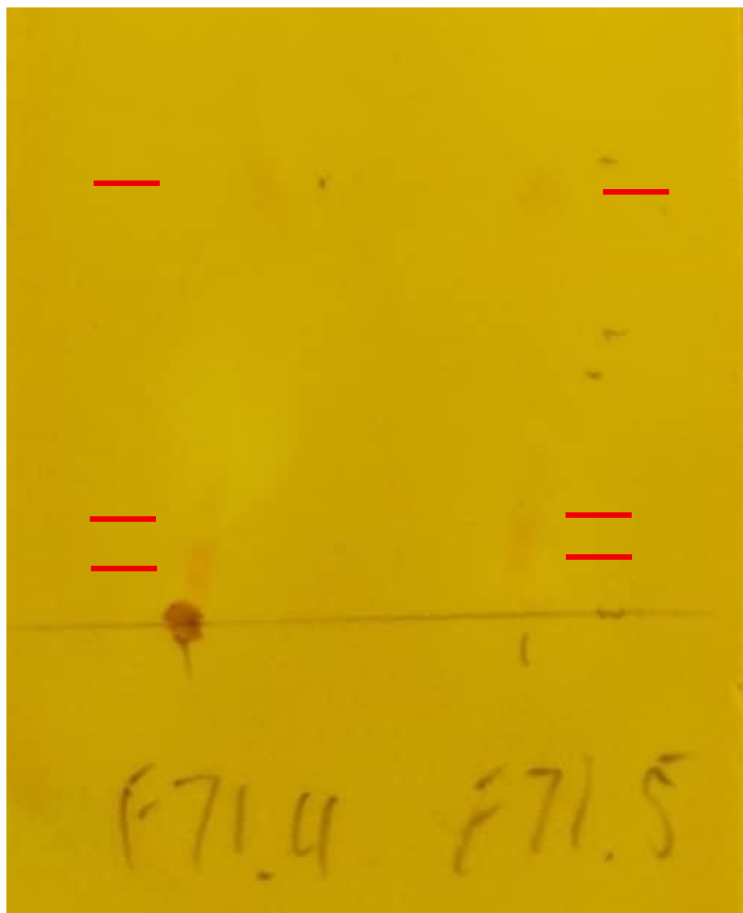
2.12 Supplementary Material



Supplementary Figure S2.17: Pairwise gene correlation for co-expression network assembly.
The black line near the 1.0 mark represents the r cut-off ($r = 0.98635$).



Supplementary Figure S2.18: Optimization of resolution for co-expression network construction.



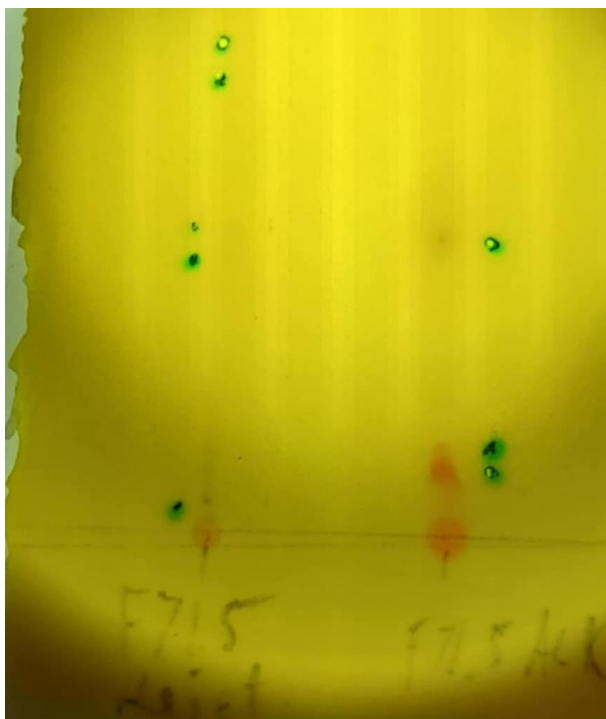
Supplementary Figure S2.19: F71.4 & F71.5 react positively to Dragendorff's reagent on thin layer chromatography.

R_f of F71.4 are 0.03; 0.07 & 0.28. R_f of F71.5 are 0.04; 0.09 & 0.27. Eluant [150 μL H_2O : 200 μL MeOH: 1650 μL ethyl acetate].



Supplementary Figure S2.20: Positive reaction of acid-base extract of F71.4 & F71.5 for Dragendorff's reagent on thin layer chromatography.

Left figure, F71.4 (from left to right, F71.4 waste soluble fraction; F71.4 alkaloid fraction; F71.4 waste insoluble fraction). R_f of F71.4 ALK is 0.04. Right figure, (from left to right, F71.5 waste fraction; F71.5 alkaloid fraction). R_f of F71.5 ALK are 0.04; 0.05 & 0.18. Eluant [1:1:8] (H₂O: MeOH: ethyl acetate).



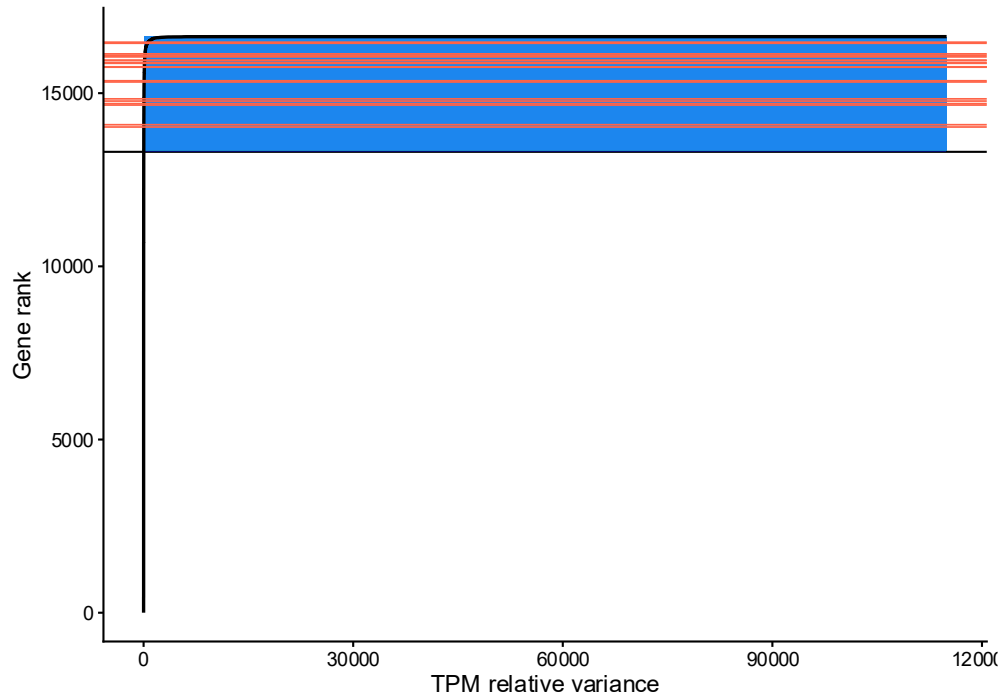
Supplementary Figure S2.21: F71.5 has two positive reactions for Dragendorff's reagent with near-identical R_f .

Same TLC plate as Supplementary Figure S2.20 but illuminated to highlight the two distinct positive reactions of R_f 0.04 & 0.05.

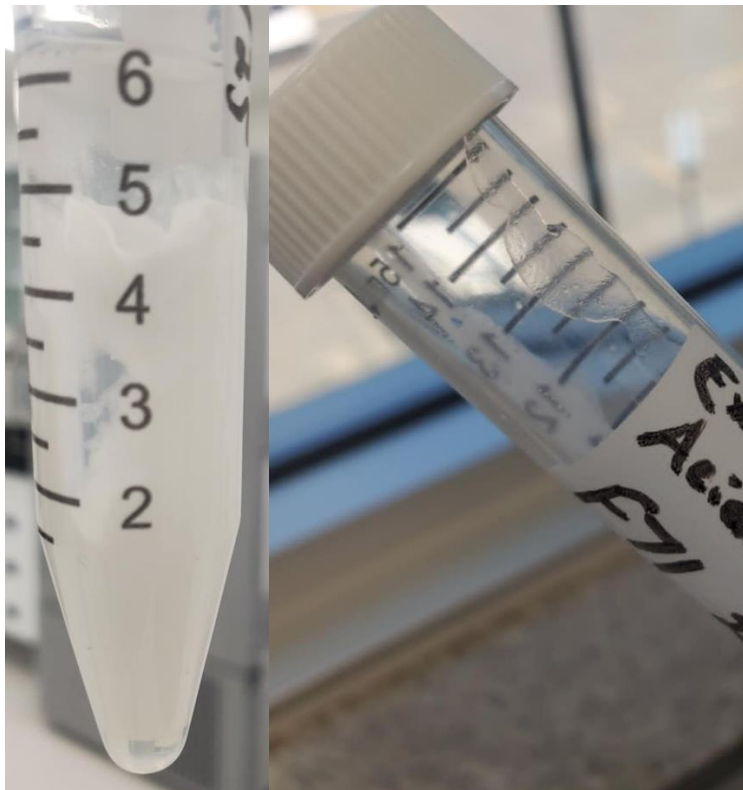
Supplementary table S2.8: Listing of selected bait genes and reason for their inclusion in the study

Name	Gene ID	Reason for selection	Reference
4-coumarate-CoA ligase 1	115699364	Phenylpropanoid pathway	(169)
4-coumarate-CoA ligase 2	115717276		
Acyl-lipid (9-3)-desaturase	115707010	Polyunsaturated fatty acid biosynthesis	(170)
Acyl-lipid omega-3 desaturase (cytochrome b5), endoplasmic	115720710	Polyunsaturated fatty acid biosynthesis	(170)
Agmatine deiminase	115710158	Polyamine production	(171)
Arginine decarboxylase	115725364	Polyamine production	(171)
Caffeic acid 3-O-methyltransferase	115706440	Hydroxycinnamic acid amide production	(169)
Caffeic acid 3-O-methyltransferase	115716906		
Caffeic acid 3-O-methyltransferase	115721930		
Caffeic acid 3-O-methyltransferase	115723302		

Caffeic acid 3-O-methyltransferase	115716367		
delta(12)-oleate desaturase-like	115718446	Polyunsaturated fatty acid biosynthesis	(170)
delta(12)-fatty-acid desaturase FAD2	115701196	Polyunsaturated fatty acid biosynthesis	(170)
delta(12)-fatty-acid desaturase FAD2	115719000	Polyunsaturated fatty acid biosynthesis	(170)
delta(8)-fatty-acid desaturase 1	115702099	Polyunsaturated fatty acid biosynthesis	(170)
Long chain acyl-CoA synthetase 1-like	133031738	Lipid metabolism	(172)
Long chain acyl-CoA synthetase 4	115715699	Lipid metabolism	(172)
Long chain acyl-CoA synthetase 8	115698544		(172)
N-carbamoylputrescine amidase	115721138	Polyamine production	(171)
Ornithine decarboxylase	115714249	Polyamine production	(171)
Phenylalanine ammonia-lyase	115709862	Phenylpropanoid pathway	(169)
Phenylalanine ammonia-lyase 1	115706668		
Phenylalanine ammonia-lyase	115709282		
Phenylalanine ammonia-lyase	115711262		
Phenylalanine ammonia-lyase	115709383		
Phenylalanine ammonia-lyase	115710187		
Spermidine Synthase I	115712839	Polyamine production	(171)
Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase, chloroplastic	115697755	Polyunsaturated fatty acid biosynthesis	(170)
Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase, chloroplastic	115698723		
trans-cinnamate 4-monooxygenase	115719463	Phenylpropanoid pathway	(169)
Tyrosine decarboxylase	115696858	Hydroxycinnamic acid amide production	(169)
Tyrosine decarboxylase	115721923		
Tyrosine decarboxylase 1	115721880		



Supplementary Figure S2.22: Bait genes rank amongst the highest variable genes. Blue box indicates the top 20% most variable genes, based on TPM relative variance. Red lines represent bait genes.



Supplementary Figure S2.23: Addition of sulfuric acid (2%) in F71 creates a semi-rigid foam.

On the left figure, there is a small volume of chloroform at the bottom of the Falcon tube (<1 mL). The foam is mostly in aqueous fraction but is insoluble in both fractions. On the right figure, a gel-like texture is formed from the semi-rigid foam coating the inside of the tube.

3 Chapitre III – Discussion

La médecine traditionnelle est le socle sur lequel s'est bâtie la pratique médicale contemporaine. Cette première est encore très prévalente à travers le globe. Longuement entretenues, ces pratiques traditionnelles se basent sur des observations empiriques (l'efficacité des traitements) et souvent mélangées à des croyances ethnospcifiques. Les plantes médicinales sont des acteurs importants de la médecine traditionnelle et plusieurs espèces ont vu leur pertinence ethnopharmacologique validée par des études scientifiques (173). *C. sativa* figure parmi ces espèces utilisées traditionnellement, dont la pertinence thérapeutique est consolidée par des études contemporaines. Les travaux des 10 dernières années sur les racines de *Cannabis* justifient certaines de ces utilisations, notamment pour les troubles utérins (relatifs à l'accouchement et aux menstruations) (101), pour leur activité anti-inflammatoire, qui par ailleurs pourrait être reliée au système endocannabinoïde (174) et leur application antimicrobienne (78). Certains métabolites ont déjà des activités biologiques établies pouvant contribuer aux effets observés des extraits de racines, comme le triterpène friedéline et la phényléthylamine hordénine, or les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine sont des entités suspectées d'y jouer un rôle. Cette présomption est fondée sur le rôle prédominant de la classe des alcaloïdes en médecine, avec les quelques exemples de la morphine, la galantamine, la vinblastine, l'atropine et la quinine. Pour cette raison, une investigation métabolomique et transcriptomique des alcaloïdes de *C. sativa* fut réalisée. Cette investigation se veut préliminaire; puisque peu est connu sur ces alcaloïdes, toute information les concernant est précieuse. D'une part, pour démontrer la pertinence de leur étude, une tentative de purification des alcaloïdes dans le dessein de confirmer une activité biologique a été entreprise, vu le manque de disponibilité de standards commerciaux. D'une autre, afin de déclencher le processus de caractérisation de leur voie biosynthétique, un réseau de co-expression a été généré pour permettre l'identification d'au moins un gène candidat et sa caractérisation enzymatique.

3.1 Métabolomique – retour sur la méthode

3.1.1 Matériel végétal

Les racines hydroponiques sont exceptionnellement adéquates pour l'extraction de métabolites puisqu'elles sont propres, nécessitant peu de traitement par rapport à des extraits en terre. Or, précisément parce qu'elles poussent dans l'eau, elles sont imbibées à la récolte, ce qui génère ses propres enjeux. D'abord, ~ 95% de la masse des racines à la récolte fut perdue au séchage. La manutention constitue essentiellement à transporter de l'eau, ce qui est déplaisant, car futile. Les racines furent séchées dans des bacs à l'air libre, et quoiqu'elles soient propres, les racines pourraient être à risque de moisir si laissées à baigner dans trop d'eau trop longtemps. Elles ont donc été retournées périodiquement. Cette méthode est convenable pour des petites quantités de racines, or la tâche devient

rapidement démesurée et encombrante lorsqu'il y a plusieurs kilogrammes de biomasse à traiter. Dû à la méthode de culture, les racines formaient essentiellement des tapis lorsque récoltées, il serait donc intéressant de vérifier si elles ne peuvent pas être suspendues, comme les fleurs sont séchées en industrie, afin d'éviter de les manipuler durant ce processus et possiblement sauver de l'espace. De plus, il serait pertinent de se pencher sur l'effet de la méthode de culture (hydroponique ou en terre) sur le profil métabolomique des racines, puisqu'on s'attend à ce qu'un même cultivar présente des différences en fonction de la méthode (175).

3.1.2 Broyage

Pour augmenter l'efficacité de l'extraction, la surface de contact entre la matrice végétale et le solvant doit être maximisée. Pour s'y prendre, les racines ont été broyées avec un broyeur industriel, ce qui alla à merveille. D'autres méthodes de déchiquetage ont été testées, mais leur efficacité était médiocre. Les racines ont été coupées aux ciseaux, au mélangeur à lames et broyées au mortier et pilon avec et sans azote liquide, mais celles-ci sont très dures et n'offrent pas un résultat satisfaisant (à savoir une poudre fine), en plus de prendre beaucoup de temps. Une avenue qui demeure cependant inexplorée est la lyophilisation des racines fraîches, qui pourrait faciliter leur broyage au mortier, en autre en évitant d'utiliser de l'azote liquide, permettant plus de rigueur dans le broyage. Dans tous les cas, le broyage de racines de *Cannabis* est une tâche complexe à moyenne-grande échelle, certes favorisant un meilleur rendement d'extraction, mais nécessitant du matériel qui n'est pas disponible à quiconque, ou bien qui est extrêmement chronophage. Dans le recyclage de la biomasse racinaire de *C. sativa*, ce processus se dresse comme une potentielle étape limitante.

3.2 Métabolomique – retour sur les résultats

Concernant la purification des alcaloïdes plusieurs éléments initialement indéterminés sont dorénavant connus, facilitant désormais l'entreprise de leur isolation, comme leur facteur de rétention (R_f). Quoiqu'il ait été possible de générer des spectres de fragmentation MS/MS à partir des fractions F71.4 et F71.5 pour les deux alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine connus, les fractions produites n'étaient cependant pas assez pures pour pouvoir réaliser des tests d'activité biologique, en rapportant la potentielle activité observée comme étant indubitablement celle des alcaloïdes. D'abord, lors de la purification sur colonne, les composés ciblés se sont étirés sur plusieurs fractions, signifiant qu'il y a eu un grand laps de temps entre les premiers alcaloïdes à être sortis de la colonne, et les derniers. D'ailleurs, ce phénomène se reproduit lors des analyses au HPLC-MS/MS, où le pic attribué à la cannabisativine est très large, signifiant une élution traînante de la molécule, qui est due probablement à sa structure. Il est fort probable que l'élution de la chromatographie sur colonne ait été tout de même trop agressive pour la séparation des alcaloïdes et la polarité de l'éluant pourrait être amoindrie. Idéalement, le composé cherché sortirait en le moins de fractions possible, afin de maximiser sa quantité finale, mais il y a

bien certainement un compromis à avoir avec la pureté de la fraction obtenue. En second lieu, la chromatographie préparative a été légèrement problématique. En effet, les structures rapportées des deux alcaloïdes dérivés de la spermidine du *Cannabis* sont très similaires. Conséquemment, leur élution sur la plaque de chromatographie est compliquée, puisqu'ils migrent sous la forme d'un zigzag, un patron de migration qui n'est pas commun chez les autres composés, possiblement parce qu'ils ont tendance à migrer ensemble (Figure 3.24). Sous lumière UV, on pouvait observer deux entités clairement définies aux UV longs et courts, qui ont rendu les fractions F71.4 & F71.5. Or, F71.5 contient les deux alcaloïdes putatifs, tandis que F71.4 contient seulement la cannabisativine putative.

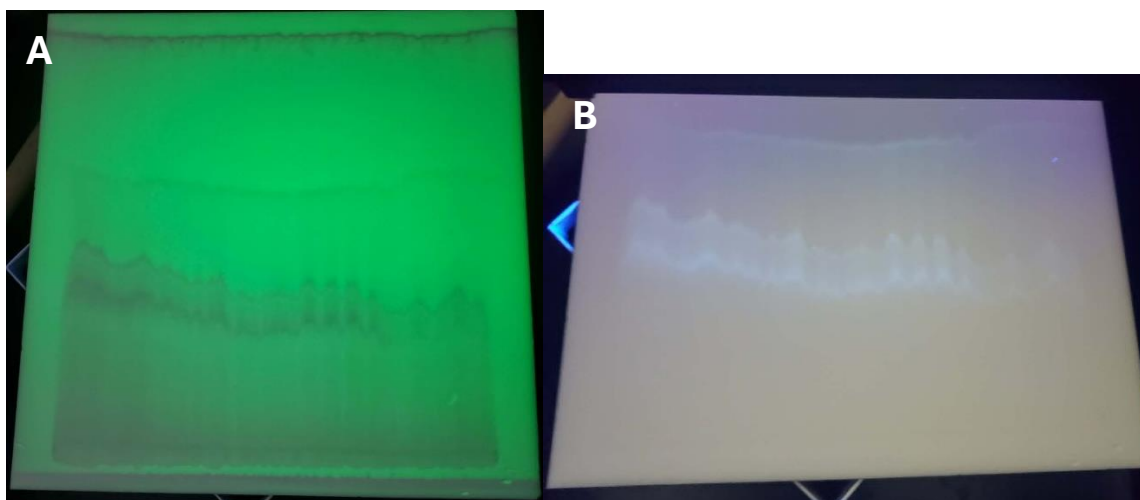


Figure 3.24 : Le patron de migration sur chromatographie sur couche mince des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine est visible sous lumière UV.

Plaque de chromatographie préparative de F71 visualisée sous lumière UV **A)** à courte (254 nm), et **B)** à longue longueur d'onde (365 nm). Plaque de silice F254 contenant un indicateur fluorescent qui émet une lumière verte sous UV. Les composés qui absorbent à 254 nm (principalement ceux possédant des cycles aromatiques, des doubles liaisons conjuguées ou des systèmes π conjugués) bloquent cette fluorescence et apparaissent sous forme de taches sombres sur un fond fluorescent. À 365 nm, la plaque n'est généralement pas fluorescente. En revanche, certains composés émettent eux-mêmes une fluorescence ou deviennent très visibles grâce à leur fluorescence naturelle (p. ex. flavonoïdes, coumarines, alcaloïdes, chlorophylles).

Une extraction acido-basique est généralement adéquate pour sélectionner ces composés aux propriétés alcalines. Or, cette étape de la purification a mené à des observations inattendues. En théorie, lors de l'extraction acido-basique, l'acide utilisé se déprotone en solution et ce proton sera éventuellement transféré à un azote de l'alcaloïde, lui conférant une charge positive, facilitant alors grandement sa dissolution dans la phase aqueuse. Or, dans le cas des extraits de racines de *Cannabis*, une mousse semi-rigide retrouvée dans la phase aqueuse, mais insoluble dans celle-ci, comme dans l'autre phase, est formée en conditions acides. Ce phénomène est probablement responsable du faible rendement de l'extraction acido-basique, où plus du trois-quarts de la quantité de cannabisativine putative

est demeurée dans la fraction de rejets (à savoir la fraction de chloroforme obtenue en conditions acides, afin de récupérer les composés neutres). Cette mousse fut observée seulement dans les sous-fraction de F71 où l'analyse HPLC-MS (ESI+) détectait un ion dont la masse $[M+H]^+$ correspondait aux alcaloïdes ciblés. Comme les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine sont visiblement constitués d'une molécule d'acide gras lipophile et d'une spermidine hydrophile, il est raisonnable de présumer que ceux-ci sont responsables de cette texture.

Comme les alcaloïdes du genre *Equisetum* sont les molécules connues se rapprochant structurellement le plus de ceux produits par *C. sativa*, ils sont des analogues auxquels il est pertinent de s'intéresser. Pour cette raison, des plantes ayant vraisemblablement l'apparence de prêle des champs ont été collectées à l'extérieur et elles ont été extraites de la même façon que les racines de *Cannabis* (Figure 3.25A). Comme l'hypothèse posée était que les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine sont responsables de la mousse produite en conditions acides de l'extraction acido-basique, on s'attendrait à ce que l'extrait de prêles des champs produise une réaction similaire. Les observations corroborèrent effectivement l'hypothèse, puisque le même phénomène se produisit (Figure 3.25B). De plus, des réactions positives au réactif de Dragendorff ont été observées pour les deux fractions obtenues après l'extraction acido-basique d'*Equisetum* (Figure 3.25C). Comme pour les alcaloïdes du *Cannabis*, la fraction rejet contenait plus de réactions positives au réactif de Dragendorff que la fraction où on s'attendrait à obtenir les alcaloïdes. À noter également, la couleur de ce qui semble être le même composé dans les deux fractions, qui est brunâtre dans la fraction « rejet » et orangé dans la fraction « alcaloïdes ». Cette variation de couleur avait aussi été observée après l'extraction acide-base pour l'extrait de *Cannabis*. Un article sur les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermine et de la spermidine mentionne explicitement que la palustrine n'est pas isolable facilement (176). Il en convient que c'est le cas pour les alcaloïdes de *C. sativa* également.

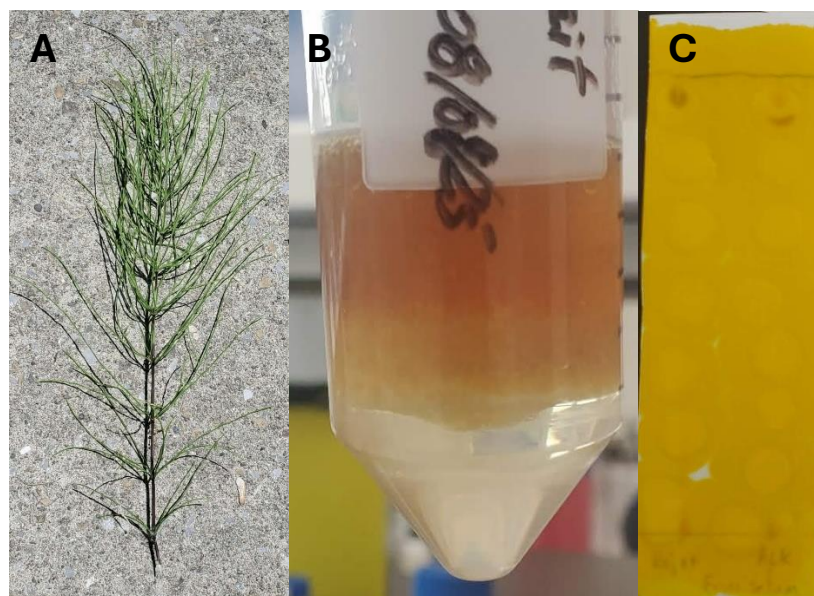


Figure 3.25 : Un extrait d'*Equisetum* produit des résultats analogues à ceux d'extraits de racines de *Cannabis*.

A) Apparence des plantes extraites, présumées être du genre *Equisetum*; **B)** l'extraction acido-basique de l'extrait produit une phase mousseuse intermédiaire en conditions acides avec du chloroforme; **C)** à gauche, la fraction « rejets », obtenue après acidifications avec du H_2SO_4 (2%) et rapatriement avec du chloroforme. Les réactions positives se retrouvent en bas et en haut de plaque ($R_f \sim [0,0 - 0,3] \& [0,9 - 1,0]$); à droite, la fraction « alcaloïdes », obtenue après alcalinisation de la phase aqueuse avec du NH_4OH et rapatriement avec du chloroforme. Éluant [H_2O : MeOH : acétate d'éthyle] (1 : 1 : 8).

La structure des alcaloïdes macrocycliques de *C. sativa* semble leur conférer des propriétés particulières. Celles-ci pourraient expliquer le faible rendement de l'extraction acido-basique, mais également la variation des temps de rétention observée dans les analyses HPLC-MS/MS au fil du processus de purification. Initialement, un composé avec une masse $[M+H]^+$ correspondant à celle attendue pour la cannabissativine avait été détecté à 18 minutes suivant la chromatographie sur colonne. Cependant, après les étapes de purification de chromatographie sur couche mince et d'extraction acido-basique, pour les mêmes conditions d'analyse HPLC-MS/MS, ce composé a vu son temps de rétention diminuer à 11 minutes. De plus, dans les sous-fractions purifiées de F71, le temps de rétention dudit composé est loin d'être constant à travers les analyses. Dans une même analyse HPLC-MS/MS où les spectres de fragmentation MS/MS ont été générés, différentes fractions purifiées avaient des temps de rétention qui variaient jusqu'à 0,5 minute entre les échantillons pour la cannabissativine putative, ce qui semble beaucoup trop pour être simplement la marge d'erreur de l'appareil. En revanche, il faut prendre garde au fait que chaque fraction injectée n'avait qu'un seul réplica, ainsi les temps de rétention comparés le sont donc pour différents échantillons contenant putativement le même composé, plutôt que de comparer l'échantillon à lui-même. Pareillement, une molécule

avec la masse $[M+H]^+$ correspondant à l'anhydrocannabisativine avait été suivie à travers la purification et son temps de rétention est passé de 19 minutes après la colonne chromatographique, à 17 minutes après la chromatographie préparative et l'extraction acido-basique. Ce phénomène suggère que les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine sont sensibles à leur environnement chimique. Puisque l'analyse HPLC-MS/MS se fait dans des conditions acides, il est fort probable que la mousse observée se forme et possiblement qu'elle interagit avec d'autres molécules dans sa vicinity, pouvant alors modifier son affinité pour la colonne du HPLC et ainsi, son temps de rétention.

Les alcaloïdes de *C. sativa* ont énormément de possibilités d'interagir avec d'autres entités dû au grand nombre d'interactions intermoléculaires qu'ils peuvent réaliser. D'abord, ils présentent une fonction amide pouvant former des ponts hydrogènes par l'entremise de l'azote et de l'oxygène impliqués, mais leur macrocycle contient deux atomes d'azote supplémentaires, pouvant faire de même. Ensuite, une contrainte est engendrée par la coexistence du macrocycle et de l'hétérocycle de 6 atomes, formant une sorte de cavité au potentiel d'interactions hydrogènes élevé. La queue de sept carbones de long, arborant de l'oxygène près de son point d'attachement, sous la forme d'une cétone ou de deux hydroxyles dépendamment de l'alcaloïde, peut participer dans des interactions de van der Waals et des ponts hydrogènes. Les structures tridimensionnelles suggèrent que ces alcaloïdes pourraient effectivement former des micelles, voire des supramolécules, particulièrement en conditions acides, où le macrocycle devient théoriquement chargé.

3.3 Transcriptomique – retour résultats

Les données transcriptomiques publiques n'étaient pas particulièrement nombreuses, mais somme toute adéquates. Les données pour plusieurs organes étaient disponibles et convenables à l'analyse planifiée, or le manque de données de provenance multiple pour certains de ces organes (p. ex. méristème, trichomes) limite l'interprétation de leur regroupement dans l'analyse de composante principal, et donc limite également le jugement de la qualité des résultats obtenus. Malgré cela, nous trouvions pertinent l'inclusion de ces organes dans l'analyse, alors les données ont été conservées.

Comme les alcaloïdes de *C. sativa* ont été rapportés dans deux organes, les feuilles et les racines, et dans plusieurs cultivars d'un peu partout dans le monde (177), il fut présumé que leur biosynthèse chez l'espèce est répandue entre les cultivars, mais qu'elle est effectivement restreinte à certains organes. Pour cette raison, seul 20% des gènes dont l'expression est la plus variable à travers les organes ont été utilisés dans le réseau. Ce pourcentage est arbitraire, il aurait pu être plus élevé ou plus faible, avec comme impact le volume du réseau de co-expression, qui contiendrait plus ou moins de gènes. Bien sûr, si ce pourcentage est trop faible, des gènes spécialisés seront exclus du réseau (possiblement ceux que l'on cherche); s'il est trop élevé des gènes impertinents à notre recherche viendraient inutilement gonfler la taille du réseau et alourdir le travail d'analyse. Pour

s'orienter dans le réseau de co-expression, des gènes guides ont été utilisés comme repères, parce qu'ils sont impliqués en amont de la biosynthèse des métabolites spécialisés ciblés. Ceci permet la localisation rapide de gènes d'intérêt, étant donnée la raison d'être du réseau de co-expression, qui est de rassembler dans des modules des gènes dont l'expression est positivement corrélée l'un à l'autre. On s'attend alors à ce que des gènes impliqués dans une même voie biosynthétique se regroupe. Près de la moitié des gènes guides sont d'ailleurs parvenus à être inclus dans le réseau de co-expression, majoritairement des gènes de la voie des phénylpropanoïdes, corroborant le caractère spécialisé du réseau et suggérant que les gènes ciblés y sont inclus. En effet, les gènes ne l'ayant pas été sont issus du métabolisme des acides gras et de la voie des polyamines, qui sont des métabolites plutôt généraux. De plus, l'expression des gènes guides semblait refléter les organes d'accumulation des métabolites reliés à ces gènes.

Le module 14 (Figure 2.15, Tableau 2.7), dans lequel se retrouve les gènes d'intérêt, suggère une forte implication dans la défense végétale et l'immunité. Ce premier élément de preuve est la présence de trois *Tyrosine Décarboxylases (TYDC)*, qui sont responsables de la production de tyramine, molécule impliquée dans la biosynthèse de composés défensifs. Deuxièmement, plusieurs gènes annotés comme des *Bet v1* se retrouvent aussi dans ce module. Ces dernières sont des protéines allergènes chez les animaux et jouent un rôle dans les stress biotiques et abiotiques chez les plantes. Leur expression répond à des phytohormones comme l'acide abscissique, l'acide salicylique, le jasmonate de méthyle et l'acide jasmonique (178). Finalement, les annotations des gènes du module d'intérêt avaient également une connotation défensive. Ainsi, on peut espérer trouver dans ce module des gènes responsables de la biosynthèse de métabolites défensifs, comme les amides d'acides hydroxycinnamique, les lignanamides et possiblement les alcaloïdes dérivés de la spermidine.

Concernant le contenu du module 14, il est particulier que la totalité des *TYDC* se retrouve dans un et même module, puisque les *Phénylalanine Ammonia-lyase*, au nombre de cinq copies, se retrouvent au mieux à deux gènes dans un même module. Ceci suggère que les trois *TYDC* sont coexprimées dans le même tissu, sensiblement aux mêmes desseins. Pour former un module dans le réseau, on doit pouvoir rassembler un minimum de cinq gènes ayant une corrélation positive entre leur expression. Ce seuil a également été établi arbitrairement, or cinq correspond au nombre de réactions enzymatiques minimalement attendu pour la biosynthèse de la cannabissativine. Le module 14 contient 254 gènes, ce qui est un nombre considérable. De cette information seule, on peut présumer que la résolution du réseau de co-expression pourrait être augmentée, ce qui est le cas. Cependant, la résolution du réseau pour cette analyse est demeurée résolument faible, afin de favoriser une vue d'ensemble des données, plutôt que se perdre dans les détails et risquer de passer par-dessus des gènes d'intérêt, comme aucun gène biosynthétique n'est connu pour les alcaloïdes ciblés.

Il est pratiquement inévitable que certains gènes d'intérêt passent sous le radar. Sans même considérer la possibilité que certains ont pu être exclus du réseau de co-expression, ils pourraient passer *incognito* dû à certaines annotations qui sont incomplètes ou trop générales pour pouvoir déceler leur pertinence. Par exemple, plusieurs peroxydases ont été identifiées dans le module 14. Les peroxydases ont des rôles très diversifiés, allant du maintien de l'homéostasie rédox, à la croissance et au développement, à la production de lignine et autres composés spécialisés et elles sont impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. De plus, leur homologie de séquences entre différentes espèces est faible, quoique leur structure tridimensionnelle soit similaire (179). Le nombre de gènes de peroxydases dans un génome de plante atteint souvent la centaine, avec plusieurs isoenzymes et donc de la redondance fonctionnelle chez celles-ci. Pour ce genre de gènes, il est préférable de sélectionner des candidats après une analyse de co-expression à haute résolution, dans laquelle le nombre de gènes par module est grandement réduit, permettant de classifier davantage le rôle physiologique de chacun de ces modules. Par exemple, des protéines dirigeantes pourraient travailler en tandem avec des peroxydases pour produire des lignanamides (146). La peroxydase viendrait oxyder, tandis que la dirigeante confère la stéréospécificité du métabolite produit. Possible aussi qu'une Berberine Bridge Enzyme (BBE) génère du peroxyde par son activité catalytique, nécessitant d'être transformé par une peroxydase afin d'éviter un stress oxydatif. Ainsi, pour déterminer quelle peroxydase pourrait être candidate, on peut sélectionner des gènes de ce genre comme guides, puisque ces derniers sont beaucoup moins nombreux que les peroxydases dans le réseau.

Le réseau de co-expression représente un outil extraordinaire pour la caractérisation fonctionnelle de gènes du métabolisme spécialisé de *C. sativa*. Il a servi pour la production des résultats de ce manuscrit, mais il pourra également servir dans le futur. Initialement, il fut monté pour révéler des gènes d'intérêt, qui seront idéalement caractérisés. Ceci permettra alors d'utiliser un gène nouvellement caractérisé comme gène guide. Ainsi, en jouant avec la résolution du réseau, ce gène guide pourra faciliter l'identification d'autres gènes de la voie, menant possiblement à la caractérisation complète de la voie biosynthétique.

Considérant la structure des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine de *C. sativa*, une réaction attendue dans la voie biosynthétique est la condensation entre un acide gras et une spermidine (Figure 3.26). Comme de fait, le module d'intérêt du réseau de co-expression a révélé un gène annoté comme *Spermidine Coumaroyl-CoA Acyltransférase* dont l'expression est restreinte aux racines (Tableau 2.7). Quoique possible qu'ils soient stockés dans les racines, puisque existants chez d'autres espèces, aucun amide d'acide hydroxycinnamique de spermidine n'a été rapporté chez les graines de *Cannabis*, où on retrouve une abondance d'amides d'acide hydroxycinnamique et de lignanamides (180). Notamment pour cela, ce gène dévoilé par l'analyse transcriptomique est un excellent candidat pour une éventuelle caractérisation enzymatique. Dans l'optique où il est

effectivement responsable de la condensation de la spermidine et d'un acide gras, l'analyse de co-expression pourrait être refait en employant ce gène caractérisé comme guide, facilitant l'identification d'autres gènes impliqués dans la même voie. Autrement, les enzymes attendues dans la voie des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine sont des oxydoréductases, étant donnée la quantité d'oxydations nécessaires pour la fermeture des cycles et l'ajout des hydroxyles (Figure 3.26). Dans le module 14, avec les *TYDC*, on retrouve effectivement de nombreuses oxydoréductases variées, dont une candidate *Berberine Bridge Enzyme* (BBE), qui est similaire structurellement aux cannabinoïdes synthases (CBDAS – BBE : RMSD = **0,633**), (THCAS – BBE : RMSD = **0,665**), (CBCAS – BBE : RMSD = **0,650**) (THCAS – CBDAS : RMSD = **0,154**), en plus de *Flavin-containing Monooxygénases*, de *Dioxygénases* et de *Cytochrome P450*.

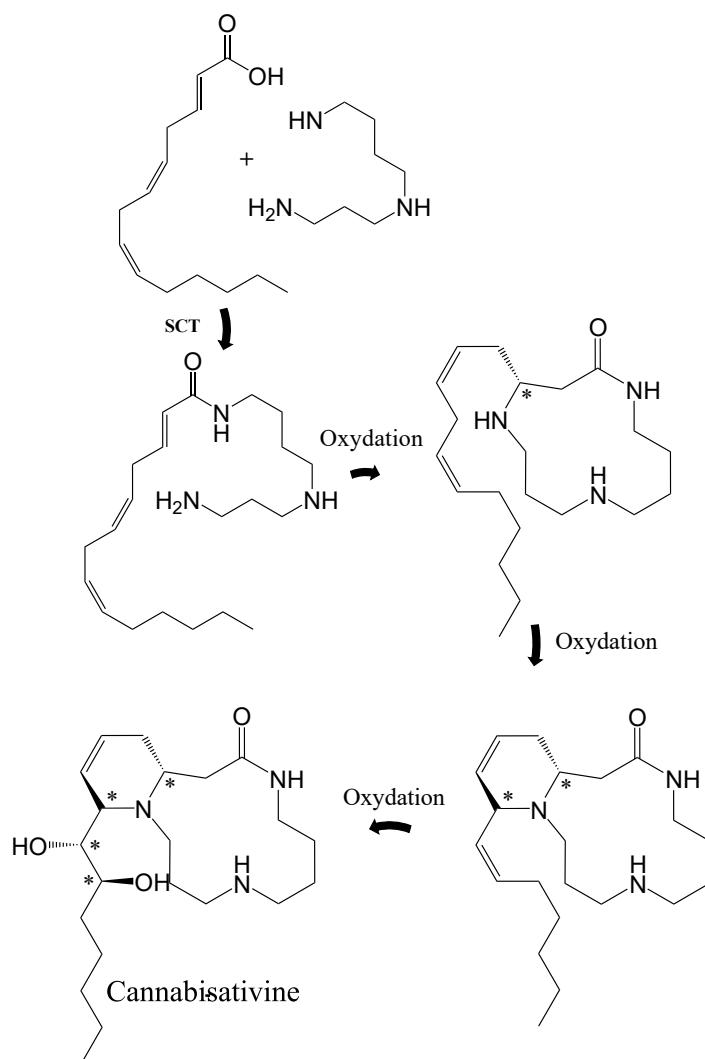


Figure 3.26 : La biosynthèse présumée de la cannabisativine requiert une condensation et une série d'oxydoréductions.

Un acide gras polyinsaturé dérivé de l'acide γ -linolénique est présumé être impliqué dans la

condensation avec la spermidine. Une première oxydation forme le macrocycle, puis une seconde forme l'hétérocycle à six atomes. Une oxydation est également attendue sur la queue hydrophobe. SCT, spermidine coumaroyl-CoA acyltransférase.

3.4 Perspectives des alcaloïdes

Les structures des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine du genre *Equisetum*, particulièrement celle de la palustridiène (Figure 3.27), suggèrent fortement que des acides gras polyinsaturés servent de précurseurs. L'insaturation α - β (π -1) est précisément là où est attendue une oxydation engendrant une liaison covalente entre l'acide gras et la spermidine, formant conséquemment le squelette du macrocycle (Figure 3.27). Une deuxième liaison double (π -2) de la portion acide gras, celle-ci mitoyenne, semble se retrouver intacte dans l'hétérocycle à 6 atomes. Puis finalement, une troisième insaturation (π -3) est attendue dans l'acide gras précurseur, dont celle-ci servirait à l'introduction d'hydroxyle dans la structure des alcaloïdes.

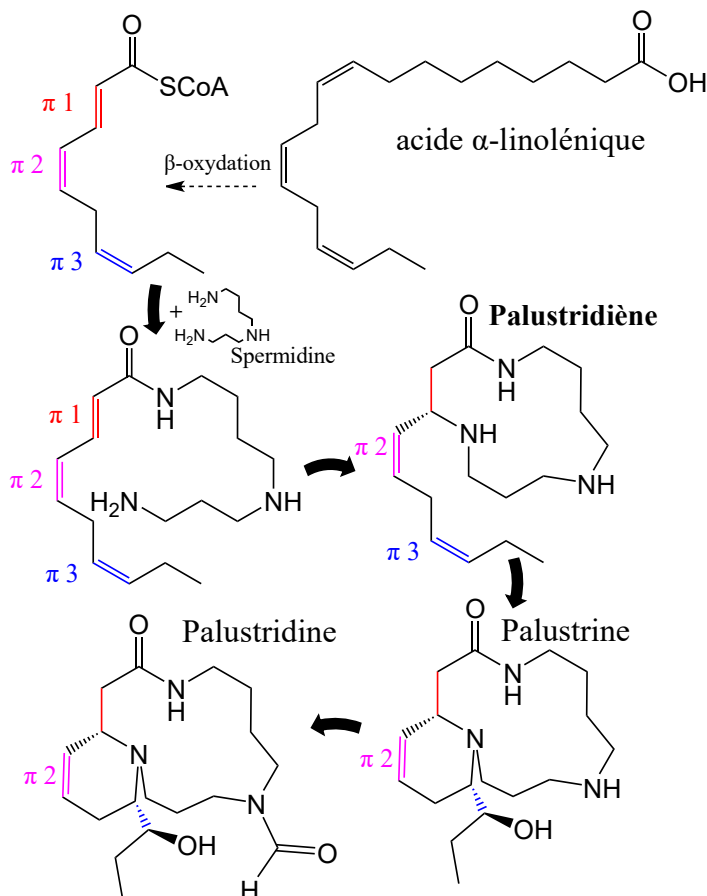


Figure 3.27 : L'acide α -linoléique est probablement le précurseur des alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine du genre *Equisetum*.

L'acide α -linoléique est β -oxydé jusqu'à l'obtention d'un acide gras à 10 carbones. Ce dernier est condensé à la spermidine, où la palustridiène est formée via π -1. L'hétérocycle à six atomes se

ferme via π -3, formant la palustrine. Possible que le groupement hydroxyle soit ajouté simultanément à la fermeture du cycle.

Maintenant, pour *C. sativa*, la question à savoir lequel des deux alcaloïdes macrocycliques entre la cannabissativine et l'anhydrocannabissativine est produit en premier demeure sans réponse. Il est réaliste que le précurseur de l'anhydrocannabissativine voit sa troisième insaturation (π -3) remplacée par une cétone, possiblement par l'action d'une monooxygénase (Figure 3.28). Une aldo-céto réductase pourrait réduire la cétone de l'anhydrocannabissativine en hydroxyle. Il pourrait donc être prédit l'existence d'un alcaloïde intermédiaire à la cannabissativine et l'anhydrocannabissativine, dont l'hydroxyle en position C19 serait présent, mais celui en C18 ne le serait pas encore. Il est possible aussi que l'alcène (π -3) soit transformé en époxyde, auquel cas l'époxyde pourrait être converti en diol par une époxyde hydrolase.

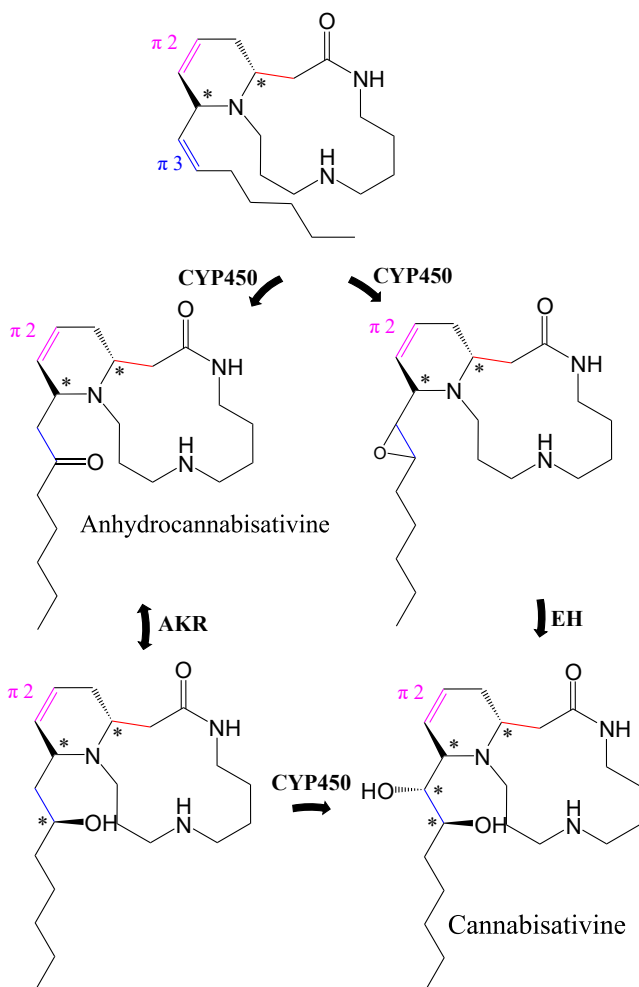


Figure 3.28 : La cannabissativine et l'anhydrocannabissativine sont présumées être produites par oxygénation d'un alcène.

Le précurseur des alcaloïdes serait oxydé en π -3, formant soit une cétone, soit un époxyde. Pour

former la cannabissativine, la cétone est réduite par une AKR, puis le carbone 18 est hydroxylé par une CYP450. Autrement, en π -3 est oxydé en époxyde, où une EH viendrait hydrolyser l'époxyde en diol, formant la cannabissativine. CYP450, cytochrome P450. AKR, aldo-céto réductase. EH, époxyde hydrolase.

Considérant les propriétés putatives des alcaloïdes de *C. sativa*, il se pourrait que ceux-ci soient impliqués dans la séquestration des métaux lourds et autres composés toxiques. Ainsi, les alcaloïdes pourraient contribuer aux qualités phytoremédiantes de l'espèce. De plus, il est possible que l'acide gras précurseur de ces alcaloïdes serve dans la signalisation cellulaire, possiblement inter-espèces. En effet, les oxylipines sont des métabolites produits par l'oxydation d'acides gras insaturés, où peut se produire notamment des cétones, des hydroxyles, des hydropéroxydes et des époxydes (181) (Figure 3.29A). Parmi cette classe de molécules figure l'acide jasmonique, ou plus largement les jasmonates, qui régulent le développement végétal et sont impliqués dans la réponse aux stress biotiques (182). L'acide jasmonique est issu de l'acide α -linoléique, le même précurseur que celui qui est présumé pour les alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine du genre *Equisetum* (Figure 3.29B). Se pourrait-il alors que *C. sativa* ait développé une voie similaire, permettant la production d'oxylipines, mais à partir de l'acide γ -linoléique? Et que cette oxylipine soit éventuellement recyclée en alcaloïdes?

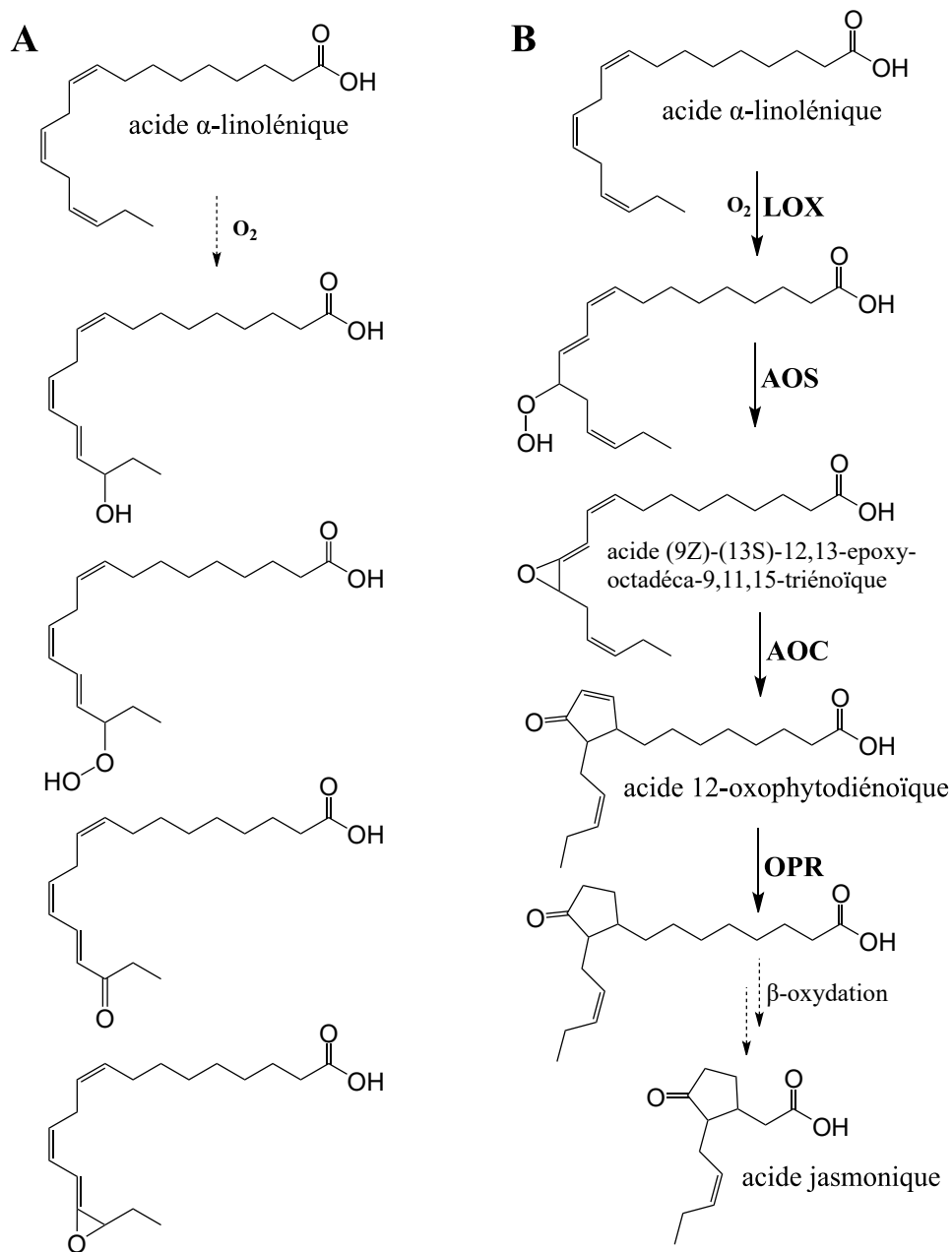


Figure 3.29 : L'acide jasmonique est une oxylipine dérivée de l'acide α -linoléique servant de phytohormone.

A) Exemple d'oxylipines dérivés de l'acide α -linoléique. Leur production peut être spontanée.

B) Résumé de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique. LOX, lipooxygénase. AOS, allène oxyde synthase. AOC, allène oxyde cyclase. OPR, 12-oxophytodiénoate réductase.

Puisqu'un phénomène particulier se produit lorsque les alcaloïdes sont soumis à une extraction acido-basique et même liquide-liquide, il devient intéressant de cribler différents tissus de *C. sativa* afin de préliminairement valider leur présence dans ceux-ci, étant donnée

la rapidité et facilité de cette opération. Ces informations seraient pertinentes à la découverte de gènes biosynthétiques et de potentiels transporteurs dans le cas advenant.

3.5 Perspectives des racines

Les racines de *Cannabis* ont historiquement été utilisée essentiellement en médecine en raison de leur profil métabolomique. Elles le seront alors sans doute dans l'avenir. Cependant, le catalogue des métabolites entreposés dans les racines de *C. sativa* n'est pas encore à point, ce qui rend leur application inefficace, à tâtons. D'ailleurs, il en va de même pour les autres organes de la plante, particulièrement les feuilles, qui contiennent des métabolites au potentiel énorme qui ne sont que très peu exploités et valorisés (183).

Les métabolites des racines pourraient trouver des applications bien sûr dans l'industrie pharmaceutique, mais pour la valorisation des racines, cela pourrait se faire dans l'industrie nutraceutique et possiblement alimentaire. Les usages traditionnels peuvent servir d'inspiration dans le développement de méthodologies reproductibles et efficaces. Les molécules anti-inflammatoires des racines pourraient être transposées directement en médicaments, tandis que la biomasse pourrait être valorisée en ajoutant des extraits de racines dans des crèmes, par exemple dans une crème musculaire et/ou pour les douleurs articulaires, possiblement contre l'eczéma également (Figure 3.30). Des extraits de racines pourraient possiblement aussi être incorporés dans des savons pour leurs propriétés antimicrobienne et antioxydante. Les différentes fractions de racines obtenues après la purification pouvaient dégager d'agréables parfums sucrés. Possiblement que les molécules responsables pourraient être utilisées à des fins alimentaires ou dans la parfumerie.



Figure 3.30 : Schéma de valorisation de la biomasse racinaire inspiré des utilisations traditionnelles.

Comme une utilisation traditionnelle des racines était le traitement des brûlures, des études dans ce contexte pourraient mener au développement de nouveaux produits pouvant les apaiser. Les racines de *Cannabis* ont également été chéries pour le traitement des troubles menstruels et obstétricaux. Le traitement de première ligne de la dysménorrhée primaire constitue essentiellement en la prise d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens afin de jouer sur la voie des prostaglandines, en combinaison à des traitements hormonaux. Il semblerait qu'aucun traitement ne soit plus efficace pour le moment. Certains traitements complémentaires existent, mais ils ne sont pas de nature pharmacologique (184). Les extraits de racines contribuent à réduire la dose effective de médicaments utilisés pour l'atténuation des douleurs de la dysménorrhée, et il serait pertinent d'en investiguer le mécanisme.

3.6 Perspective du *Cannabis*

Tous les organes de la plante de *Cannabis* peuvent servir, la plupart à des fins thérapeutiques. De fait, *C. sativa* pourrait être cultivée afin de répondre à toutes sortes de besoins. De plus, les organes de cette plante peuvent produire toute sorte de biens utilisés par l'entière d'une population, à savoir des vêtements, de la nourriture et des matériaux

de construction pour des domiciles, entre autres. Il est clair que l'approche actuelle au Québec vis-à-vis l'espèce *C. sativa* ainsi que le refus d'intégration de la plante de *Cannabis* dans la culture Québécoise ferme la porte à d'innombrables opportunités, notamment en ce qui a trait au développement économique, culturel et scientifique du Québec. Le mandat de la Société Québécoise Du Cannabis (SQDC), une société filière de la Société des Alcool du Québec (SAQ), « qui est avant tout social, [...] », reflète cette mentalité, « [...], en priorisant la protection de la santé et la sécurité de notre clientèle, [...] » (185). La SQDC, qui détient un monopole de la distribution du *Cannabis*, a pour mission à long terme d'aller chercher les parts du marché du *Cannabis* qui sont détenues par le marché noir. Or, précisément là est le crux du problème. Une façon évidente de réduire l'ampleur du marché noir serait de permettre aux consommateurs de produire leur propre biomasse florale, tel que la loi au niveau fédéral le prescrit, comme il est également possible de produire son propre alcool par fermentation. Il est alors complètement inconsistant de prétendre vouloir limiter l'emprise du marché illicite sur la distribution des fleurs de *Cannabis*, tout en interdisant la culture à dessein personnels à cette dite clientèle (rappelons l'adage « On n'est jamais mieux servi que par soi-même »). De plus, la question de la distribution illégale du *Cannabis* semble essentiellement impossible à gérer et devrait, selon moi, être abandonnée; il est possible d'acheter légalement du *Cannabis* à la SQDC et de le trafiquer tout de même. Au final, où les fleurs ont été procurées n'a aucune incidence sur la légalité de leur distribution. La *Loi encadrant le cannabis* du Gouvernement de la Coalition Avenir Québec (Projet de Loi 157) trahit la mission même de la SQDC, car elle stipule que toute culture de *Cannabis* à des fins personnelles est prohibée et que même la possession d'un plant (il pourrait être mâle – donc récréativement inintéressant) l'est tout autant. C'est véritablement suite à cette réalisation qu'on saisit bien le dessein de cette loi, qui suggère que la consommation de fleurs de *Cannabis* soit perçue comme nécessairement dangereuse. Certains ont préféré que le gouvernement se porte garant de la responsabilité de la sécurité du consommateur. Cette approche à la régulation du *Cannabis* dissimule un mépris certain, étant donné le caractère infantilisant de la déresponsabilisation qu'elle préconise. Puisque le mandat de la SQDC n'est pas commercial, tel que la société déclare elle-même, il en résulte une déconnexion face aux consommateurs et au marché du *Cannabis*, entraînant possiblement des retards dans le développement et les innovations du secteur du *Cannabis*, où dois-je rappeler, nous avons une position extrêmement favorable étant un des rares états où la consommation récréative est légalisée. Nous sommes donc en posture d'être des pionniers dans l'industrie du *Cannabis* et ses diverses applications. Le monopole dont privilégie la SQDC nullifie leur besoin d'être compétitif, puisque sa pérennité est assurée; aucun concurrent ne peut la déloger. Des innovations dans le domaine gastronomique, pharmaceutique, agricole, de la mode, du bâtiment, du tourisme... Il n'y a qu'à imaginer. Si on veut découvrir comment exploiter cette culture, et je prescrirai que nous avons intérêt à le faire, on doit alors se permettre de l'explorer.

Les racines de *Cannabis* ne sont qu'un instrument pour les enjeux entourant la démocratisation de la culture de *Cannabis* et la revalorisation de sa biomasse. L'idée étant d'exploiter toute partie de la plante ayant un potentiel quelconque et de ne pas la jeter, étant donné qu'elle peut servir. Générer de la richesse à partir de rejets. Or, cette revalorisation fait également beaucoup de sens lorsque la production de biomasse est démocratisée, car le moteur d'innovation est beaucoup plus performant; ses applications ont une base plus large (dans le sens où on cherche à répondre à ses propres besoins, plutôt que ceux d'un consommateur – encore cet adage) et décentralisée, ce qui favorise l'émergence d'une avenue de revalorisation. Une autre façon de voir ceci est qu'en contexte démocratisée, beaucoup plus de cerveaux travaillent à trouver une solution. D'autant plus que nous pouvons nous inspirer des applications traditionnelles pour s'orienter. Nous ne partons pas de zéro.

4 Chapitre IV - Références

1. McPartland J. Cannabis: the plant, its evolution, and its genetics—with an emphasis on Italy. *Rendiconti Lincei Scienze Fisiche e Naturali*. 2020;31(4):939-48.
2. Clarke RC, Merlin MD. Cannabis Domestication, Breeding History, Present-day Genetic Diversity, and Future Prospects. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2017;35(5-6):293-327.
3. Rull V. Origin, early expansion, domestication and anthropogenic diffusion of Cannabis, with emphasis on Europe and the Iberian Peninsula. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 2022;55.
4. Ren G, Zhang X, Li Y, Ridout K, Serrano-Serrano ML, Yang Y, et al. Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of Cannabis sativa. *Sci Adv*. 2021;7(29).
5. McPartland JM, Hegman W, Long T. Cannabis in Asia: its center of origin and early cultivation, based on a synthesis of subfossil pollen and archaeobotanical studies. *Vegetation History and Archaeobotany*. 2019;28(6):691-702.
6. Rull V, Burjachs F, Carrión JS, Ejarque A, Fernández S, López-Sáez JA, et al. Historical biogeography of Cannabis in the Iberian Peninsula: A probabilistic approach using palynological evidence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 2023;58.
7. Balant M, Gras A, Ruz M, Valles J, Vitales D, Garnatje T. Traditional uses of Cannabis: An analysis of the CANNUSE database. *J Ethnopharmacol*. 2021;279:114362.
8. Duncan PM. Substance Use Disorders: A Biopsychosocial Perspective. Press CU, editor 2020.
9. Rupasinghe HPV, Davis A, Kumar SK, Murray B, Zheljazkov VD. Industrial Hemp (Cannabis sativa subsp. sativa) as an Emerging Source for Value-Added Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. *Molecules*. 2020;25(18).
10. Lapierre E, Monthey AS, Torkamaneh D. Genomics-based taxonomy to clarify cannabis classification. *Genome*. 2023;66(8):202-11.
11. Moliterni VMC, Cattivelli L, Ranalli P, Mandolino G. The sexual differentiation of Cannabis sativa L.: A morphological and molecular study. *Euphytica*. 2004;140(1-2):95-106.
12. Monthey AS, Roy J, de Ronne M, Carlson O, Murch SJ, Torkamaneh D. Sex-specific ethylene responses drive floral sexual plasticity in Cannabis sativa. *Plant J*. 2026;125(3):e70721.
13. Baek Y, Vergara D. A review of sexual strategies in Cannabis sativa L. under genomic and environmental controls. *Agrosystems, Geosciences & Environment*. 2025;8(1).
14. Welling MT, Deseo MA, Bacic A, Doblin MS. Untargeted Metabolomic Analyses Reveal Chemical Complexity of Dioecious Cannabis Flowers. *Australian Journal of Chemistry*. 2021;74(6):463-79.
15. Lipson Feder C, Cohen O, Shapira A, Katzir I, Peer R, Guberman O, et al. Fertilization Following Pollination Predominantly Decreases Phytocannabinoids Accumulation and Alters the Accumulation of Terpenoids in Cannabis Inflorescences. *Front Plant Sci*. 2021;12:753847.

16. Robert C. Clarke MDM. Cannabis: Evolution and Ethnobotany: University of California Press; 2013.
17. Ansari O, De Prato L. Current Knowledge on Phytoremediation Potential of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) for PFAS and Heavy Metal Contaminated Soils. *Remediation Journal*. 2026;36(2).
18. Shelly D, Lee SY, Park SJ. Hemp fiber and its bio-composites: a short review part II—applications and life cycle assessment. *Advanced Composites and Hybrid Materials*. 2025;8(5).
19. Callaway JC. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*. 2004;140(1-2):65-72.
20. Mirpoor SF, Giosafatto CVL, Di Girolamo R, Famiglietti M, Porta R. Hemp (*Cannabis sativa*) seed oilcake as a promising by-product for developing protein-based films: Effect of transglutaminase-induced crosslinking. *Food Packaging and Shelf Life*. 2022;31.
21. Ryz NR, Remillard DJ, Russo EB. Cannabis Roots: A Traditional Therapy with Future Potential for Treating Inflammation and Pain. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2017;2(1):210-6.
22. Fordjour E, Manful CF, Sey AA, Javed R, Pham TH, Thomas R, et al. Cannabis: a multifaceted plant with endless potentials. *Front Pharmacol*. 2023;14:1200269.
23. Tattrie J. Légalisation du cannabis au Canada 2016 [Available from: <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/marijuana-legalization-in-canada>].
24. Haagen-Smit AJ, Wawra CZ, Koepfli JB, Alles GA, Feigen GA, Prater AN. A Physiologically Active Principle from Cannabis Sativa (Marihuana). *Science*. 1940;91(2373):602-3.
25. Work TS, Bergel F, Todd AR. The active principles of Cannabis indica resin. I. *Biochem J*. 1939;33(1):123-7.
26. Abelson PH. LSD and marihuana. *Science*. 1968;159(3820):1189.
27. Dohner VA. LSD and marihuana: where are the answers? *Science*. 1968;160(3832):1061-2.
28. Siegel RK. Effects of Cannabis sativa and lysergic acid diethylamide on a visual discrimination task in pigeons. *Psychopharmacologia*. 1969;15(1):1-8.
29. Baker EFW. The Use of Lysergic Acid Diethylamide (LSD) in Psychotherapy. *Canadian Medical Association Journal*. 1964.
30. Frederking W. Intoxicant drugs (mescaline and lysergic acid diethylamide) in psychotherapy. *J Nerv Ment Dis*. 1955;121(3):262-6.
31. Sandison RA, Whitelaw JD. Further studies in the therapeutic value of lysergic acid diethylamide in mental illness. *J Ment Sci*. 1957;103(431):332-43.
32. Eisner BG, Cohen S. Psychotherapy with lysergic acid diethylamide. *J Nerv Ment Dis*. 1958;127(6):528-39.
33. Cohen S, Eisner BG. Use of lysergic acid diethylamide in a psychotherapeutic setting. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1959;81(5):615-9.
34. unies OdN. Les Conventions internationales relatives au contrôle des drogues 2013. Available from: https://www.unodc.org/unodc/en/commissions/CND/Mandate_Functions/conventions.html.

35. Administration DE. Controlled Substances Act [Available from: <https://www.dea.gov/drug-information/csa>.
36. Administration DE. Drug Scheduling [Available from: <https://www.dea.gov/drug-information/drug-scheduling>.
37. Mithoefer MC, Wagner MT, Mithoefer AT, Jerome L, Doblin R. The safety and efficacy of +/-3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy in subjects with chronic, treatment-resistant posttraumatic stress disorder: the first randomized controlled pilot study. *J Psychopharmacol*. 2011;25(4):439-52.
38. Oehen P, Traber R, Widmer V, Schnyder U. A randomized, controlled pilot study of MDMA (+/- 3,4-Methylenedioxymethamphetamine)-assisted psychotherapy for treatment of resistant, chronic Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD). *J Psychopharmacol*. 2013;27(1):40-52.
39. Lodetti G, de Bitencourt RM, Rico EP. Classic psychedelics and the treatment for alcoholism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2024;135:111129.
40. Johnson MW, Garcia-Romeu A, Cosimano MP, Griffiths RR. Pilot study of the 5-HT_{2A}R agonist psilocybin in the treatment of tobacco addiction. *J Psychopharmacol*. 2014;28(11):983-92.
41. Yu CL, Yang FC, Yang SN, Tseng PT, Stubbs B, Yeh TC, et al. Psilocybin for End-of-Life Anxiety Symptoms: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Psychiatry Investig*. 2021;18(10):958-67.
42. Nutt DJ, King LA, Phillips LD, Independent Scientific Committee on D. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. *Lancet*. 2010;376(9752):1558-65.
43. Steele TD, McCann UD, Ricaurte GA. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"): pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. 1994;89(5):539-51.
44. Nichols DE. Psychedelics. *Pharmacol Rev*. 2016;68(2):264-355.
45. Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry Reviews*. 2008;7(3):615-39.
46. Isidore E, Karim H, Ioannou I. Extraction of Phenolic Compounds and Terpenes from Cannabis sativa L. By-Products: From Conventional to Intensified Processes. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(6).
47. Khanam S, Mishra P, Faruqui T, Alam P, Albalawi T, Siddiqui F, et al. Plant-based secondary metabolites as natural remedies: a comprehensive review on terpenes and their therapeutic applications. *Front Pharmacol*. 2025;16:1587215.
48. González-Hernández RA, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA. Factors that influence the extraction methods of terpenes from natural sources. *Chemical Papers*. 2024;78(5):2783-810.
49. Chen R, Liu W, Tian D, Wang S, Qiao J, Li W, et al. Bioactivities and biosynthesis of monoterpene-based biopesticides: current state and perspectives. *Microb Cell Fact*. 2026;25(1).
50. Booth JK, Bohlmann J. Terpenes in Cannabis sativa - From plant genome to humans. *Plant Sci*. 2019;284:67-72.
51. Hammed A, Yeasmen N, Orsat V, Parise A. Eco-Friendly Extraction and Characterization of Terpenoids From Plants as Functional Food Ingredients: A Review. *Journal of Food Biochemistry*. 2025;2025(1).

52. Katekar VP, Rao AB, Sardeshpande VR. A hydrodistillation-based essential oils extraction: A quest for the most effective and cleaner technology. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2023;36.
53. Mukhtar YM, Adu-Frimpong M, Xu X, Yu J. Biochemical significance of limonene and its metabolites: future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. *Biosci Rep*. 2018;38(6).
54. Salehi B, Upadhyay S, Erdogan Orhan I, Kumar Jugran A, S LDJ, D AD, et al. Therapeutic Potential of alpha- and beta-Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*. 2019;9(11).
55. Pereira I, Severino P, Santos AC, Silva AM, Souto EB. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;171:566-78.
56. Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahamed MB, Ezzat MO, Majid AS, et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene beta-Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*. 2015;20(7):11808-29.
57. Singh SK, Shrivastava S, Mishra AK, Kumar D, Pandey VK, Srivastava P, et al. Friedelin: Structure, Biosynthesis, Extraction, and Its Potential Health Impact. *Molecules*. 2023;28(23).
58. Msengwa Z, Rwegoshora F, David C, Mwesongo J, Mafuru M, Mabiki FP, et al. Epifriedelanol is the key compound to antibacterial effects of extracts of *Synadenium glaucescens* (Pax) against medically important bacteria. *Frontiers in Tropical Diseases*. 2023;3.
59. Galić L, Lončarić Z, Lisjak M. A Review of Phenolic Compounds: From Biosynthesis and Ecological Roles to Human Health and Nutrition. *Phyton*. 2025;94(11):3297-318.
60. Sova M, Saso L. Natural Sources, Pharmacokinetics, Biological Activities and Health Benefits of Hydroxycinnamic Acids and Their Metabolites. *Nutrients*. 2020;12(8).
61. Shahidi F, Yeo J. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
62. Mamari HHA. Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis: Intech; 2021.
63. Teh SS, Bekhit Ael D, Birch J. Antioxidative Polyphenols from Defatted Oilseed Cakes: Effect of Solvents. *Antioxidants (Basel)*. 2014;3(1):67-80.
64. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci*. 2021;4:200-14.
65. Boucher R, Germain H, Desgagne-Penix I. Exploring the Lesser-Known Bioactive Natural Products of Plant Species of the Genus *Cannabis* L.: Alkaloids, Phenolic Compounds, and Their Therapeutic Potential. *Plants (Basel)*. 2025;14(9).
66. Luo T, He Y, Jiang L, Yang L, Hou X, Shen G, et al. Flavor perception and biological activities of bitter compounds in food. *Food Chem*. 2025;477:143532.
67. Leclerc A, Fournier P. The role of alkaloids in natural products chemistry. *International Journal of Herbal Medicine*. 2024;12(5):07-10.
68. Letchuman S, Madhuranga HDT, Madhurangi BLNK, Premarathna AD, Saravanan M. Alkaloids unveiled: A comprehensive analysis of novel therapeutic

- properties, mechanisms, and plant-based innovations. *Intelligent Pharmacy*. 2025;3(4):268-76.
69. Bhambhani S, Kondhare KR, Giri AP. Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. *Molecules*. 2021;26(11).
 70. Liu L, Suo T. Review, challenges, and prospects of the process of alkaloid extraction from plants. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*. 2025;216.
 71. Ortiz JE, Adarvez-Feresin CW, Llalla-Cordova O, Cristos D, Garro A, Feresin GE. Novel Butyrylcholinesterase Inhibitor Alkaloids from *Cannabis sativa* Roots: Bioguided Isolation and In Silico Study. *Compounds*. 2025;5(3).
 72. Tahir MN, Raz FS, Rondeau-Gagne S, Trant JF. The biosynthesis of the cannabinoids. *J Cannabis Res*. 2021;3(1):7.
 73. Gulck T, Moller BL. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends Plant Sci*. 2020;25(10):985-1004.
 74. Valizadehderakhshan M, Shahbazi A, Kazem-Rostami M, Todd MS, Bhowmik A, Wang L. Extraction of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. (Hemp)—Review. *Agriculture*. 2021;11(5).
 75. Ataolahi S, Lu HT, Li W, Deseo MA, Stevens GW, Bacic A, et al. Leaching of cannabinoids from *Cannabis sativa* flowers using a pH-controlled aqueous solvent: Study of important parameters. *Separation and Purification Technology*. 2025;375.
 76. Blebea NM, Pricopie AI, Vlad RA, Hancu G. Phytocannabinoids: Exploring Pharmacological Profiles and Their Impact on Therapeutical Use. *Int J Mol Sci*. 2024;25(8).
 77. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol*. 2018;227:300-15.
 78. Gagne V, Merindol N, Boucher R, Boucher N, Desgagne-Penix I. Rooted in therapeutics: comprehensive analyses of *Cannabis sativa* root extracts reveals potent antioxidant, anti-inflammatory, and bactericidal properties. *Front Pharmacol*. 2024;15:1465136.
 79. Lopez-Herrador S, Corral-Sarasa J, Gonzalez-Garcia P, Morillas-Morota Y, Olivieri E, Jimenez-Sanchez L, et al. Natural Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acids Derivatives: Mechanisms of Action and Therapeutic Applications. *Antioxidants (Basel)*. 2025;14(6).
 80. Zeiss DR, Piater LA, Dubery IA. Hydroxycinnamate Amides: Intriguing Conjugates of Plant Protective Metabolites. *Trends Plant Sci*. 2021;26(2):184-95.
 81. Wei S, Wang Y, Zhou S, Luo S, Lin Y, Wang R, et al. Unveiling the components, physiological functions and emerging trends of hydroxycinnamic acid amides in goji berry (*Lycium*). *Food Res Int*. 2025;214:116696.
 82. Taofiq O, Gonzalez-Paramas AM, Barreiro MF, Ferreira IC. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules*. 2017;22(2).
 83. Martinez-Soto D, Hernandez-Rojas AJ, Valdes-Santiago L, Garcia-Ortega LF, Ramirez-Martinez A, Trujillo-Esquivel E, et al. Conservation of the Polyamines

- Pathway in Ustilaginomycetes A Genomic and Experimental Approach. *J Basic Microbiol.* 2025;65(5):e2400561.
84. Liu JH, Wang W, Wu H, Gong X, Moriguchi T. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Front Plant Sci.* 2015;6:827.
 85. Gil-Amado JA, Gomez-Jimenez MC. Regulation of polyamine metabolism and biosynthetic gene expression during olive mature-fruit abscission. *Planta.* 2012;235(6):1221-37.
 86. Kim NH, Kim BS, Hwang BK. Pepper arginine decarboxylase is required for polyamine and gamma-aminobutyric acid signaling in cell death and defense response. *Plant Physiol.* 2013;162(4):2067-83.
 87. Tisi A, Federico R, Moreno S, Lucretti S, Moschou PN, Roubelakis-Angelakis KA, et al. Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation. *Plant Physiol.* 2011;157(1):200-15.
 88. Munoz-Esparza NC, Latorre-Moratalla ML, Comas-Baste O, Toro-Funes N, Veciana-Nogues MT, Vidal-Carou MC. Polyamines in Food. *Front Nutr.* 2019;6:108.
 89. Back K, Jang SM, Lee BC, Schmidt A, Strack D, Kim KM. Cloning and characterization of a hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase induced in response to UV-C and wounding from *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol.* 2001;42(5):475-81.
 90. Hohlfeld H, Scheel D, Strack D. Purification of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell-suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. cv. *Datura*. *Planta.* 1996;199(1).
 91. Liu S, Jiang J, Ma Z, Xiao M, Yang L, Tian B, et al. The Role of Hydroxycinnamic Acid Amide Pathway in Plant Immunity. *Front Plant Sci.* 2022;13:922119.
 92. Balint-Kurti P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol Plant Pathol.* 2019;20(8):1163-78.
 93. Cabanne F, Dalebroux MA, Martin-Tanguy J, Martin C. Hydroxycinnamic acid amides and ripening to flower of *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* n.c. *Physiologia Plantarum.* 2006;53(4):399-404.
 94. Leonard W, Zhang P, Ying D, Fang Z. Lignanamides: sources, biosynthesis and potential health benefits - a minireview. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2021;61(8):1404-14.
 95. Roumani M, Besseau S, Hehn A, Larbat R. Functional characterization of a small gene family coding for putrescine hydroxycinnamoyltransferases, involved in phenolamide accumulation, in tomato. *Phytochemistry.* 2025;229:114271.
 96. Sun J, Tong LT, Tu PF, Chen LL, Xu X, Song Y, et al. Lignanamides: A comprehensive review of chemical constituents, biological activities, extraction methods and synthetic pathway. *Food Chem.* 2024;460(Pt 1):140459.
 97. Blagojevic BD, Brunel-Muguet S, Sucur R, Mladenov V, Balaz I, Vollmann J, et al. The role of spermidine in plants and humans: a pathway from climate change adaptation to health benefits. *NPJ Sci Food.* 2026;10(1):68.
 98. Turner CE, Hsu MH, Knapp JE, Schiff PL, Jr., Slatkin DJ. Isolation of cannabistatine, an alkaloid, from *Cannabis sativa* L. root. *J Pharm Sci.* 1976;65(7):1084-5.

99. Elsohly MA, Turner CE, Phoebe CH, Jr., Knapp JE, Schiff PL, Jr., Slatkin DJ. Anhydrocannabisativine, a new alkaloid from *Cannabis sativa* L. *J Pharm Sci.* 1978;67(1):124.
100. Menezes PMN, Pereira ECV, Lima KSB, Silva B, Brito MC, Araujo TCL, et al. Chemical Analysis by LC-MS of *Cannabis sativa* Root Samples from Northeast Brazil and Evaluation of Antitussive and Expectorant Activities. *Planta Med.* 2022;88(13):1223-32.
101. Araujo TCL, Menezes PMN, Ribeiro TF, Macedo CAF, Souza NAC, Lima KSB, et al. *Cannabis sativa* L. roots from Northeast Brazil reduce abdominal contortions in a mouse model of primary dysmenorrhea. *J Ethnopharmacol.* 2024;318(Pt A):116891.
102. Zhang X, Tian X, Wang Y, Yan Y, Wang Y, Su M, et al. Application of lipopolysaccharide in establishing inflammatory models. *Int J Biol Macromol.* 2024;279(Pt 4):135371.
103. Zhang Q, Chen X, Guo H, Trindade LM, Salentijn EMJ, Guo R, et al. Latitudinal Adaptation and Genetic Insights Into the Origins of *Cannabis sativa* L. *Front Plant Sci.* 2018;9:1876.
104. Halpin-McCormick A, Maaz TM, Kantar MB, Barton KE, Masalia RR, Batora N, et al. Species distribution of *Cannabis sativa*: Past, present and future. *PLoS One.* 2025;20(3):e0306007.
105. Hourfane S, Mechqoq H, Bekkali AY, Rocha JM, El Aouad N. A Comprehensive Review on *Cannabis sativa* Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants (Basel).* 2023;12(6).
106. Saragoça A, Silva AC, Varanda CMR, Materatski P, Ortega A, Cordeiro AI, et al. Current Context of *Cannabis sativa* Cultivation and Parameters Influencing Its Development. *Agriculture.* 2025;15(15).
107. Khan A, Kanwal F, Ullah S, Fahad M, Tariq L, Altaf MT, et al. Plant Secondary Metabolites-Central Regulators Against Abiotic and Biotic Stresses. *Metabolites.* 2025;15(4).
108. Radwan MM, Chandra S, Gul S, ElSohly MA. Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of *Cannabis*. *Molecules.* 2021;26(9).
109. Klein FK, Rapoport H, Elliott HW. *Cannabis* alkaloids. *Nature.* 1971;232(5308):258-9.
110. Pap N, Hamberg L, Pihlava JM, Hellstrom J, Mattila P, Euroala M, et al. Impact of enzymatic hydrolysis on the nutrients, phytochemicals and sensory properties of oil hemp seed cake (*Cannabis sativa* L. FINOLA variety). *Food Chem.* 2020;320:126530.
111. Gagne V, Boucher N, Desgagne-Penix I. *Cannabis* Roots: Therapeutic, Biotechnological and Environmental Aspects. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2024;9(1):35-48.
112. Whitney K, Gracia-Gomez G, Anderson JA, Simsek S. Time Course Metabolite Profiling of Fusarium Head Blight-Infected Hard Red Spring Wheat Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time of Flight/MS. *J Agric Food Chem.* 2022;70(13):4152-63.

113. Kim SB, Van den Broeck L, Karre S, Choi H, Christensen SA, Wang GF, et al. Analysis of the transcriptomic, metabolomic, and gene regulatory responses to *Puccinia sorghi* in maize. *Mol Plant Pathol*. 2021;22(4):465-79.
114. Chen J, Ullah C, Giddings Vassao D, Reichelt M, Gershenzon J, Hammerbacher A. *Sclerotinia sclerotiorum* Infection Triggers Changes in Primary and Secondary Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*. 2021;111(3):559-69.
115. Zhang L, Gu C, Liu J. Nature spermidine and spermine alkaloids: Occurrence and pharmacological effects. *Arabian Journal of Chemistry*. 2022;15(12).
116. Shi YJ, Zhang J, Wang YW, Ding K, Yan Y, Xia CY, et al. The untapped potential of spermidine alkaloids: Sources, structures, bioactivities and syntheses. *Eur J Med Chem*. 2022;240:114600.
117. Wang LN, Jiang HW, Li JL, Li JY. Enhancement of Glucose Utilization by Loesenerine through AMPK Activation in Myotubes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2018;66(9):885-6.
118. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i884-i90.
119. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.
120. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, et al. Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*. 2019;4(43).
121. Lawrence M, Gentleman R, Carey V. rtracklayer: an R package for interfacing with genome browsers. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1841-2.
122. Lawrence M, Huber W, Pages H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, et al. Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(8):e1003118.
123. George NI, Chang CW. DAFS: a data-adaptive flag method for RNA-sequencing data to differentiate genes with low and high expression. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:92.
124. Dos Santos KCG, Desgagne-Penix I, Germain H. Custom selected reference genes outperform pre-defined reference genes in transcriptomic analysis. *BMC Genomics*. 2020;21(1):35.
125. Li C, Deans NC, Buell CR. "Simple Tidy GeneCoEx": A gene co-expression analysis workflow powered by tidyverse and graph-based clustering in R. *Plant Genome*. 2023;16(2):e20323.
126. Bengtsson H. A Unifying Framework for Parallel and Distributed Processing in R using Futures. *The R Journal*. 2021;13(2).
127. Csárdi GN, Tamás; Müller, Kirill; Horvát, Szabolcs; Traag, Vincent; Zanini, Fabio; , Noom D. igraph for R: R interface of the igraph library for graph theory and network analysis. *bioRxiv*. 2024.
128. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc*. 2009;4(8):1184-91.
129. Durinck S, Moreau Y, Kasprzyk A, Davis S, De Moor B, Brazma A, et al. BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3439-40.

130. Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W200-W4.
131. Sreevidya N, Mehrotra S. Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff's Reagent in Plant Materials. *Journal of AOAC INTERNATIONAL.* 2003;86(6):1124-7.
132. University MS. Cannabis sativa RNA-Seq - Medicinal Plants Consortium 2011 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA80055>].
133. Toronto Uo. Cannabis sativa genome and transcriptome sequencing project 2018 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA73819>].
134. Braich S, Baillie RC, Jewell LS, Spangenberg GC, Cogan NOI. Generation of a Comprehensive Transcriptome Atlas and Transcriptome Dynamics in Medicinal Cannabis. *Sci Rep.* 2019;9(1):16583.
135. Shi J, Toscani M, Dowling CA, Schilling S, Melzer R. Identification of genes associated with sex expression and sex determination in hemp (*Cannabis sativa* L.). *J Exp Bot.* 2025;76(1):175-90.
136. science Caoa. Cannabis sativa Transcriptome or Gene expression 2024 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1173925>].
137. Department of Bio-Health Convergence KNU. Transcriptomic Responses of Cannabis sativa L. to Trichoderma hamatum Treated under Drought Conditions 2024 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=GSE266916>].
138. Majhi BB, Gélinas S-E, Méridol N, Desgagné-Penix I. Characterization of norbelladine synthase and noroxomaritidine/norcraftsodine reductase reveals a novel catalytic route for the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids including the Alzheimer's drug galanthamine. *bioRxiv.* 2022:2022.07.30.502154.
139. Singh A, Massicotte, M-A., Garand A, Tousignant L, Ouellette V, Bérubé G, et al. Cloning and characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis. *BMC Plant Biology.* 2018;18:338-50.
140. Lima KSB, Silva M, Araujo TCL, Silva C, Santos BL, Ribeiro LAA, et al. Cannabis roots: Pharmacological and toxicological studies in mice. *J Ethnopharmacol.* 2021;271:113868.
141. Cortese M, Gigliobianco MR, Magnoni F, Censi R, Di Martino PD. Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules.* 2020;25(13).
142. Gao Y, Guo L, Liu X, Chen N, Yang X, Zhang Q. Advances in the synthesis and applications of macrocyclic polyamines. *R Soc Open Sci.* 2024;11(6):231979.
143. Muller J, Puttich PM, Beuerle T. Variation of the Main Alkaloid Content in *Equisetum palustre* L. in the Light of Its Ontogeny. *Toxins (Basel).* 2020;12(11).
144. Cramer L, Ernst L, Lubienski M, Papke U, Schiebel HM, Jerz G, et al. Structural and quantitative analysis of *Equisetum* alkaloids. *Phytochemistry.* 2015;116:269-82.
145. Majhi BB, Gelinas SE, Merindol N, Ricard S, Desgagne-Penix I. Characterization of norbelladine synthase and noroxomaritidine/norcraftsodine reductase reveals a

- novel catalytic route for the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids including the Alzheimer's drug galanthamine. *Front Plant Sci.* 2023;14:1231809.
146. Meng Q, Kim SJ, Costa MA, Moinuddin SGA, Celoy RM, Smith CA, et al. Dirigent protein subfamily function and structure in terrestrial plant phenol metabolism. *Methods Enzymol.* 2023;683:101-50.
 147. Daniel B, Konrad B, Toplak M, Lahham M, Messenlehner J, Winkler A, et al. The family of berberine bridge enzyme-like enzymes: A treasure-trove of oxidative reactions. *Arch Biochem Biophys.* 2017;632:88-103.
 148. Sengupta D, Naik D, Reddy AR. Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: A structure-function update. *J Plant Physiol.* 2015;179:40-55.
 149. Unterlinner B, Lenz R, Kutchan TM. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *Plant J.* 1999;18(5):465-75.
 150. Xiang Y, Jiang X, Li J, Sun B, Liu Z, Li D, et al. Functional characterization of aldo-keto reductase genes from *Lycoris aurea* that participate in galantamine biosynthesis. *Plant Sci.* 2026;363:112869.
 151. Lamichhane B, Niraula A, Merindol N, Gélinas S-E, Lagüe P, Ricard S, et al. A Golgi-Localized N-Methyltransferase and Reversible Aldo-Keto Reductases Coordinate Dual Terminal Routes in Galanthamine Biosynthesis. *The Plant Journal.* 2026.
 152. Bautista JL, Yu S, Tian L. Flavonoids in *Cannabis sativa*: Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnology. *ACS Omega.* 2021;6(8):5119-23.
 153. Jiménez-González L, Álvarez-Corral M, Muñoz-Dorado M, Rodríguez-García I. Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews.* 2007;7(1):125-54.
 154. Rajput A, Butler KS, Springer DA, Chekan JR. Indolylamide Macrocyclization by a *Streptococcus pneumoniae* ThiF-like Enzyme Family Member. *Org Lett.* 2025;27(22):5765-70.
 155. Qureshi M, Mekkawes T, Cao Y, de Visser SP. Mechanism of the Oxidative Ring-Closure Reaction during Gliotoxin Biosynthesis by Cytochrome P450 GliF. *Int J Mol Sci.* 2024;25(16).
 156. Zhao W, Liu J, Chen Y. Advances in the biosynthesis of naturally occurring benzylisoquinoline alkaloids. *Front Plant Sci.* 2025;16:1548471.
 157. Hofer R, Boachon B, Renault H, Gavira C, Miesch L, Iglesias J, et al. Dual function of the cytochrome P450 CYP76 family from *Arabidopsis thaliana* in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides. *Plant Physiol.* 2014;166(3):1149-61.
 158. Collu G, Unver N, Peltenburg-Looman AM, van der Heijden R, Verpoorte R, Memelink J. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett.* 2001;508(2):215-20.
 159. Zhu W, Yang B, Komatsu S, Lu X, Li X, Tian J. Binary stress induces an increase in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Front Plant Sci.* 2015;6:582.

160. Camagna M, Ojika M, Takemoto D. Detoxification of the solanaceous phytoalexins rishitin, lubimin, oxylubimin and solavetivone via a cytochrome P450 oxygenase. *Plant Signal Behav.* 2020;15(2):1707348.
161. Roth S, Kilgore MB, Kutchan TM, Muller M. Exploiting the Catalytic Diversity of Short-Chain Dehydrogenases/Reductases: Versatile Enzymes from Plants with Extended Imine Substrate Scope. *Chembiochem.* 2018;19(17):1849-52.
162. Chen X, Facchini PJ. Short-chain dehydrogenase/reductase catalyzing the final step of noscapine biosynthesis is localized to laticifers in opium poppy. *Plant J.* 2014;77(2):173-84.
163. Agarwal P, Pathak S, Kumar RS, Dhar YV, Shukla S, Asif MH, et al. Short-chain dehydrogenase/reductase, PsDeHase, from opium poppy: putative involvement in papaverine biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).* 2020;143(2):431-40.
164. Stavrinides AK, Tatsis EC, Dang TT, Caputi L, Stevenson CEM, Lawson DM, et al. Discovery of a Short-Chain Dehydrogenase from *Catharanthus roseus* that Produces a New Monoterpene Indole Alkaloid. *Chembiochem.* 2018;19(9):940-8.
165. Xu C, Ye P, Wu Q, Liang S, Wei W, Yang J, et al. Identification and functional characterization of three iridoid synthases in *Gardenia jasminoides*. *Planta.* 2022;255(3):58.
166. Da Porto C, Decorti D, Tubaro F. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products.* 2012;36(1):401-4.
167. Yildiz I. "Stepwise or concerted or a hybrid mechanism for berberine bridge enzyme?": A computational mechanistic study by QM-MM and QM methods. *Journal of Molecular Structure.* 2024;1300.
168. Li Z, Cheng B, Zhao Y, Luo L, Zhang Y, Feng G, et al. Metabolic Regulation and Lipidomic Remodeling in Relation to Spermidine-induced Stress Tolerance to High Temperature in Plants. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20).
169. Macoy DM, Kim W-Y, Lee SY, Kim MG. Biosynthesis, physiology, and functions of hydroxycinnamic acid amides in plants. *Plant Biotechnology Reports.* 2015;9(5):269-78.
170. Lee JM, Lee H, Kang S, Park WJ. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients.* 2016;8(1).
171. Gonzalez-Hernandez AI, Scalschi L, Vicedo B, Marcos-Barbero EL, Morcuende R, Camanes G. Putrescine: A Key Metabolite Involved in Plant Development, Tolerance and Resistance Responses to Stress. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6).
172. Deng X, Luo Y, Gao Y, Wu T. Long-chain acyl-CoA synthetases: biological functions, diseases and therapeutic targets. *Mol Biomed.* 2025;6(1):117.
173. Manisha M, Babu R, Begam AM, Shakya Chahal K, Ashok Harale A. Medicinal Plants and Traditional Uses and Modern Applications. *Journal of Neonatal Surgery.* 2025;14(3):162-75.
174. Jin HL, Yu GR, Jung H, Lee MS, Kim H, Lim DW, et al. Immunomodulatory effect of *Cannabis* root extract on inflammatory cascades via endocannabinoid system regulation. *BMC Complement Med Ther.* 2026;26(1).
175. Verdoliva SG, Gwyn-Jones D, Detheridge A, Robson P. Controlled comparisons between soil and hydroponic systems reveal increased water use efficiency and

- higher lycopene and beta-carotene contents in hydroponically grown tomatoes. *Sci Hortic*. 2021;279:109896.
176. Badawi MM, Bernauer K, van den Broek P, Groger D, Guggisberg A, John S, et al. Macrocyclic spermidine and spermine alkaloids. *Pure Appl Chem*. 1973;33(1):81-107.
 177. Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*. 2000;108(1-2):1-13.
 178. Shao Q, Wang X, Wang X, Yang S, Cao J, Zhao N, et al. Identification and Expression Analysis of the *Betv1* Gene Family in Industrial Hemp. *Tropical Plant Biology*. 2026;19(1).
 179. Li S, Zheng H, Sui N, Zhang F. Class III peroxidase: An essential enzyme for enhancing plant physiological and developmental process by maintaining the ROS level: A review. *Int J Biol Macromol*. 2024;283(Pt 3):137331.
 180. Benkirane C, El Ati R, Abid M, Nkengurutse J, Serghini-Caid H, Elamrani A, et al. Comprehensive review on cannabis seed phenolic compounds from extraction to functional applications. *J Cannabis Res*. 2026;8(1).
 181. Mosblech A, Feussner I, Heilmann I. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem*. 2009;47(6):511-7.
 182. Hewedy OA, Elsheery NI, Karkour AM, Elhamouly N, Arafa RA, Mahmoud GA-E, et al. Jasmonic acid regulates plant development and orchestrates stress response during tough times. *Environmental and Experimental Botany*. 2023;208.
 183. Barbosa RAA, Lyrio ES, Gouvea-Silva JG, Costa-Oliveira CD, Viana-Oliveira LD, Mazzola PG, et al. Industrial Cannabis, Cannabic Residue or Industrial Cannabis Waste? Perspectives on the Utilization, Reutilization, and Recycling of Cannabis. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2026;11(3):216-31.
 184. Raza N, Jev Y. An update on primary dysmenorrhoea: what's new? *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2026;36(4):115-8.
 185. SQDC. [Available from: <https://www.sqdc.ca/fr-CA/a-propos/la-sqdc>].

5 Annexe



► [Plants \(Basel\)](#). 2025 Apr 30;14(9):1372. doi: [10.3390/plants14091372](https://doi.org/10.3390/plants14091372) [↗](#)

Exploring the Lesser-Known Bioactive Natural Products of Plant Species of the Genus *Cannabis* L.: Alkaloids, Phenolic Compounds, and Their Therapeutic Potential

[Raphaël Boucher](#)¹, [Hugo Germain](#)¹, [Isabel Desgagné-Penix](#)^{1,*}

Editors: Katarina Šavikin¹, Dušanka Kitić¹, Milica Randjelović¹

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#)

PMCID: PMC12073235 PMID: [40364401](#)