

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale EGAAL

présentée par

Omid Feizbakhsh

Préparée à l'Unité de Service et de Recherche USR3151
« Phosphorylation des Protéines et Pathologies Humaines »
Station Biologique de Roscoff (CNRS/UPMC)

**La protéine kinase
Haspine comme
nouvelle cible
thérapeutique :
analyse de ses
fonctions et
caractérisation
d'inhibiteurs
spécifiques**

**Thèse soutenue à Roscoff le 19
décembre 2017**

Devant le jury composé de :

Daniel Fisher

Directeur de recherche CNRS, *rapporteur*

Hélène Benedetti

Directrice de recherche CNRS, *rapporteur*

Marc Blondel

Professeur Université de Bretagne Occidentale,
examineur

Claude Prigent

Directeur de recherche CNRS, *examineur*

Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL

Directrice de recherche, INSERM, *examineur*

Sandrine Ruchaud

Chargée de recherche CNRS/UPMC, *directrice de
thèse*

A la mémoire de mon très cher père qui nous a quittés il y a 5 ans et qui est cependant toujours présent à mes côtés.

A ma femme, à laquelle je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes remerciements, elle qui n'a jamais cessé de me soutenir pour que je puisse finir mes études et réaliser mes rêves. Je voudrais lui dire mon amour et ma gratitude.

A ma chère Maman. Qu'elle sache que malgré les kilomètres qui nous séparent, l'amour est un lien qui ne connaît ni distance ni frontière et que ses bénédictions m'accompagnent à chaque instant.

A ma chère sœur Neda et à mon frère Amir qui m'est si proche.

A Ma belle-maman, qui nous a toujours soutenus au quotidien et qui n'a cessé de m'apporter son aide précieuse notamment dans les corrections en français. Qu'elle soit remerciée pour son implication et sa générosité.

A notre fille Leily qui a décidé de venir au monde à la fin de ma thèse ! Merci pour ce cadeau du ciel, ce bonheur et cette joie.

Remerciements

Je remercie chaleureusement le Dr. Sandrine Ruchaud, Directrice de l'unité USR3151, de m'avoir accepté en tant que doctorant en 2013 au sein de la Station Biologique de Roscoff. Je voudrais lui exprimer ma gratitude pour m'avoir guidé pendant ces 4 années de recherche et m'avoir appris à devenir autonome et lui dire également ma reconnaissance pour avoir obtenu un financement pour une année supplémentaire de thèse qui m'a permis de finaliser mes recherches. Je la remercie également de m'avoir donné l'opportunité de participer au congrès international d'Irlande et d'avoir rencontré de nombreux chercheurs.

Je remercie la Région Bretagne ainsi que la Ligue Contre le Cancer qui ont financé mes recherches pendant ces 3 années.

J'adresse mes remerciements au Dr. Xavier Le Goff qui m'a été d'un soutien précieux pour trouver des contacts avec différents laboratoires et qui, avec le Dr Ruchaud, a œuvré pour l'obtention d'une bourse de thèse.

Je remercie également Mr. Xavier Fant, l'expert qui m'a formé aux différentes techniques de biologie cellulaire et de microscopie.

Je voudrais exprimer ma chaleureuse reconnaissance à tous les membres de l'unité USR3151, qui ont toujours été très accueillants et m'ont soutenu pendant ces années, et en particulier au Dr. Stéphane Bach, toujours enthousiaste et plein d'énergie, au Dr. Pierre Colas toujours prêt à participer à des discussions et me prodiguer des conseils et Dr. Luc Reininger pour les discussions et conseils scientifiques et comme mon guide d'ornithologie. Un grand merci également au Dr. Blandine Baratte pour ses conseils et son aide pour la rédaction de ma thèse ainsi qu'à Nathalie Desban pour les nombreuses expériences que nous avons faites ensemble avec beaucoup de bonne humeur.

Un merci chaleureux à Thomas Robert, mon voisin de bureau, pour nos sympathiques discussions et nos échanges scientifiques fructueux. Un merci également à Béatrice Josselin, Amandine Bescond, Claire Delehouzé et Mohamed Souab pour leurs conseils techniques et nos échanges scientifiques.

Je remercie Sophie PARIS-LABROUSSE pour son soutien dans mes nombreuses démarches administratives.

Je remercie également le Dr. Julien Duez pour son aide précieuse pour la rédaction de ma thèse.

Je voudrais également remercier deux doctorantes de notre unité : Dung Nguyen Thi Ngoc et Sofia-Elena Motuhi qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse.

Je voudrais dire ma reconnaissance à l'association des jeunes chercheurs de la Station Biologique qui m'a accordé une bourse de participation au congrès international d'Irlande et m'a ainsi permis de bénéficier de cette opportunité.

Je voudrais remercier les membres du jury de mon comité de thèse : le Dr. Claude Prigent, le Dr. Régis Giet et le Dr. Roland Le Borgne, pour tous les conseils qu'ils m'ont apportés pour mieux orienter mes recherches.

Je souhaiterais maintenant adresser mes remerciements les plus sincères et respectueux au Docteur Hélène Benedetti, directrice de recherche au sein de l'unité Signalisation cellulaire et neurofibromatose du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) d'Orléans, ainsi qu'au Docteur Daniel Fisher, directeur de recherche dans l'unité Contrôle Nucléaire de la Prolifération Cellulaire de l'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse de doctorat. De même, je souhaiterais adresser mes plus humbles remerciements au docteur Claude Prigent, directeur de l'unité cycle cellulaire de l'Institut de Génétique & Développement de Rennes1, ainsi qu'au Professeur Marc Blondel de l'unité Génétique, génomique fonctionnelle et biotechnologie de université de Bretagne Occidentale de Brest, ainsi que Docteur Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL, directrice de recherche au sein de l'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET) de l'Université de Rennes pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	4
Abréviations.....	6
Table des Figures.....	9
Avant-propos	10
Préambule	11
Introduction.....	12
I. Le cycle cellulaire est un processus de division complexe aboutissant à la génération de cellules filles	12
1. La division cellulaire s'articule sur plusieurs phases formant un cycle	12
2. La mitose est un processus dynamique finement régulé.....	14
A. Les différentes phases de la mitose	14
B. Rôle du fuseau mitotique et des centrosomes	16
a. Les éléments essentiels des fuseaux mitotiques	16
b. Centrosome et Mitose	18
c. Machinerie du fuseau mitotique	20
C. Alignement et ségrégation des chromosomes	21
a. Cohésion des chromatides	21
b. Condensation des chromosomes.....	23
c. Le kinétochore	24
II. Les protéines kinases sont des acteurs clé du cycle cellulaire chez les eucaryotes.....	28
1. Régulation du cycle cellulaire	28
2. Régulation de la mitose	28
3. Les protéines kinase.....	28
A. La régulation de la fonction ePK	30
B. Structure des protéines kinases	32
C. Les kinases mitotiques	35
a. Famille CDK.....	35
b. Famille PLk	36
c. Famille de Neks	38
d. La famille Aurora.....	42
III. La protéine kinase Haspine et ses inhibiteurs,	47
IV. L'Haspine représente une nouvelle cible thérapeutique en santé humaine. 60	

1. La cellule cancéreuse: définition scientifique (non clinique)	60
2. Le processus de cancérisation est complexe	62
3. Tout commence avec des mutations	63
4. Des mutations génèrent un dysfonctionnement du cycle cellulaire, cause et/ou conséquence de l'instabilité	63
5. Le kinome fait l'objet d'importantes études pharmaceutiques	66
6. Des inhibiteurs de kinase anti-cancéreux sont en cours de développement	66
7. Les protéines kinase : cible principale de la chimiothérapie ciblée.....	68
8. Les inhibiteurs de kinases validés ou en cours de développement	70
9. Haspine est une kinase prometteuse dans le champ de la chimiothérapie anti-cancéreuse	70
Résultats.....	72
I. Article 1:.....	72
I. Article 2:.....	108
Discussion et perspectives	127
Références bibliographiques	140

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APC/C : *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*

aPKs : *atypiques Proteines Kinases*

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BUB : *Budding Uninhibited by Benzimidazoles*

Cdc25 : Cell division cycle 25

CDK : Cycline-Dependant Kinase

CIN : *Chromosome instability*

CPC : *Chromosomal Passenger Complex*

Eg5 : *Endoglucanase 5*

ePK : *eukaryotic Protein Kinase*

MCF-7: Michigan Cancer Foundation - 7

FDA : *Food and Drug Administration*

G1 : Gap1

G2 : Gap2

GAP : Mgc-Rac-GAP

GCP : *Gamma-tubulin Complex Protein*

GFAP: *Gilial Fibrillary Acidic Protein*

hTERT : human Telomerase Reverse Transcriptase

INCENP : *Inner Centromere Protein*

KISSf : *Kinase Inhibitor Specialized Screening facility*

KMN : *KNL-1/Mis12 complex/Ndc80 complex*

Kn11 : Kinetochore null protein 1

LOH : *Loss of Heterozygosity*

Mad 2 : Mitotic arrest-deficient 2
 MCAK : *Mitotic-Centromere-Associated Kinesin; microtubule depolymerase*
 Mcd1 : Sister chromatid cohesion protein 1
 mDia3 : Mammalian diaphanous-related formins 3
 Mis12 : Minichromosome Stability 12
 MKLP1 : Mitotic Kinesin-like Protein 1
 MPC : Matériel Péri-Centriolaire
 Mps1 : Mitotic kinase monopolar spindle 1
 MT : Microtubule
 MTOC : *MicroTubules-Organizing Center*
 MVA : *Mosaic variegated aneuploidy*
 Myc : *Myelocytomatosis*
 Myt1 : Membrane associated tyrosine and threonine specific

 NDC80 : *Nuclear Division Cycle 80*
 NEBD : *Nuclear Enveloppe BreakDown*
 NEDD1 : *Neural precursor cell Expressed, Developmentally Downregulation-1*
 Nek : NIMA-related protein kinase
 NLS : Nuclear Localization Signal

 PCNT : Péricentrine
 PDB : *polo-box domain*
 PHDK : *Pyruvate dehydrogenase kinase*
 PIKK : *Phosphatidy inositol 3' kinase related kinase*
 PLK : Polo-Like kinase
 pRB : protéine du rétinoblastome

 Rad21 : DNA Repair protein 21
 RCC1 : Regulator of Chromosome Condensation 1
 RIO : *Right open reading frame*

 SAC : *Spindle Assembly Checkpoint*
 Scc1 : *Sister chromatid cohesion protein 1*
 Ser : Sérine
 Sgo : Shogoshine

SMC : *Structural maintenance of chromosomes*

Smc1 : *Structural maintenance of chromosomes 1*

Smc3 : *Structural maintenance of chromosomes 3*

Thr : Thréonine

TP53 : Tumor Protein p53

TSP-1 : Thrombo Spondine-1

VEGF-A : facteur de croissance endothéliale vasculaire A

γ TuRC: *γ -Tubulin ring complex*

Table des Figures

Figure 1 : Le cycle cellulaire	Page 13
Figure 2 : La mitose	Page 13
Figure 3. Les fuseaux Mitotiques	Page 17
Figure 4. Le matériel péricentriolaire (PCM)	Page 19
Figure 5. Le complexe cohésine	Page 22
Figure 6. La structure des kinétochores	Page 25
Figure 7. Étapes d'attachement kinétochore-microtubule sur le fuseau mitotique	Page 27
Figure 8. Principe du point de contrôle du fuseau (SAC)	Page 27
Figure 9. Réaction biochimique catalysée par une protéine kinase (PK)	Page 29
Figure 10. Motifs conservés des protéines kinases	Page 33
Figure 11. Fonction de Plk1 en début de mitose	Page 39
Figure 12. Régulation de Nek9 pendant la mitose	Page 41
Figure 13. Localisation du CPC au centromère	Page 45
Figure 14. Modèle d'établissement d'un attachement stable entre kinétochore et microtubule	Page 45
Figure 15. Chemins vers l'aneuploïdie	Page 65
Figure 16. Etat du développement thérapeutique des kinases	Page 67
Figure 17. Les petites molécules Inhibitrices de kinases approuvés par la FDA	Page 69
Figure 18, Interaction de la protéine kinase Haspine avec le complexe cohésine	Page 129
Figure 19. Nucléation des microtubules pendant la mitose	Page 131
Figure 20. Nucléation des microtubules à partir de la chromatine	Page 133
Figure 21. Présence de Nek9 au centromère	Page 136
Figure 22. Régulation Négatif de nucléation des microtubules par Haspine	Page 139

Avant-propos

Les protéines kinases, par modification post traductionnelle, régulent finement les mécanismes essentiels de la cellule tels que la division. Au cours de ces dernières années, les inhibiteurs des protéines kinases sont devenus un sujet d'étude de premier plan pour le traitement de différentes maladies, et principalement du cancer. Leur efficacité liée à leur faible toxicité présente de grands avantages par rapport à d'autres traitements. Pourtant, leur développement est resté limité en raison du peu de connaissances fondamentales que nous possédons sur les fonctions biologiques d'une grande partie des kinases existantes, limitant leur étude en tant que cibles thérapeutiques.

L'unité Phosphorylation de Protéines et Pathologies Humaines (CNRS/UPMC USR 3151) au sein de la Station Biologique de Roscoff est organisée autour de deux entités: la première est dédiée à la recherche fondamentale sur les protéines kinases sélectionnées pour leur importance dans différents domaines thérapeutiques - essentiellement le cancer- et la deuxième est une plateforme de criblage pharmacologique appelée KISSf (*Kinase Inhibitor Specialized Screening facility*). Cette plateforme a pour but d'identifier des molécules inhibitrices de diverses protéines kinases, qu'elles soient d'origine naturelle ou synthétique. A ce jour, les tests effectués sur 14 kinases sélectionnées se sont principalement intéressés au traitement du cancer et à la mort cellulaire programmée. Parmi les succès de cette unité on peut rappeler la découverte de la Roscovitine, une molécule identifiée par la plateforme ciblant potentiellement certains cancers, et qui est actuellement en phase d'essai clinique. On peut citer aussi la découverte plus récente de la Sibiriline, un composé inhibiteur de la mort cellulaire par nécrose.

L'Haspine est une protéine kinase mitotique pour laquelle il a été démontré qu'elle joue un rôle dans l'alignement des chromosomes, la cohésion centromérique et l'intégrité centrosomique pendant la mitose. Elle été choisie pour être étudiée au sein du laboratoire en raison de son rôle essentiel dans la mitose et son potentiel thérapeutique en tant qu'anti-mitotique. Elle fait maintenant partie du panel des kinases cibles de la plateforme de criblage.

Préambule

Initialement, la cellule était considérée comme un univers invisible inconnu ou comme « une petite chambre » selon les termes de Robert Hooke en 1665. C'est au 19^e siècle qu'elle est reconnue par Théodor Schwann et Matthias Schleiden, comme l'unité de base de tout organisme vivant. Il y a plus de 150 ans, la division cellulaire est découverte par Rudolf Virchow, auteur du célèbre axiome « *Omni cellula e cellula* » (toute cellule provient d'une cellule). Cette division est le processus fondamental par lequel une cellule se divise en deux, donnant deux cellules filles identiques, clé de la reproduction des êtres vivants unicellulaires ou du développement embryonnaire et également phénomène vital durant toute la vie de l'organisme adulte. Ainsi, en raison de son importance fondamentale pour le vivant et aussi parce qu'elle est la cause ou la source de différentes maladies du développement ainsi que du cancer, la division cellulaire est devenue le sujet de nombreuses recherches.

Actuellement, grâce à des outils et modèles biologiques tels que des modèles invertébrés ou cellules de mammifères en culture, nous avons de plus en plus de connaissances sur la régulation intracellulaire de la division et de la vie d'une cellule. Néanmoins, il reste encore beaucoup de choses à découvrir dans cet univers infini.

Les mécanismes sous-jacents à une division cellulaire sont extrêmement complexes et sont régulés de façon très précise et sophistiquée par un grand nombre d'acteurs, essentiellement protéiques. Ces mécanismes sont bien conservés au cours de l'évolution.

Introduction

I. Le cycle cellulaire est un processus de division complexe aboutissant à la génération de cellules filles

1. La division cellulaire s'articule sur plusieurs phases formant un cycle

Le cycle cellulaire est le cycle de vie d'une cellule (Figure 1). Dans les cellules eucaryotes, il se structure autour de deux événements majeurs : 1/l'interphase et 2/la phase M qui comprend la mitose et la cytotélerèse.

Au cours de l'interphase -d'une durée de $\approx 5-20$ heures, la cellule se prépare pour la division cellulaire. L'interphase peut être fractionnée en trois (sous)phases : G1 (gap1), S (phase de synthèse) et G2 (Gap 2).

- En G1, la cellule va grossir pour acquérir une taille et un poids seuils. Le moment où ces caractéristiques seuils sont atteintes est appelé point R (Restriction)(Pardee, 1986). Le point de restriction R est un point de décision. Il implique l'intégration de différents signaux environnementaux et physiologiques par la cellule qui en retour s'engagera sur la poursuite du cycle ou sur un processus de quiescence (G0) ou d'apoptose (Blagosklonny, 1999; Boonstra, 2003). Une fois le point R franchi, le programme d'entrée dans le cycle cellulaire est déclenché et les facteurs exogènes ne jouent plus alors sur la décision de la cellule (décision irréversible) (Pardee, 1974, 1986).
- La phase S (6-20 heures) est la phase de réplication à l'identique de l'ADN. La duplication des centrosomes -centre d'organisation des microtubules cytosquelettiques- est également effectuée.

La phase G2 (4-5 heures) commence après la duplication de l'ADN. Du fait de la duplication, la cellule contenant une double quantité d'ADN est devenue temporairement *tétraploïde*. La cellule se prépare alors pour l'entrée en mitose. Pour cela, la masse cellulaire va augmenter, la transcription des ARN va s'opérer et les protéines nécessaires à la division cellulaire vont s'exprimer. A la fin de cette phase, les centrosomes commencent à migrer vers les deux pôles opposés de la cellule afin de se positionner correctement pour la mitose.

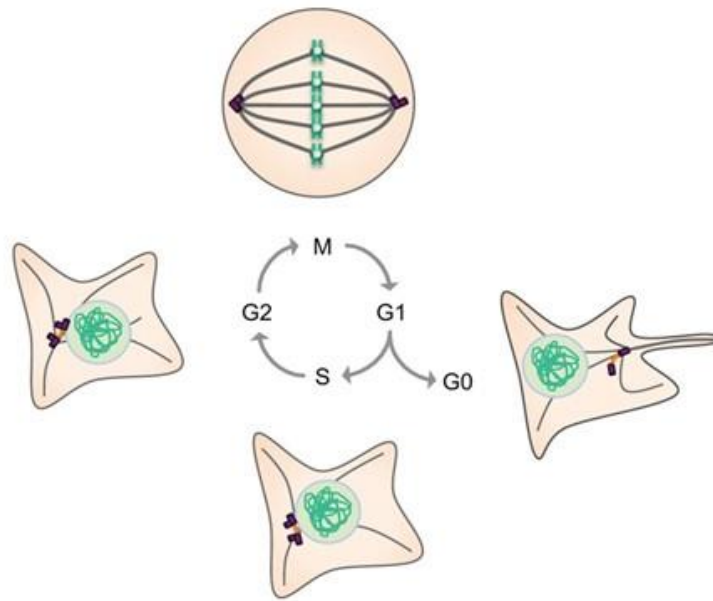


Figure 1 : Le cycle cellulaire. Le schéma représente le cycle de vie d'une cellule, partagé en deux grandes parties : interphase et M phase ; l'interphase elle-même comprend trois phases G1, S, et G2 permettant la préparation de la cellule pour la division en M Phase. (Schéma : Fry et al. 2012).

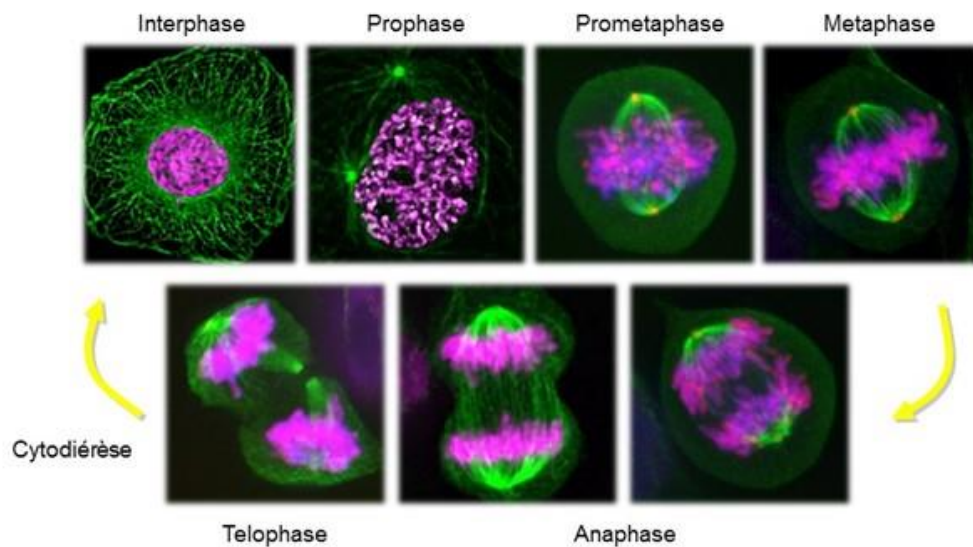


Figure 2 : La mitose. Les images prises par microscopie à fluorescence montrent les cellules U-2 OS exprimant Histone H2B-mrpf pendant les différentes étapes de la mitose ainsi que pendant l'interphase. Les cellules ont été immuno-marquées par un anti alpha-tubuline et l'ADN a été marqué par le DAPI en bleu.

La phase M commence par la mitose, qui est une procédure pendant laquelle les chromosomes contenus dans les noyaux sont séparés de façon identique puis répartis dans deux noyaux

La mitose est suivie par la cytotéière et l'abscission. C'est l'événement le moins connu de la mitose: les deux cellules filles doivent se séparer. Pour ce faire, il faut que le milieu du corps se sise. Ainsi, l'une des cellules héritera d'un corps en flexion (le reste du milieu du corps). Mais, plus important encore, la cellule doit assurer une cohésion au niveau des membranes plasmiques pour éviter les fuites de contenu cellulaire. Ceci est réalisé en recrutant des vésicules membranaires à partir du Golgi préalablement dissous. Ces vésicules transportent également les protéines nécessaires à la cytotéière. La toute dernière étape de la cytotéière, appelée abscission, est la séparation physique des deux cellules filles (Rannou et al., 2012).

Toutes ces phases (G1, S, G2, M) s'enchaînent de façon bien synchronisée et coordonnée. Pour passer d'une phase à l'autre, il existe des systèmes/points de contrôle-qualité (*checkpoint*). En cas d'anomalie(s), l'évolution cellulaire est stoppée et une réparation s'opère. Si réussie, cette réparation est suivie par une reprise. Dans le cas contraire, la cellule s'engagera vers une mort cellulaire programmée (Pommier and Kohn, 2003; Stewart et al., 2003).

2. La mitose est un processus dynamique finement régulé

L'importante phase de mitose est l'un des événements les plus spectaculaires du cycle cellulaire (Figure 2).

Sa durée est en moyenne d'1 heure pour les cellules de mammifères. Cet événement se déroule en 5 étapes permettant de répartir le matériel génétique cellulaire de façon identique entre les deux cellules filles (Robbins and Gonatas, 1964). La mitose s'exécute en cinq étapes : prophase, proméphase, métaphase, anaphase et télophase (Figure 2).

A. Les différentes phases de la mitose

En prophase, la chromatine se condense sous forme de chromosomes. L'enveloppe nucléaire se déstabilise. Les centrosomes migrent aux deux pôles des cellules. Les

fuseaux mitotiques commencent leur nucléation autour des centrosomes et leur polymérisation dans les différentes directions. L'enveloppe nucléaire commence à se dissoudre.

En proméphase l'enveloppe nucléaire disparaît totalement (NEBD : *Nuclear Enveloppe Breakdown*). Les chromosomes sont alors libérés dans le cytoplasme. Les kinétochores ont fini de s'assembler dans la région centromérique des chromosomes. A partir des centrosomes se dégagent des faisceaux de microtubules kinétochoriens qui s'élancent en direction du centre cellulaire. Ces derniers forment des points d'attache aux kinétochores. L'alignement des chromosomes s'initie. D'autres faisceaux, dits polaires, s'établissent à partir des centrosomes dans l'optique d'établir un point d'assise pour la génération des forces mécaniques qui seront nécessaire à la répartition des chromatides sœurs sur deux futures cellules.

En métaphase, tous les chromosomes sont parfaitement alignés sur la plaque métaphasique sous l'action mécanique des microtubules. Les chromatides sœurs - constituants chaque chromosome - sont tirés par les microtubules en direction opposée ; une tension se crée au niveau du centromère.

En Anaphase, les centromères se rompent, les chromatides sœurs sont séparés sous l'action mécanique des microtubules kinétochoriens.

En télophase, deux noyaux filles viennent se reformer. L'enveloppe nucléaire se recompose ; les chromosomes se décondensent et les deux cellules filles se séparent par cytotélorèse.

B. Rôle du fuseau mitotique et des centrosomes

a. Les éléments essentiels des fuseaux mitotiques

i. Les microtubules

Les microtubules sont assemblés à partir de dimères d'alpha et beta tubuline, un processus initié à partir du complexe gamma-tubuline en anneau (gamma-TuRC). (Figure 3.A).

Le gamma-TuRC est un complexe protéique contenant au moins six autres protéines que la gamma-tubuline : (GCP2), GCP3, GCP4, GCP5, GCP6 et NEDD1/GCP-WD (Kollman et al., 2011) (Figure 3.B). Il sert également de recouvrement pour l'extrémité "négative" du microtubule, tandis que les dimères de tubuline sont généralement ajoutés à l'extrémité "positive" du microtubule. Les microtubules se polymérisent et se dépolymérisent continuellement, subissant des cycles rapides de croissance et de rétrécissement avant d'être finalement démontées (Mitchison and Kirschner, 1984). Ce processus, appelé instabilité dynamique, est important pour le remodelage rapide du cytosquelette en interphase lorsque les cellules entrent dans la mitose et pour l'assemblage des fuseaux.

ii. Les centrosomes

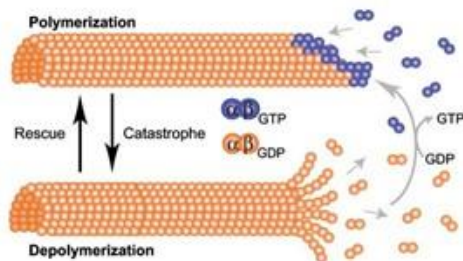
Les centrosomes ont été découverts pour la première fois en 1888 par Theodor Boveri (Maderspacher, 2008). Ils représentent des centres d'organisation pour les microtubules de cytosquelettes pendant l'interphase et des fuseaux mitotiques pendant la division cellulaire (Bornens and Azimzadeh, 2007).

La base de la structure du centrosome se représente sous forme d'une paire de centrioles positionnés de façon orthogonale. Cette paire de centrioles est entourée par un nuage dense de protéines appelé matériel péricentriolaire (MPC). Après duplication des centrosomes en phase S, ceux-ci restent attachés par des filaments protéiques composés principalement de deux protéines : Rootletin et C-Nap (Panic et al., 2015).

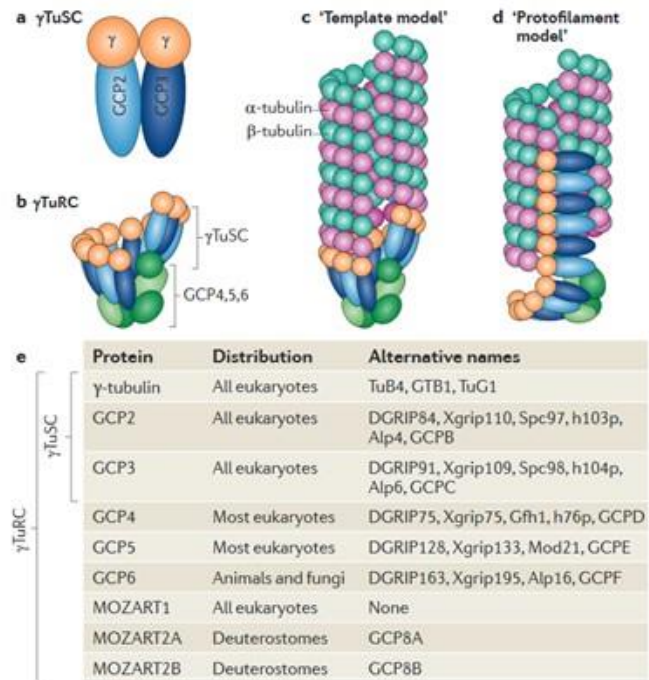
iii. Les centrioles

Les centrioles sont des structures de forme cylindrique composées de 9 triplets de microtubules. Bien qu'ils ne soient pas indispensables à la formation des fuseaux

A



B



C

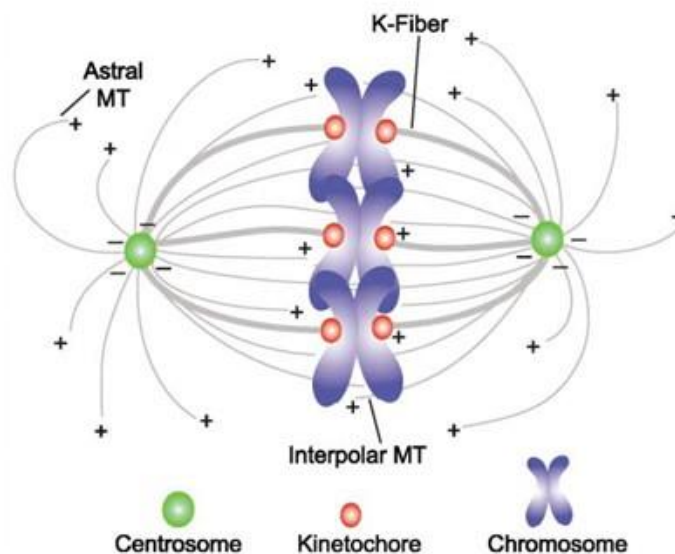


Figure 3. Les fuseaux mitotiques. A) Structure et dynamique des microtubules : Les MT passent d'un stade de polymérisation à l'autre et d'un stade de dépolymérisation à l'autre. Comportement central de l'instabilité dynamique. (Kline-Smith and Walczak, 2004), **B) le γ TuRC: noyau essentiel de la machine de nucléation des microtubules,** le schéma représente les différents composants du γ TuRC et illustre la nucléation des microtubules (Kollman, 2011) **C) Composants du fuseau mitotique :** le schéma montre les composants de base des fuseaux mitotiques dans les cellules (Kline-Smith and Walczak, 2004)

mitotiques, ils sont importants pour le comportement des centrosomes (La Terra et al., 2005), la formation de cils (Avidor-Reiss and Gopalakrishnan, 2013) et de microtubule des cytosquelettes, la préservation de la polarité cellulaire (Feldman et al., 2007) ainsi que pour la cytodierèse (Salisbury et al., 2002).

iv. Le matériel péri-centriolaire (MPC)

Le MPC est un nuage des différentes protéines autour des centrioles nécessaires pour la nucléation et l'ancrage des microtubules (Figure 4.A.). Ces éléments protéiques regroupent notamment la gamma-tubuline, le *gamma tubuline complex protein* (GCPs) (Delgehyr et al., 2005), et la péricentrine (PCNT ou Kendrin) (Zimmerman et al., 2004). Le recrutement des protéines au MPC fait intervenir avant la mitose différentes protéines régulatrices de la mitose comme PLK1, Nek9, Aurora A. Cet événement permettant la préparation du centrosome pour la mitose s'appelle maturation du centrosome (Blagden and Glover, 2003).

b. Centrosome et Mitose

i. Séparation et migration des centrosomes lors de la mitose précoce

Pour la mitose, les centrosomes doivent initialement se séparer et ensuite se positionner aux deux pôles opposés de la cellule pour assurer la formation bipolaire du fuseau mitotique. Cet événement fait appel à différents éléments de régulation dont l'activité de certaines protéines kinase comme CDK1, Plk1 (Salaün et al., 2008), Nek9, Nek7 et Nek6 (Sdelci et al., 2012), les moteur protéines telles que Eg5 (Kinesin) et Dynein (Smith et al., 2011; Tanenbaum et al., 2008; Woodcock et al., 2010), le cytosquelette actine, les kinétochores et l'enveloppe nucléaire (Tanenbaum et al., 2011).

En pro-métaphase, après NEBD, les microtubules commencent également leur nucléation à partir des kinétochores. Ils sont appelées K-fibre. Ils peuvent aussi générer des forces pour accélérer la séparation des centrosomes (Silk et al., 2009; Toso et al., 2009).

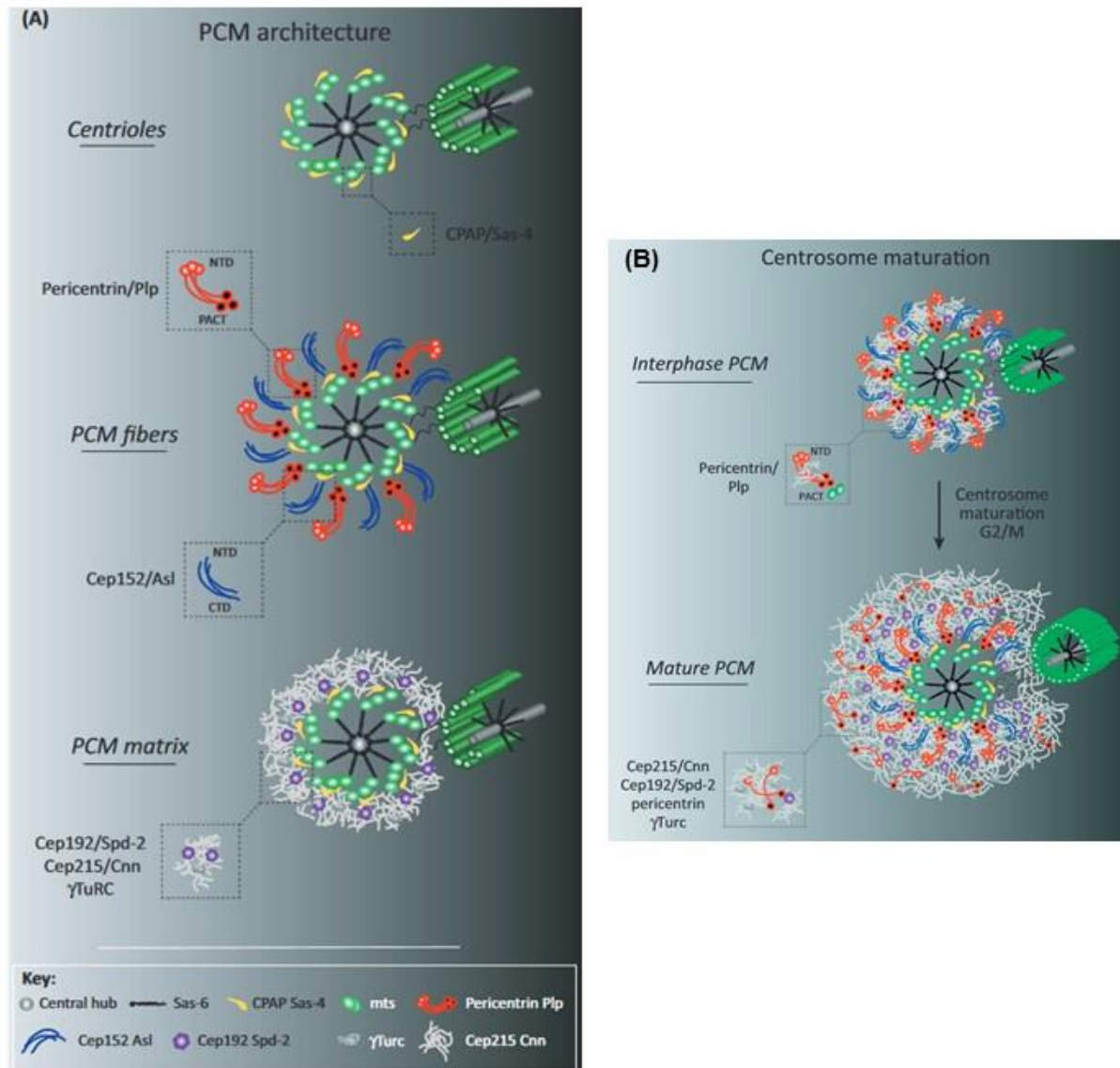


Figure 4. Le matériel péricentriolaire (PCM), A) Représentations schématiques des éléments architecturaux du centrosome en interphase. **B) Architecture du matériel péricentriolaire (PCM) durant la maturation des centrosomes**, représentation schématique d'un centrosome pendant la maturation. Notons l'expansion de la couche proximale du PCM des cellules pendant la phase G2/M par la formation d'une matrice externe constituée des protéines Cep215, Péricentrine et de Cep192. Les complexes annulaires de gamma-Tubuline (γ TuRCs) sont incorporés dans le PCM et favorisent la nucléation des microtubules pendant la mitose. (Mennella et al., 2012)

ii. Maturation des centrosomes

La maturation des centrosomes commence en prophase et atteint son maximum en prométaphase-métaphase (Piehl et al., 2004). Cette maturation est très importante pour le fonctionnement des centrosomes et donc pour la nucléation des microtubules, ainsi que pour obtenir la densité requise au niveau des microtubules afin d'assurer le bon déroulement de la mitose (Figure 4.B).

La maturation des centrosomes est effectuée par recrutement et accumulation de certaines protéines à partir du cytosol. Une de ces protéines est le gamma tubuline. Cette protéine est associée au centre d'organisation des microtubules (MTOC) Elle est indispensable pour leur fonctionnement. Le gamma tubuline libre dans le cytosol est en interaction avec un complexe protéique nommé gamma-TuRC (Wiese and Zheng, 2006).

Le recrutement de gamma-TuRC au niveau des centrosomes par gamma-tubuline dépend d'une protéine adaptatrice nommée Nedd1 (Neural precursor cell Expressed, Developmentally Downregulation-1) ou nommée également GCP-WD (Haren et al., 2006; Zhang et al., 2009). Cette protéine est localisée au niveau du centrosome pendant l'interphase et la mitose (Haren et al., 2006). Le recrutement de gamma-tubuline au centrosome par Nedd1 pendant la mitose est régulée par phosphorylation par CDK1, PLk1 et Nek9 (Sdelci et al., 2012; Zhang et al., 2009).

c. Machinerie du fuseau mitotique

Les propriétés dynamiques inhérentes aux MT sont utilisées par la cellule pour créer la machinerie de base du fuseau mitotique. Dans le cas des eucaryotes multicellulaires, le fuseau mitotique est composé de MT s'étendant à partir de deux pôles opposés (Figure 3.C.). Les extrémités moins dynamiques des MT sont situées aux pôles du fuseau, tandis que les extrémités les plus dynamiques sont localisées loin des pôles. L'assemblage du fuseau mitotique donne un réseau de microtubules bipolaires et antiparallèles qui se compose de trois grandes catégories de MT: les MT kinétochores, les MT astraux et les MT inter polaires (Dumont and Mitchison, 2009) (Figure 3.C.). Le coulisement extensif d'inter polaire provenant de pôles opposés aide à séparer les pôles et assure la stabilité du fuseau. Les MT astraux rayonnent à partir des pôles du fuseau et, parce qu'ils interagissent avec le cortex cellulaire, sont

cruciaux pour le positionnement des fuseaux (Grill and Hyman, 2005; McNally, 2013). Les MT kinétochores ont le rôle central d'attacher les chromosomes aux pôles du fuseau par l'intermédiaire des kinétochores.

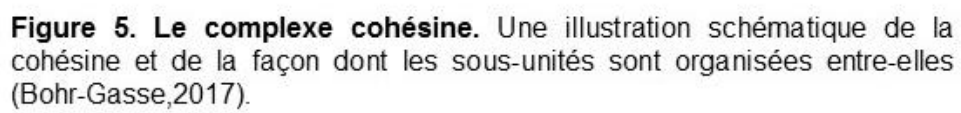
Les MT de kinétochores forment des faisceaux morphologiquement distincts appelés fibres K, qui maintiennent l'attachement des chromosomes au fuseau et leur permettent de s'aligner et de se séparer (Waters et al., 1998) (Putkey et al., 2002).

C. Alignement et ségrégation des chromosomes

En interphase, le matériel génétique est organisé en une structure compacte composée d'ADN et de protéines histones : la chromatine (Felsenfeld and Groudine, 2003). Afin d'assurer la transmission fidèle du matériel génétique aux deux cellules filles, la chromatine, extrêmement dynamique, subit au cours du cycle cellulaire un cycle de condensation / décondensation massive.

a. Cohésion des chromatides

La réplication de l'ADN pendant la phase de synthèse (S) génère des molécules d'ADN identiques qui, sous leur forme chromatide, sont appelés chromatides sœurs. Afin d'obtenir une ségrégation correcte pendant la mitose, ces chromatides restent attachées ensemble jusqu'à l'anaphase. Cette connexion physique, s'opposant aux forces de traction générées par les microtubules qui se fixent aux kinétochores, permettent la bi-orientation des chromosomes pendant la mitose (Skibbens, 2000). Sans cohésion, les chromatides sœurs ne pourraient pas être séparés symétriquement en cellules filles, entraînant une aneuploïdie. Cet attachement est possible grâce à un complexe protéique appelé cohésine. Le complexe cohésine comprend des sous-unités : Smc1, Smc3 et Scc1/Rad21/Mcd1 (Figure 5) (Anderson et al., 2002; Peters and Nishiyama, 2012). Dans la plupart des organismes, Scc1 et Scc3/SA interagissent avec plusieurs autres protéines appelées Wapl/Rad61, Pds5, et sororine (Figure 5). Nous pouvons considérer que ces protéines servent à déterminer comment l'anneau de cohésine interagit de façon stable avec l'ADN, et si ces interactions sont capables d'agir comme médiateur de cohésion (Ivanov and Nasmyth, 2005) (Peters and Nishiyama, 2012).



b. Condensation des chromosomes

Au moment de l'entrée dans la mitose, les chromosomes répliqués sont compactés à l'intérieur du noyau pour faciliter leur ségrégation dans les dimensions d'une cellule.

Deux classes de protéines non histones semblent participer au processus de condensation des chromosomes mitotiques : les protéines SMC (Structural maintenance of chromosomes) et la topoisomérase de type II (Kimura et al., 1999) (Hirano, 2005).

Les chromosomes construisent une structure spéciale pour se connecter avec des microtubules. Chez les vertébrés, les raccords se produisent sur le site de la constriction primaire des chromosomes condensés. Ce site avait été dénommé initialement le centromère (du grec "centro-", qui signifie "central", et "-mere", signifiant "partie") et plus tard il a été appelé kinétochore (du grec kineto- ", qui signifie" déplacer ", et" -choré ", qui signifie" pour distribution"). Nous appellerons "centromère" la région d'ADN chromosomique qui dirige l'assemblage des kinétochores et "kinétochore" la structure protéique associée à cet ADN.

Le kinétochore sert de site d'attachement des microtubules et stimule, durant la mitose, le mouvement du chromosome qui est aligné sur la plaque métaphasique de l'axe mitotique avant d'être séparés en deux cellules filles.

Cela nécessite un processus complexe pour assurer des interactions appropriées entre les chromosomes et les fuseaux mitotiques. De nombreux complexes protéine/protéine ont été impliqués dans le lien entre les kinétochores et les dynamiques des microtubules. Pour éclairer ce processus, il est nécessaire de rentrer dans le détail de la structure des kinétochores et de leur attachement au fuseau mitotique.

c. Le kinétochore

La microscopie électronique de transmission à section mince de chromosomes dans des cellules vertébrales a révélé que les kinétochores ont une morphologie tri laminaire (Black et al., 2004) : le kinétochore interne (*Inner Kinetochore*), qui forme l'interface avec la chromatine ; le kinétochore externe (*Outer Kinetochore*), une région de 50 à 60 nm d'épaisseur qui forme la surface d'interaction pour les microtubules fuselés ; et le kinétochore central (*Central Kinetochore*), la région entre les kinétochores interne et externe. L'analyse par microscopie électronique effectuée en présence d'inhibiteurs de la polymérisation des microtubules montre un réseau dense de fibres, appelé couronne fibreuse, qui s'étend à l'extérieur du kinétochore externe (Figure 6.). L'espace situé entre les deux kinétochores sœurs est nommé centromère intérieur (*Inner centromere*) (Figure 6.).

Actuellement, environ 80 protéines de kinétochores ont été identifiées chez les humains. Bien qu'il y ait quelques différences spécifiques entre différents organismes, les principaux composants ainsi que l'organisation des kinétochores sont conservées chez tous les eucaryotes (McIntosh et al., 2008).

Des études récentes ont fait progresser notre compréhension de la nature de l'interface entre les kinétochores et les microtubules, ainsi que des moyens de promouvoir et de maintenir leur attachement stable. Ces efforts ont démontré l'importance de ce processus pour assurer une ségrégation chromosomique précise, une question qui revêt une grande importance pour la compréhension et le contrôle de la ségrégation chromosomique anormale (aneuploïdie) dans les maladies génétiques humaines et la progression du cancer.

i. Point de contrôle du fuseau mitotique (SAC)

Afin de prévenir les ségrégations aberrantes des chromosomes, la transition métaphase/anaphase est finement contrôlée par le point de contrôle du fuseau mitotique. Cette transition ne peut être franchie que lorsqu'une tension suffisante s'exerce sur le chromosome (Figure 7). (Musacchio and Salmon, 2007). Cette tension est la conséquence d'une bi-orientation du chromosome, sous l'action de deux forces opposées d'intensité égale et exercées par le fuseau mitotique en direction de chaque pôle de la cellule (attachement amphitélisque), chromosome sont encore liées par les

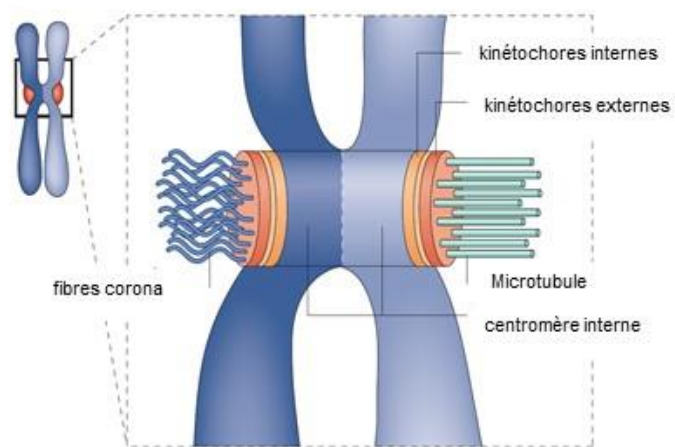


Figure 6. La structure des kinétochores. Schéma d'un chromosome mitotique avec les chromatides sœurs - le chromatide à droite est attaché aux microtubules par le kinétochore externe et le chromatide à gauche est libre. Le kinétochore interne, le kinétochore externe, le centromère interne et les fibres corona sont représentés (Cheeseman and Arshad Desai, 2008).

cohésines (Figure 7). La transition métaphase/anaphase conduit à la dégradation des cohésines centromériques par le protéasome et à l'individualisation des chromatides sœurs. L'absence de tension dans le cas où une seule chromatide d'un chromosome est attachée à un seul pôle (attachement monotélique) ou lorsque les deux chromatides sont attachées au même pôle (attachement syntélique ou mérotélique), active le point de contrôle du fuseau mitotique qui bloque le cycle cellulaire en métaphase lorsque ces erreurs doivent être corrigées par une kinase essentielle : Aurora B.

Les complexes de protéines Mad/Bub sont les constituants majeurs du point de contrôle du fuseau mitotique. Ces protéines sont recrutées au niveau des kinétochores par l'intermédiaire de Knl1 et NDC80. Elles retardent l'anaphase en capturant Cdc20, la sous-unité activatrice de l'APC complexe, jusqu'à ce que les défauts d'attachement des chromosomes soient réparés (figure 8) (Mao et al., 2003).

Figure 7. Étapes d'attachement kinétochore-microtubule sur le fuseau mitotique. Les kinétochores peuvent se lier aux microtubules selon différentes configurations possibles. Un attachement est amphitélétique lorsque chaque kinétochore est attaché aux microtubules émanant de son pôle opposé. Un attachement est monotélétique lorsque seul un kinétochore est rattaché à un pôle. L'attachement est syntélétique lorsque les deux kinétochores sont rattachés un même pôle. Enfin, un attachement est dit mérotélétique lorsqu'un des deux kinétochores est rattaché aux deux pôles. (London and Biggins, 2014)

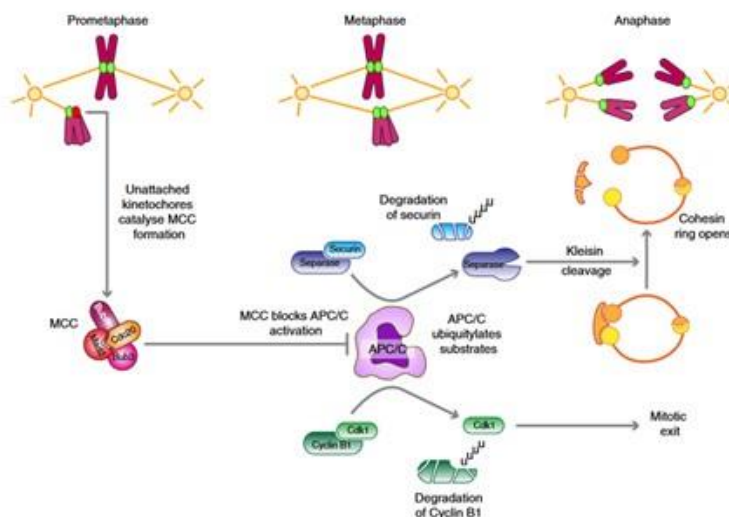
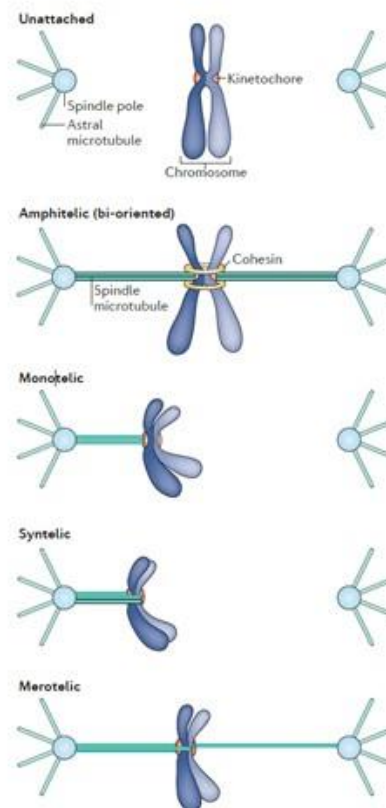


Figure 8. Principe du point de contrôle du fuseau (SAC) : Aux premiers stades de la mitose (prometaphase), les kinétochores libres catalysent la formation du complexe du point de contrôle mitotique (MCC) composé de BubR1, Bub3, Mad2 et Cdc20, ce qui inhibe l'APC/C. Une fois que tous les chromosomes sont alignés avec leurs kinétochores attachés aux deux pôles du fuseau (métaphase), la génération du MCC cesse, ce qui permet à Cdc20 d'activer l'APC/C, ce qui conduit à l'ubiquitylation et à la dégradation de la Sécurin et de la Cycline B1. La dégradation de la Sécurin libère la Séparase qui, à son tour, clive la sous-unité Scc1 de l'anneau de cohésine; ceci ouvre l'anneau permettant ainsi aux chromatides sœurs de se séparer (anaphase). Pendant ce temps, la dégradation de la cycline B1 inactive Cdk1, ce qui entraîne la sortie de mitose. (Pablo Lara-Gonzalez, 2012)

II. Les protéines kinases sont des acteurs clé du cycle cellulaire chez les eucaryotes

1. Régulation du cycle cellulaire

La coordination de la progression du cycle cellulaire est principalement régulée par les différents complexes protéiques et surtout par les protéines kinases qui jouent des rôles précis dans un ordre programmé. Cette régulation est très large et complexe et fera l'objet de sections spécifiques.

2. Régulation de la mitose

La mitose est un processus très organisé, raffiné et sophistiqué ayant une durée déterminée. Pour que la mitose ainsi que les régulations et modifications qu'elle implique s'accomplissent, une régulation bien précise doit avoir lieu avant la mitose. Ces régulations peuvent consister en une modification irréversible de la dégradation des protéines ubiquitination-dépendante pendant l'anaphase (APC/C : *Anaphase Promotincomplex/cyclosome*) (Acquaviva and Pines, 2006),(Bashir et al., 2004; Peters, 2002), ou en une modification réversible comme la phosphorylation/déphosphorylation des protéines par catalyse par les protéines kinase et les phosphatases (Bayliss et al., 2012; Nigg, 2001; Robbins and Gonatas, 1964; Salaün et al., 2008).

3. Les protéines kinase

Les kinases sont les enzymes qui catalysent le transfert du groupement de phosphate de ATP sur le groupement hydroxyle Serine, Thréonine ou Tyrosine de la protéine de substrat (Figure.9) (Bayliss et al., 2012). Cette phosphorylation présente une modification post traductionnelle de la protéine qui peut avoir différentes conséquences pour la protéine.

L'appréciation du rôle central des protéine kinase dans pratiquement toutes les voies de signalisation impliquées dans le développement normal et la maladie a stimulé de nombreuses recherches sur les membres individuels de la famille, ainsi que sur des sous-ensembles intéressants de toute la famille (Cohen, 2000).

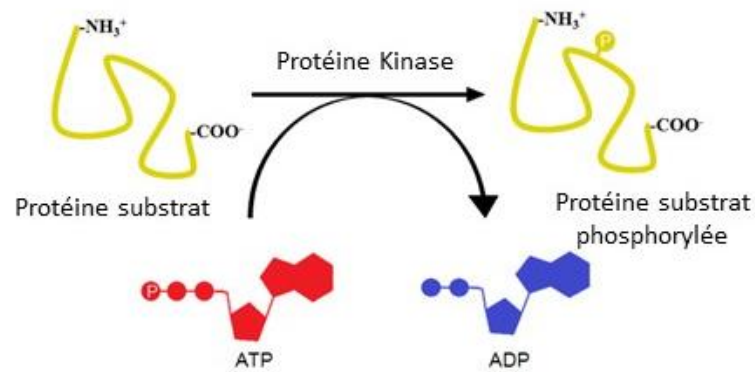


Figure 9. Réaction biochimique catalysée par une protéine kinase (PK). Un groupe phosphate est transféré d'une molécule d'ATP à un acide aminé (Ser, Thr, Tyr) sur une protéine phospho-acceptrice pour produire une phosphoprotéine et une molécule d'ADP. (Extrait et modifié de Haubrich BA, Swinney DC, 2016)

La famille des protéines kinase des eucaryotes (ePK) est l'une des plus grandes familles de protéines représentées dans le génome humain qui contient entre 500 et 1000 gènes ePK (Cohen, 2000).

Par rapport à des ressources KinBase, chez les eucaryotes, les protéines kinase sont partagées en deux groupes majeurs : les protéines kinases conventionnelles (ePK) et les protéines kinases atypiques (aPKs). Les ePK sont le groupe le plus grand, et elles ont été subdivisées en huit familles en comparant les séquences entre les domaines catalytiques, la présence des domaines régulateurs, et en prenant en compte tous les modes connus de la réglementation (Hunter, 1995; Manning et al., 2002).

Les huit familles ePK sont rassemblées dans le tableau 1.A.

Les aPK sont un petit ensemble de protéines kinase qui ne partagent pas de similitudes de séquence claires avec les ePKs, mais elles ont montré, expérimentalement, une activité kinase (Manning et al., 2002). Les représentants de cette famille sont rassemblés dans le tableau 1.B.

Les familles PIKK, PHDK et RIO ont montré expérimentalement des preuves probantes d'activité kinase. Pour les familles RIO et Alpha, la cristallographie aux rayons X a révélé des similitudes évidentes avec les ePK (LaRonde-LeBlanc and Wlodawer, 2004).

A. La régulation de la fonction ePK

Le contrôle spatial et temporel de la phosphorylation de la sérine, de la thréonine ou des résidus de tyrosine est crucial pour la croissance et le développement cellulaires, et ce contrôle repose sur la régulation adéquate des protéines kinases (Pearson and Kemp, 1991).

La régulation de la fonction ePK peut se produire à plusieurs niveaux : le contrôle de la synthèse, la modification post-traductionnelle, la liaison des protéines régulatrices et la localisation sous-cellulaire.

A

La famille	Abréviation
AGC	PKA, PKG, PKC
CAMK	Calcium Calmoduline kinase
CK1	Casein kinase
CMGC	Cycline dependant kinase, Mitogen-activated proteine kinase CDK-like kinase, Glycogen synthase kinase
RGC	Receptor guanylate cyclase kinase
STE	Sterility
TK	Tyrosine Kinase
TKL	Tyrosine kinase-like kinase

B

La famille	Abréviation
Alpha	Myosine kinase Heavy chain
PIKK	Phosphatidy inositol 3' kinase related kinase
PHDK	Pyruvate dehydrogenase kinase
RIO	Right open reading fram
* Les autres	BRD, ABC1, Tif1, H11, FASTK , G11, TAF,

* Les autres : pour ces kinases il n'y a pas d'expérimentation scientifique forte démontrant une activité kinase.

Tableau 1. Les familles de protéines kinases. A, la famille des protéines kinases conventionnelles, B. la famille des protéines kinases atypiques, (D'après Diego Miranda-Saavedra and Geoffrey J. Barton 2007).

Les kinases protéiques sont habituellement gardées inactives et l'acquisition de l'activité catalytique est souvent enterrée sous de multiples couches de contrôle, allant de la liaison des effecteurs allostériques à des altérations dans la localisation sous-cellulaire de l'enzyme (Huse and Kuriyan, 2002).

Un mécanisme fréquemment rapporté pour réguler l'activité de l'ePK est la phosphorylation des principaux résidus du domaine catalytique de l'ePK par d'autres ePK situées en amont (Huse and Kuriyan, 2002).

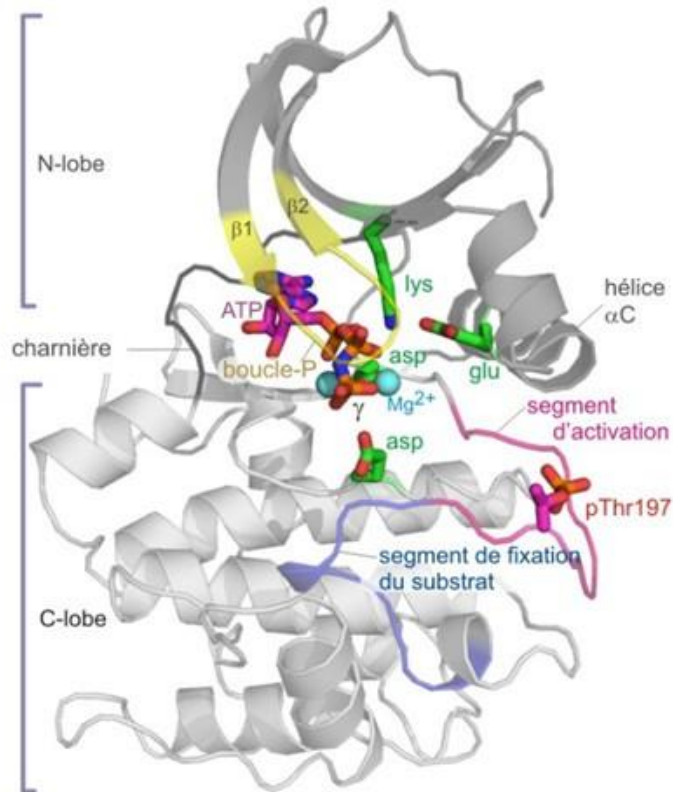
Pour ces raisons l'activité enzymatique des protéines kinase est très importante. Afin de mieux comprendre l'activité de ces enzymes, il est nécessaire de détailler les éléments structuraux des ePK.

B. Structure des protéines kinases

La particularité des protéines kinase par rapport à d'autres protéines est leur domaine catalytique, avec environ 250 acides aminés (Fry et al., 2012). Les résidus observés dans ce noyau de 250 acides aminés seraient dû à une pression évolutive sélective pour préserver la fonction majeure de cette famille de gènes: la catalyse du transfert du phosphate de l'ATP vers un substrat protéique. Bien qu'elles aient des structures similaires, les protéines kinase ont un large nombre de substrat.

La structure des protéines kinase, qui est extrêmement bien conservée parmi les sérine/thréonine et tyrosine kinases, est séparée en deux sous-domaines, ou lobes (Figure 10 A). Le lobe N-terminal, plus petit, ou lobe N, est composé d'une feuille de beta à cinq brins et d'une hélice proéminente, appelée hélice C. Le lobe C terminal est plus grand et est à prédominance hélicoïdale. L'ATP est liée dans une cavité profonde entre les deux lobes et se trouve sous une boucle hautement conservée reliant les brins beta1 et beta 2. Cette boucle de liaison au phosphate, ou boucle P, contient un motif de séquence riche en glycine (GXGXNG) où N est généralement la tyrosine ou la phénylalanine. Les résidus de glycine permettent à la boucle d'approcher les phosphates de l'ATP de très près et de les coordonner via des interactions dorsales. La chaîne latérale aromatique conservée recouvre le site de transfert du phosphate. Les résidus de glycine rendent la boucle P très souple en l'absence d'ATP, ce qui facilite la liaison des inhibiteurs de petites molécules.

A



B

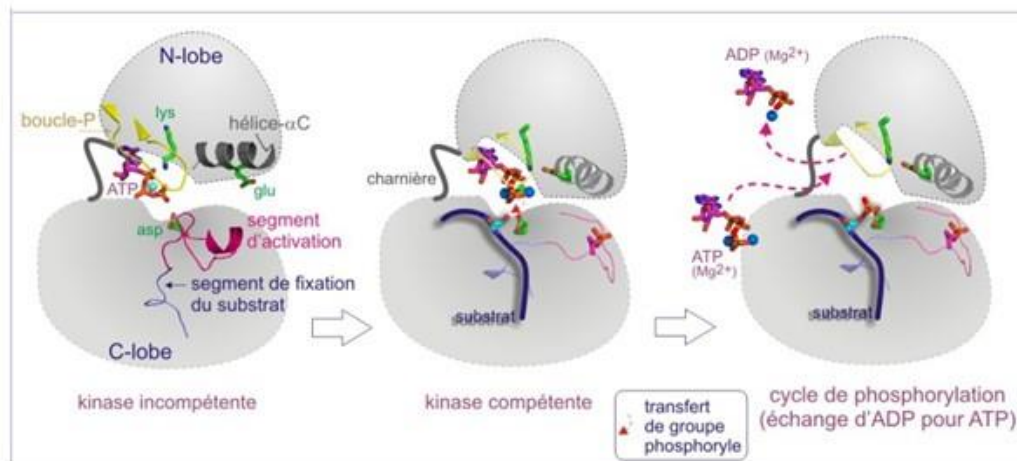


Figure 10. A) Motifs conservés des protéines kinases : schéma présentant la protéine kinase A (1u7e) dans sa forme active. Positionnement de l'ATP et des acides aminés conservés dans les protéines kinases. **B). Mécanisme d'activation d'une protéine kinase**: changement de position de l'hélice alpha C et changement de conformation du segment d'activation et de fixation du substrat. (extrait.unisciel.fr).

Certains de ces inhibiteurs induisent d'importantes distorsions structurelles dans la boucle en interagissant avec le résidu aromatique conservé (Schindler et al., 2000).

Le substrat peptidique se lie dans une conformation étendue à l'extrémité avant de la poche de liaison des nucléotides, près du gamma-phosphate de l'ATP. Une boucle centrale, appelée "segment d'activation", généralement de 20 à 30 résidus de longueur, sert de plate-forme pour le substrat peptidique. Dans la plupart des kinases, cette boucle est phosphorylée lorsque la kinase est active. La phosphorylation de la boucle d'activation la stabilise dans une conformation ouverte et prolongée qui est permissive pour la liaison du substrat. Le transfert optimal de phosphate exige la disposition spatiale précise de plusieurs résidus catalytiques qui sont absolument conservés parmi toutes les kinases connues (Huse and Kuriyan, 2002)

Le segment d'activation a la capacité de subir de grands changements conformationnels lorsque la kinase passe de l'état inactif à l'état actif. A l'état non phosphorylé, la boucle d'activation s'effondre dans le site actif, bloquant la liaison du nucléotide et du substrat peptidique (Hubbard and Till, 2000). Lors de la phosphorylation, il s'éloigne du centre catalytique et adopte une conformation qui permet la liaison et la catalyse du substrat (Hubbard, 1997) (Figure 10 B).

L'hélice alpha C, la seule hélice conservée dans le lobe N riche en feuillets Béta, est un médiateur important des changements de conformation qui ont lieu dans le centre catalytique. Un résidu de glutamate absolument conservé est situé à l'intérieur de cette hélice, et dans les kinases actives, ce résidu forme une paire d'ions avec la chaîne latérale de lysine qui coordonne les phosphates alpha et beta de l'ATP. L'hélice alpha C entre également en contact direct avec la région N-terminale de la boucle d'activation, et sa conformation est souvent liée à celle du motif conservé Asp-Phe-Gly (motif DFG). Cette interaction, ainsi que la paire d'ions Glu-Lys, couplent directement la conformation de l'hélice à la liaison nucléotidique. Les mécanismes de régulation modulent souvent l'activité kinase en modifiant la conformation de l'hélice C, ce qui affecte l'intégrité de ces interactions (Huse and Kuriyan, 2002).

Pour connaître les fonctions des protéines kinase, il convient de s'attacher plus spécifiquement aux protéines kinase mitotiques, qui sont au centre de mes investigations.

C. Les kinases mitotiques

Pendant la mitose, les cellules humaines subissent une cascade de phosphorylations protéiques en masse qui entraîne une transformation spectaculaire de la forme cellulaire, des structures intracellulaires et de la biochimie cellulaire.

Ces événements de phosphorylation mitotique sont catalysés par plusieurs familles de protéines kinases. Les activités catalytiques de ces kinases sont activées par phosphorylation et par des interactions protéine-protéine.

Certaines de ces kinases ou familles de kinases jouent des rôles essentiels à des moments cruciaux de la mitose ou dans les compartiments des cellules pendant la mitose. Parmi elles on trouve : la famille CDK (Cyclin-Dependant Kinase), la famille PLK (Polo Like Kinase), la famille Aurora kinase, la protéine kinase Haspine, et la famille Nek (Nima-related Kinase).

a. Famille CDK

Les kinases dépendantes des cyclines (CDK) forment une grande famille de protéines dont les membres interviennent à différents niveaux du cycle cellulaire pour le réguler. Les CDK seules n'ont pas d'activité. Elles ont besoin d'être associées avec des cyclines ou des sous-unités régulatrices « *Cyclin-like* » pour être fonctionnelles (Malumbres and Barbacid, 2005; Malumbres et al., 2009). Des anomalies fonctionnelles des CDK sont en cause dans les anomalies de prolifération cellulaire, l'instabilité génomique et chromosomique (Gómez-Escoda and Wu, 2017; Malumbres et al., 2009).

i. CDK1

Par son rôle important dans la transition du cycle cellulaire, elle est considérée comme régulateur clé (*Master*) de la mitose. Chez la levure, elle est responsable de la transition G1/S et G2/M. Chez les mammifères, elle contribue à la régulation de la transition G2/M (Draetta, 1997; Fisher and Nurse, 1996).

CDK1 est associée à deux cyclines. La première est la Cycline A qui est en complexe avec CDK1 en fin de phase G2 et pendant la prophase jusqu'à la dégradation, au moment de la disparition de l'enveloppe nucléaire (NEBD) et pendant la prométaphase. La deuxième est la cycline B qui apparaît tout de suite après CDK1-

Cycline A. Ce complexe est actif durant la prométaphase-métaphase et conduit la division cellulaire jusqu'à l'anaphase (Malumbres and Barbacid, 2005). L'activité CDK1-CyclinB est essentiellement régulée par une kinase Wee1, Myt1 et une phosphatase Cdc25. Wee1 et Myt1 peuvent atténuer ou bloquer l'activité CDK1 par phosphorylation inhibitrice. Cdc25 peut être régulée positivement via une phosphorylation activatrice par CDK1 (Timofeev et al., 2010). Cette activation est dépendante de l'état de la cellule qui est prête à assurer la mitose. CDK1 activé phosphoryle de nombreux substrats, au cours de différentes étapes clé de la mitose. Par exemple, elle participe à la disparition de l'enveloppe nucléaire par phosphorylation des lamines qui permet de les dégrader (Gavet and Pines, 2010).

Elle intervient dans la migration des centrosomes ainsi que la formation des fuseaux mitotiques par activation de différents substrats comme NEDD1, Nek9, Eg5, au niveau des centrosomes (Gómez-Escoda and Wu, 2017; Lindqvist et al., 2009; Wang et al., 2014).

Parallèlement, elle active les voies de condensation des chromosomes ainsi que les différentes protéines kinase qui participent au point de vérification de l'attachement des microtubules sur kinétochores telles que Borealine dans le complexe CPC (Tsukahara et al., 2010).

Finalement, elle participe à l'activation du complexe APC/C qui est responsable de l'ubiquitination et de la dégradation des substrats et, parmi ceux-ci, de CDK1 et de la cycline B (Rudner and Murray, 2000)

b. Famille PLk

La famille Polo-Like kinase (Plk) est une famille kinase bien conservée en cours de l'évolution. Elle a un domaine conservé appelé « polo-box » (*polo-box domain*, PDB) qui est nécessaire pour la localisation de la protéine et son autorégulation pendant le cycle cellulaire (Elia et al., 2003a) (Cárcer et al., 2011). Chez l'humain, cette famille regroupe 5 membres (Plk1 à Plk5)(Cárcer et al., 2011). Chaque membre joue des rôles différents a cours du cycle cellulaire, comme la transition G1/S (Plk2, Plk3) (Matthew et al., 2007), la duplication des centrioles (Plk2, Plk4) (2008; Ling et al., 2015) (Habedanck et al., 2005) , la réponse en cas de dommage ADN et l'apoptose (Plk3) (Sang et al., 2009).

i. Plk1

Le membre originel de la famille des Plks, à savoir Plk1, est essentiel à la division cellulaire. Sa structure comprend un domaine N-terminal avec une activité serine/Thréonine kinase, et un domaine régulateur en C-terminal. La partie C-terminal présente deux motifs PDB. Ces derniers permettent de reconnaître le substrat de Plk1 et de l'attacher sur un motif consensus S[T/S]P phosphorylé (Elia et al., 2003b; Park et al., 2010). Généralement ce motif est phosphorylé par CDK1. Plk1 par le motif PDB est capable de reconnaître son substrat (Mardin et al., 2011; Seong et al., 2002).

L'expression de Plk1 débute pendant la phase S, atteint son maximum pendant la mitose puis diminue ensuite (Golsteyn et al., 1995). Au moment de la transition G2/M, Plk1 devient active par phosphorylation sur résidu Thr 210 sur sa boucle d'activation effectuée par Aurora A (Seki et al., 2008).

Plk1 activée est localisée dans différents compartiments des cellules. Pendant la mitose précoce elle est localisée aux centrosomes, sur les microtubules et aux kinétochores. En mitose tardive elle est située sur les midzone et midbodie (Golsteyn et al., 1995).

Une fois active, Plk1 phosphoryle de nombreux substrats contribuant au bon déroulement de la mitose :

- A l'entrée dans la mitose, Plk1 stimule l'activation de CDK1-Cyclin B par inhibition de Wee1 et Myt1 (Nakajima et al., 2003; Watanabe et al., 2005) et activation de Cdc25 (Roshak et al., 2000; Toyoshima-Morimoto et al., 2002) (Figure 11).

- Egalement, elle phosphoryle la cycline B aux centrosomes, le premier lieu d'activation de CDK1-cyclin B (Toyoshima-Morimoto et al., 2002).

- Plk1 phosphoryle également Nek9 au centrosome qui est impliqué dans l'activation de la voie de migration des centrosomes et la nucléation des microtubules (Bertran et al., 2011).

- Plk1 phosphoryle aussi de nombreux substrats qui ont un rôle dans l'alignement chromosomique et le point de contrôle de l'attachement des microtubules. Par

exemple, Plk1 phosphoryle Haspine (Ghenoiu et al., 2013). Cette phosphorylation permet l'activation de Haspine de la prophase jusqu'à la métaphase.

- Plk1 phosphoryle également plusieurs protéines comme MKlp2 qui jouent un rôle dans la cytotéière (Neef et al., 2003).

La dégradation de Plk1 par l'APC/C commence à la fin de la mitose et se poursuit durant toute la phase le G1 (Giráldez et al., 2017).

c. Famille de Neks

Cette famille a été découverte pour la première fois par Ronald Morris dans *Filamentous fungus Aspergillus nidulans* (Morris, 1976). Depuis, elle a été identifiée dans un large éventail d'organismes tels que les protistes (les Chlamydomonas, les Plasmodium, les Tétrahymena) et les eucaryotes multicellulaires, comprenant la drosophile, le xénope, la souris et l'humain. Les cellules humaines expriment 11 gènes qui encodent NEK1 à NEK11. Parmi les 11 kinases répertoriées, 4 ont des rôles connus dans la mitose : Nek2, Nek6 et Nek7 et Nek9.

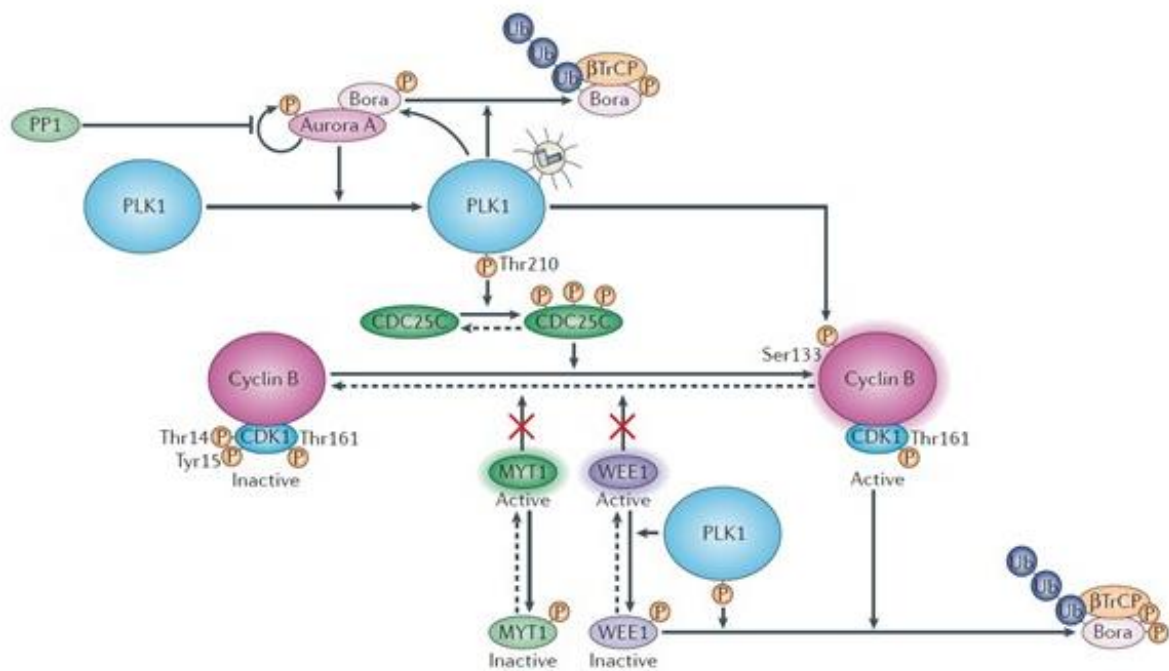


Figure 11. Fonction de Plk1 en début de mitose. Plk1 contrôle l'activité de la CDK1-Cycline B et stimule l'entrée dans la mitose.(Zitouni et al.; 2014)

i. Nek9

La kinase Nek9, appelé aussi Nercc1, a été découverte en 2002 en interaction avec Nek6 (Roig et al., 2002). La séquence de Nek9 est bien conservée chez les mammifères, les oiseaux et les amphibiens. Elle s'exprime dans toutes les lignées et dans tous les tissus cellulaires. Sa structure secondaire se caractérise par trois domaines distincts : le domaine catalytique en N-terminal, le domaine RCC1, et C-terminal (Roig et al., 2002). Le domaine RCC1 a un rôle important dans la régulation de l'activité de Nek9 (Roig et al., 2002). La partie C-terminal contient un motif « coiled coil » permettant l'homodimérisation de la protéine (Roig et al., 2002). Il y a également un motif de NLS entre le domaine catalytique et RCC1, bien que ce motif ne fonctionne pas dans cette localisation (Roig et al., 2002). Il existe aussi un domaine poly glycine entre le domaine RCC1 et C-terminal qui donne une flexibilité à la structure.

Nek9 est exprimée pendant l'interphase et localisée au cytoplasme (Roig et al., 2005). En mitose, Nek9 commence à être activée par multiple phosphorylation par CDK1 et, ensuite, par Plk1 (Roig et al., 2002). Nek9 active est localisée sur les centrosomes (de la prophase jusqu'à la télophase), et également sur les fuseaux mitotiques (de la métaphase à l'anaphase) et sur le midbody (cytodiérèse).

Nek9 a un rôle crucial pour la progression normale de la mitose (Roig et al., 2002). L'absence de Nek9 conduit à des anomalies du fuseau et à un arrêt de la prométaphase ou à une ségrégation chromosomique défectueuse (Belham et al., 2003). Elle phosphoryle Nek6 et Nek7 qui régulent l'activité de Eg5 (Rapley et al., 2008), permettant la migration des centrosomes durant la prophase (Figure 12).

Nek9 phosphoryle également NEDD1 sur Ser377, guide son recrutement et donc celui de la gamma-Tubuline au centrosome dans les cellules mitotiques (Sdelci et al., 2012). Ainsi, Nek9 a un rôle de régulateur clé de la maturation des centrosomes (Sdelci et al., 2012).

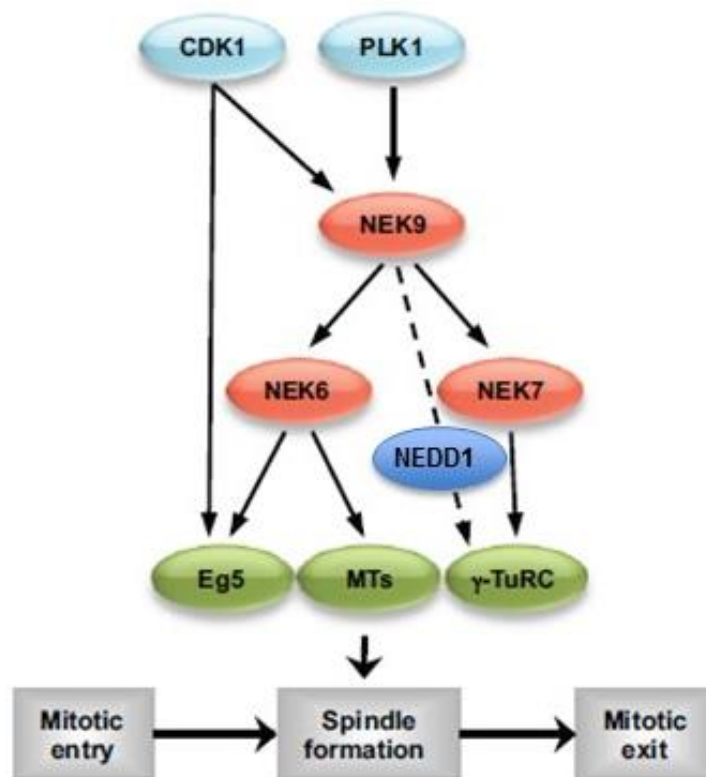


Figure 12. Régulation de Nek9 pendant la mitose, Nek9 a un rôle dans la migration des centrosomes par phosphorylation de Nek6 et Nek7; elle phosphoryle également NEDD1, permettant le recrutement de la gamma tubuline au γ -TuRC (Fry et al 2012).

d. La famille Aurora

Cette famille a été découverte pour la première fois chez les levures et les drosophiles (Chan and Botstein, 1993). Chez les mammifères, cette famille comprend 3 membres : Aurora A, Aurora B et Aurora C. Ces 3 membres présentent un domaine C-terminal catalytique et un domaine non catalytique en N-terminal. Leur domaine N-terminal est différent en taille et séquences. Aurora A et Aurora B ont le même ancêtre, contrairement à Aurora C qui est un dérivé d'Aurora B (Brown et al., 2004). Cela explique la différence de fonctions entre Aurora A et Aurora B et la similarité de fonctions entre Aurora B et Aurora C. Dans tous les cas, la famille kinase Aurora est nécessaire et importante pour la procédure de la mitose.

i. Aurora A

Pour être activée, Aurora A nécessite une interaction avec un co-activateur ou son substrat (comme Bora). Cela garanti l'activité locale de la kinase (Tsai et al., 2003). Aurora A active est localisée aux centrosomes, plus précisément au MPC (Peri-Centrosomic Materiel) et sur les fuseaux mitotiques (Bayliss et al., 2003; Sardon et al., 2008). Elle est nécessaire pour la transition G2/M.

Une fois active, Aurora A phosphoryle Cdc25B, et cette phosphorylation est en lien avec la régulation de la transition G2/M (Dutertre et al., 2004).

De plus, Aurora A est impliquée dans le contrôle de la séparation des centrosomes (Marumoto et al., 2003) et sa maturation, dans la nucléation des microtubules astraux (Giet et al., 2002) et la stabilisation des fuseaux mitotiques (Sardon et al., 2008).

ii. Aurora B

Aurora B est localisée sur différents sites pendant la mitose. Pendant la prophase, elle s'accumule sur les chromosomes. En prométaphase et métaphase elle s'accumule au centromère. A l'anaphase, elle migre sur les microtubules centraux. En télophase, elle est située sur le midbody (Adams and Cory, 2007; Adams et al., 2000). Elle est membre de complexe CPC (*chromosome passenger complex*) qui est nécessaire à l'activité et à la localisation de Aurora B (Adams et al., 2000; Ruchaud et al., 2007). Ce complexe regroupe la protéine INCENP (Inner Centromere Protein), la Survivine et la Borealine. INCENP joue un rôle structural et conformationnel en permettant le

recrutement de la Survivine et de la Boréaline qui, elles, permettent l'ancrage du complexe et sa localisation ainsi que le fonctionnement d'Aurora B (Ruchaud et al., 2007). Aurora B a trois fonctions importantes pendant le cycle cellulaire:

- Condensation et cohésion chromosomique - Aurora B est un médiateur de la séparation des chromatides sœurs en provoquant une dissociation de la cohésine à partir des bras chromosomiques par phosphorylation de la Sororin (Dai et al., 2006; Giménez-Abián et al., 2004; Nishiyama et al., 2013). Aurora B participe également à la condensation des chromosomes en phosphorylant l'Histone H3 sur les Ser10 et Ser28 qui permettent la localisation du complexe Condensin I sur les bras chromosomiques (Hirota et al., 2005; Lipp et al., 2007).
- Point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique - Aurora B génère des kinétochores libres qui sont détectés par le SAC et garde donc ce point de contrôle mitotique actif jusqu'à ce que toutes les fixations incorrectes des microtubules sur les kinétochores soient résolues (Ditchfield et al., 2003; Foley et al., 2011; Hauf et al., 2003).

Pendant la prométaphase Aurora B, via le complexe CPC, est localisée au centromère. Cette localisation est guidée par 2 phosphorylations majeures. La première est la phosphorylation de la Thr3 d'Histone H3 par l'Haspine. Cette phosphorylation crée un site d'encrage pour la Survivine (Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). La deuxième phosphorylation est celle de la Thr120 de l'histone H2A par Bub1. Celui-ci recrute la protéine Shogoshin (Sgo1/2) qui permet l'interaction avec la Boréaline (Figure 13). (Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010).

Une fois Aurora B localisée, elle phosphoryle un certain nombre de substrats au kinétochores comme MCAK (s'enrichit au niveau des attachements mérotéliques (Knowlton et al., 2006), des protéines associées aux MT, y compris le Dam1 (Cheeseman et al., 2002), le réseau KMN (KNL1-Mis12-Ndc80), CENP-E (Cheeseman et al., 2002; DeLuca et al., 2006), et la formine mDia3 (Cheng et al., 2011). Ces phosphorylations réduisent l'activité de liaison MT de ces protéines ce qui déstabilise les liaisons des MT fixées aux kinétochores dans la zone activité d'Aurora B (Figure 14 A). (Cheng et al., 2011; McIntosh et al., 2008; Welburn et al., 2010). Cette action continue jusqu'à l'attachement des deux kinétochores par les microtubules aux deux pôles opposés qui créent une tension et élargissent le

centromère. En conséquence, les cibles d'Aurora B sortent de sa zone d'activité, ce qui permet de stabiliser les liaisons entre les microtubules et kinétochores (Figure 14.C et D). La capture MT par CENP-E, réduit l'activité de la kinase BubR1 dans un complexe ternaire de BubR1-CENPE-MT (Mao et al., 2005). En conséquence BubR1 devient inactive à l'auto-phosphorylation (Guo et al., 2012). La forme non phosphorylée de BubR1 réduit les niveaux de phosphorylation Ndc80 par Aurora B (Guo et al., 2012). Cela permet également la stabilisation de l'attachement des MT aux kinétochores.

- Cytodiérèse - L'étape finale du cycle cellulaire est la cytotiérèse, qui produit deux cellules par la formation d'un anneau d'actino-myosine à l'équateur cellulaire. La cytotiérèse exige le bon fonctionnement du complexe central du fuseau mitotique [composé de GTPase activant la protéine (GAP) Mgc-Rac-GAP et une kinésine, MKLP1 (Gruneberg et al., 2006; Zhao et al., 2006) dont l'activité est elle-même régulée par Aurora B (Minoshima et al., 2003; Touré et al., 2008). En outre, Aurora B phosphoryle également d'autres protéines cytosquelettiques, comme la vimentine (Goto et al., 2003), la myosine II (Murata-Hori et al., 2000), la desmine et GFAP (Minoshima et al., 2003) et participe à l'abscission de la cellule (Minoshima et al., 2003).

iii. Aurora C

Aurora C s'exprime normalement dans les testicules (Hu et al., 2000). Elle a été reconnue comme une protéine centrosomique pendant l'anaphase (Kimura et al., 1997). Mais la surexpression d'Aurora C est aussi localisée, comme Aurora B, au niveau des kinétochores pendant la mitose. Elle a un rôle de condensation des chromosomes et intervient dans la cytotiérèse (Sasai et al., 2004). Son rôle principal s'exprime pendant la méiose (Balboula et al., 2016)

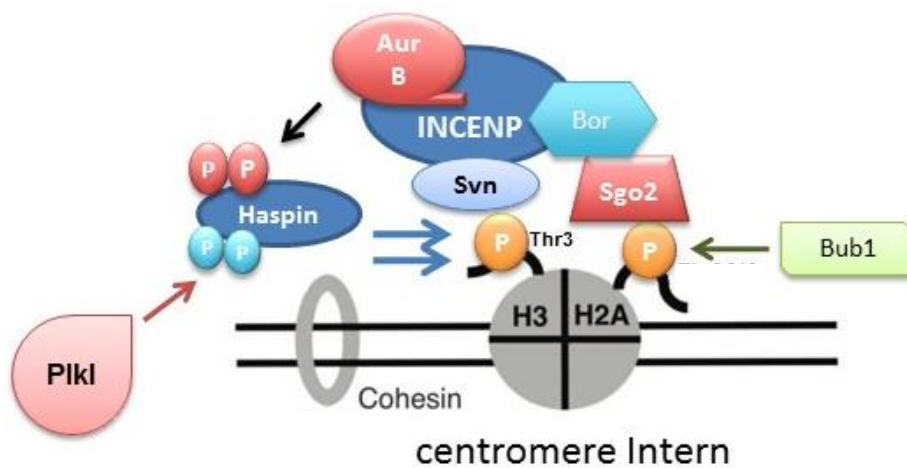


Figure 13. Localisation du CPC au centromère. Le schéma indique le mécanisme de localisation de CPC au centromère interne par phospho Thr3 histone H3 induit par l'Haspine et ^{Thr 120} Histone H2A induit par Bub1. (Adapté de Yamaghashi et al., 2010).

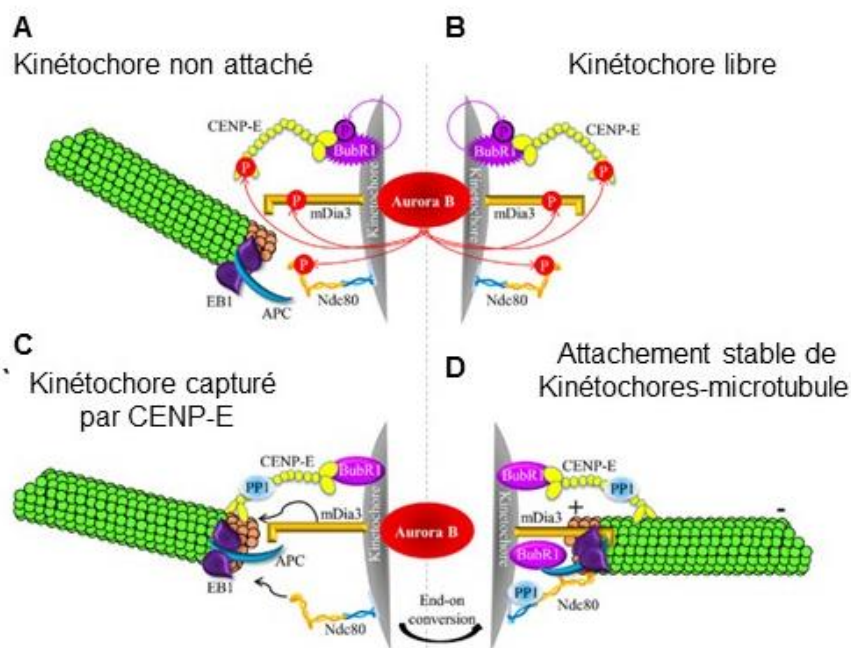


Figure 14. Modèle d'établissement d'un attachement stable entre kinétochore et microtubule. Illustration de l'activité d'Aurora B sur les kinétochores pendant la prométaphase et la métaphase, (D'après Yige Guo et al 2014).

III. La protéine kinase Haspine et ses inhibiteurs,

Nous présentons le chapitre décrivant la protéine kinase Haspine et ses inhibiteurs sous forme d'un chapitre de livre inséré ci-dessous. En effet, nous avons eu l'opportunité d'être invité à l'écriture d'un chapitre de livre avec le titre « Phosphorylation ». Ce livre édité par le Dr. Claude Prigent est en cours de publication par la maison d'édition « IntechOpen ».

The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors

Omid Feizbakhsh¹, Matthieu Place², Xavier Fant¹, Frédéric Buron², Sylvain Routier² and Sandrine Ruchaud¹

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS USR 3151, Protein Phosphorylation & Human Diseases, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff Cedex F-29688, France

² Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, BP 6759, 45067, Orléans Cedex 2, France

Correspondence should be addressed to:

Sandrine Ruchaud: Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, CNRS USR 3151, Protein Phosphorylation & Human Diseases, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff Cedex F-29688, France (sruchaud@sb-roscoff.fr; tel. +33(0)2.98.29.23.09)

Abstract: Haspin is an atypical serine / threonine protein kinase essential to mitosis. Unlike other protein kinases, its kinase domain does not require phosphorylation in order to be activated and bears very high substrate specificity and selectivity. Few substrates have been identified so far. Haspin phosphorylation on threonine 3 of Histone H3 from prophase to anaphase participates to centromeric Aurora B localization and ensures proper kinetochore-microtubule attachment. Haspin is also involved in the maintenance of centromeric cohesion and the mitotic spindle. Inhibitors have been developed and provided tools to dissect Haspin function. The kinase is now considered as a potential therapeutic target against cancer. We discuss here the latest findings on this essential mitotic protein.

Keywords: Haspin kinase, Mitosis, Inhibitors, H3T3ph, Centromere

1- Introduction

Protein kinases play an important role in cell cycle regulation. Together with protein phosphatases they regulate the phosphorylation status of thousands of substrates, including proteins ensuring cell cycle progression. Cell division, *i.e.* mitosis, is a crucial step of the cell cycle and is essential to genomic stability. Mistakes during this process can cause various developmental diseases and cancers. Its orchestration is highly regulated by various families of protein kinases including: Cyclin Dependent kinases (Cdk), Aurora kinases, Polo like kinases (Plks) and NimA related kinases (Neks) whose roles in mitosis are well documented (1,2). Haspin is a serine / threonine kinase discovered in the early 90's essential to mitosis. Despite recent progress, regulation of its activity and its biological functions are still poorly understood. Haspin is involved in chromosome alignment, centromeric cohesion and spindle stability making it a potential target against cancer. Latest data from the literature concerning this protein kinase as well as pharmacological inhibitors are presented.

2- Discovery

Haspin mRNA was first detected in mouse germ cells in 1994 and named Germ cell-specific Gene 2 (GSG2) (3). The coded protein localizes in the nucleus of germ cells and showed kinase activity. It was subsequently renamed Haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (HASPIN) (4). Haspin mRNA is also found in diploid cells of many proliferative tissues such as testis, thymus, bone marrow and spleen as well as in many proliferative cell lines (5–7). Its expression is comparatively reduced in somatic tissues. In addition, Haspin orthologs were found in several eukaryotes, such as yeasts, plants, flies, fishes and mammals, and a large group in *C. elegans*. Phylogenetic analysis indicates that Haspin proteins form a new family of eukaryotic proteins kinases (ePK) (5).

3- Haspin, an atypical kinase structure

Human Haspin is a 798 amino acid serine / threonine protein kinase. The N-terminal part (aa 1-469) is the less conserved among species and thought to act as a regulatory domain. The well-conserved C-terminal part (aa 470-798) corresponds to the catalytic kinase domain(8–10). To date, Haspin kinase domain was crystallized in the presence of ATP analogs such as 5-iodotubercidin (5-ITu) or in the presence of a specific substrate of the kinase, Histone H3 (8,10,11). Disorganization of the N-terminal domain prevented, so far, crystallization of the entire protein.

The structure of human Haspin kinase domain (amino acid 470 to 798) shows similarity to the kinase domain from other kinases of the ePK family. As most protein kinases, it includes a small lobe on the N-terminal side and a large lobe on the C-terminal side. A substrate binding site and an ATP binding pocket are found between the two lobes. The catalytic domain of Haspin displays specific structural features that are not observed in other members of the ePK family.

Compared to canonical protein kinases, Haspin structure revealed several unique and specific structural features that are highly conserved in several species. These characteristics result from amino-acid insertion, deletion or changes in the protein sequence of its catalytic domain in comparison to other ePKs (8,10). The structure of most protein kinases is generally very dynamic, allowing a kinase to transform, by a conformational change, from an inactive to an active state through phosphorylation or interaction with a partner (12). On the contrary, Haspin kinase domain is rigid and fixed in a constitutively active conformational state (8,10,11) (Figure. Figure. 1A).

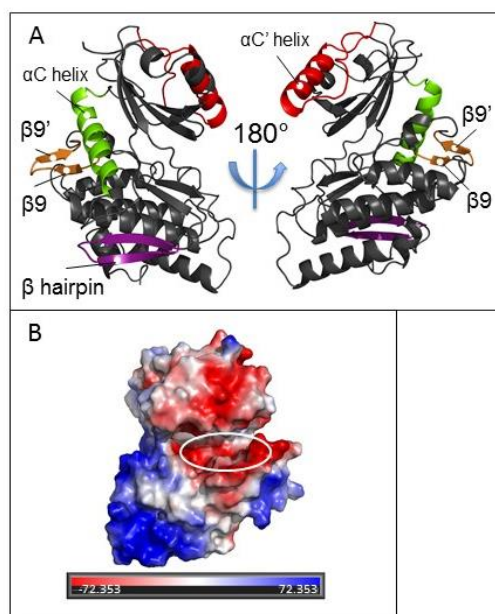


Figure 1. Haspin kinase domain 3D structure. A, insertion elements, $\alpha C'$ helix, $\beta 9$ and $\beta 9'$ and β hairpin are indicated. B, representation of Haspin surface electrostatic charges; the negatively-charged substrate binding site is circled.

This stability is achieved by the combination of different structural elements. Mainly, the generally mobile glycine rich P-loop is stabilized in Haspin by the insertion of an additional helix in the upper lobe called either upper lobe helix (ulH) (8) or $\alpha C'$ helix (10). This helix insertion is mostly conserved throughout Haspin orthologues apart from the fission yeast Alk1 and Alk2. The usually mobile αC helix in the small N-terminal lobe is also stabilized by a number of hydrophobic contacts. Haspin activation segment is another atypical structural element. In most kinases the activation segment has a regulatory purpose, acquiring an active conformation upon phosphorylation and allowing substrate binding. Haspin activation segment is stabilized in a constitutively active conformation (8,10).

Finally, Haspin bears a very specific substrate-binding site. Knowing that histone H3 tail (positively charged) is a specific Haspin substrate suggested a negatively charged binding site as depicted on Figure 1B. Maiolica *et al.* provided insights into this peculiar substrate-binding site resolving the crystal structure of Haspin kinase domain bound to the first seven residues of Histone H3 (11). The study revealed that three residues of the latter, Ala1, Arg2 and the phospho-acceptor site Thr3, are deeply anchored in the substrate hydrophilic binding site of Haspin. These peculiarities create a highly selective substrate-binding site (11).

4- Haspin substrates

Very few substrates of Haspin have been identified and characterized so far. Histone H3 was the first Haspin substrate to be identified. It is specifically phosphorylated on Thr3 (8,10,13). This phosphorylation (H3T3ph) was demonstrated both in vitro and in several cell line by immunofluorescence, using histone H3 Thr3 phospho-specific antibodies (Figure 5 upper panel). Haspin depletion by siRNA eliminates H3T3ph phosphorylation in mitotic cells and ectopic overexpression of Haspin leads to abnormal H3T3 phosphorylation levels in interphase cells confirming that H3T3ph is specific of Haspin activity(7,14,15). H3 is phosphorylated on Thr3 through most of mitosis. Kurihara *et al.*, showed that *Arabidopsis thaliana* Haspin, AtHaspin, is an H3T3ph kinase. They have further demonstrated that AtHaspin phosphorylates both Thr3 and Thr11 of Histone H3 *in vitro* (16,17). It is to be noted that Haspin-homologous proteins in budding yeast, Alk1 and Alk2, have not shown any ability to phosphorylate histones(18) whereas the fission yeast Haspin-related kinase, Hrk1, has been shown to be the major H3T3 phosphorylating kinase in this specie (19).

Histone macroH2A is a variant of histone found enriched on inactive X chromosome of female mammals (20). Several studies demonstrated that histone MacroH2A functions both as a positive and a negative regulator of gene transcription. A phosphoproteomic study showed that inhibition of Haspin by 5-ITu led to a sharp decrease in serine phosphorylation of histone macroH2A (11). This phosphorylation was confirmed in vitro and in HEK293 cells where overexpression of Haspin caused hyper-phosphorylation of Histone macroH2A on Ser137, the latter being inhibited by 5-ITu. It has also been reported that the macro domain of Histone macroH2A controls the levels of Ser10 and Thr3 phosphorylation of histone H3 in human cells and would be involved in controlling chromatin condensation (21,22). The functionality of Haspin in these mechanisms remains to be confirmed.

CENP-T is a component of the Constitutive Centromere Associated Network (CCAN), which plays a central role in kinetochore assembly, mitotic progression and segregation of chromosomes (23). CENP-T has been identified as substrate of Haspin by consensus site prediction (see below) and its phosphorylation on several sites confirmed by in vitro kinase assay (11).

The Haspin kinase substrate recognition motif has been determined by Positional Scanning Oriented Peptide Library Screening (PS-OPLS) as A/V-R-T/S-K-(X-no D/E) with a preference for threonine residues (11). Acidic residues have been shown to impair Haspin recognition when in the surrounding of the phosphorylation site (11).

5- Haspin biological function

5.1- Haspin localization

Haspin is constitutively expressed throughout the cell cycle unlike other mitotic kinases such as Aurora B and Plk1, which are degraded at the end of mitosis(13,24,25). So far, the precise cellular localization of the endogenous protein couldn't be determined due to lack of immunofluorescence-specific antibodies to Haspin. However, several overexpression studies have reported localization of GFP- or Myc-tagged Haspin in different eukaryotic cell lines (HeLa, U-2 OS, Hek293, COS-7) using time-lapse video microscopy or immunofluorescence staining techniques or time-lapse video microscopy(4,13). All these studies showed that Haspin localizes in discrete foci and nucleoli in the nucleus during interphase. It is to be noted that the N-terminal domain of human Haspin exhibits two potential nuclear localization signals (NLS) that are conserved in mice and rats (9). Localization pattern in mitosis is more complex (Figure. 2).

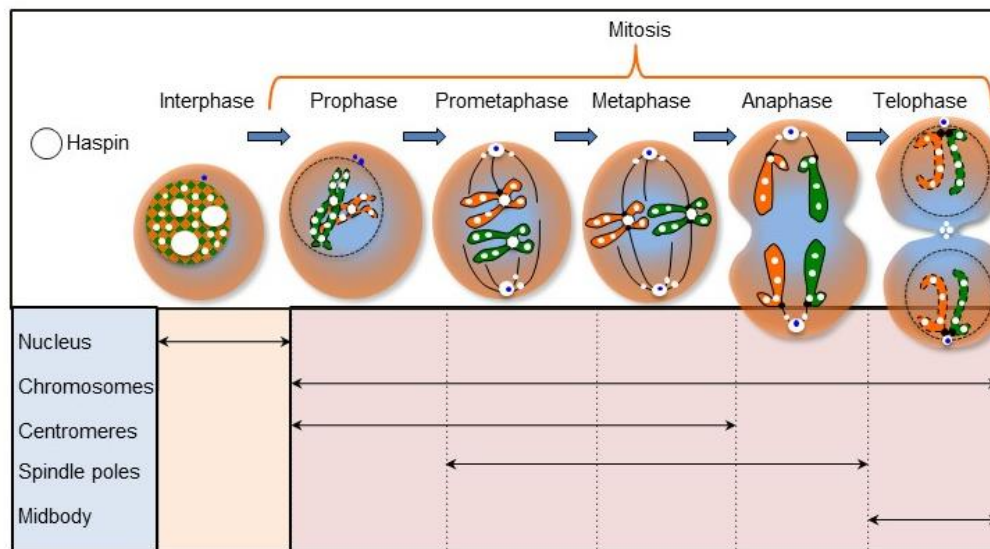


Figure 2. Haspin reported localization along cell cycle in mammal cells

At the end of G2/onset of prophase, Haspin appears associated with condensed chromosomes until anaphase B. Myc:Haspin is observed along chromosome arms with a clear concentration at centromeres (13). GFP:Haspin was also detected at the centrosomes and mitotic spindle in prometaphase cells until telophase where a weak signal is detected in the midbody (13). Nuclear and chromosomal localization throughout mitosis of endogenous Haspin:YFP knocked-in has been recently confirmed by video microscopy (26). Figure 2 shows the location of Haspin during the various stages of the cell cycle with emphasis on mitosis (Figure. 2). Phosphorylation of histone H3 on Thr3 was also examined in plants. In most of the species studied, it appears on chromosomes at the end of G2 phase and disappears during anaphase (27), in contrast to mammals, phosphorylation of Thr3 is seen primarily at pericentromeres in prophase and then along chromosome arms during prometaphase (27,28).

5.2- Specific localization of Haspin during Meiosis

GFP:Haspin colocalizes with chromatin and H3T3ph during all meiotic stages (29,30). Notably, H3T3ph levels were doubled with overexpression of exogenous Haspin, thus confirming that Haspin phosphophorylates H3T3 in oocytes. During metaphase I, Haspin is detected at the centromeres and along sister chromatids. After metaphase I, GFP:Haspin is also located in a discrete region of the oocyte's cortex which is in the immediate vicinity of chromatin and the spindle(29). Haspin was also weakly detected as filamentous aggregates on the spindle. At anaphase I / telophase I transition, Haspin is translocated from chromosomes to midbody (29,30).

5.3- How is Haspin recruited onto chromosomes?

A yeast two-hybrid screen of cohesin-related proteins on the fission yeast Haspin homologue Hrk1 identified an interaction with the cohesin-associated protein Pds5 (19). The interaction was confirmed in cells using a model in which Pds5:mCherry:Lacl was tethered onto a specific location on a chromosome arm through a LacO/LacI system onto which Hrk1:GFP was shown to co-localize (Figure. 3)(19).

Vertebrates have two version of Pds5 protein, Pds5A and B (31,32). Carretero *et al.*, demonstrated that Pds5B-deficient MEF cells showed a decreased activation of Aurora B and Haspin at centromeres and an impaired centromeric localization of Aurora B suggesting that Pds5B may be involved in the recruitment of Haspin on centromeres(33). The recruitment of Haspin by Pds5B has been confirmed in human cell lines by Hindriksen *et al.*(26). Using a LacO/LacI system in which Pds5B:RFP:Lacl was shown to recruit Haspin:YFP on a LacO repeats inserted on chromosome 1 of human U-2 OS cells(26).

Two recent studies in *Xenopus* and yeast showed that SUMOylated DNA topoisomerase II α C-terminal domain can bind Haspin and regulate its localization at centromeres(34,35) (Figure. 3).

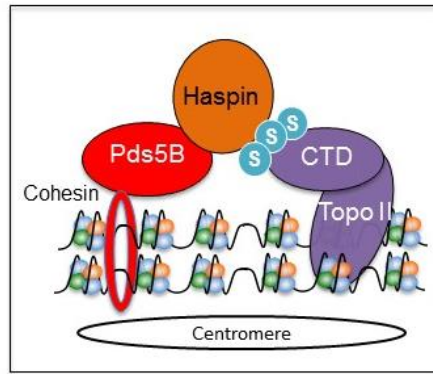


Figure 3. *Haspin recruitment at centromere. Haspin centromeric localization is dependent upon binding to both the cohesin-associated protein Pds5B and the sumoylated C-terminal domain (CTD) of Topo isomerase II (Topo II).*

5.4- Haspin function in mitosis

In vertebrate cell lines, depletion of Haspin by siRNA or treatment with specific inhibitors leads to a substantial decrease in histone H3 Thr3 phosphorylation during mitosis. Moreover, cells display many remarkable defects in mitosis. Prometaphase and metaphase duration are increased due to severe chromosome alignment defects (6,7,13) (Figure 4).

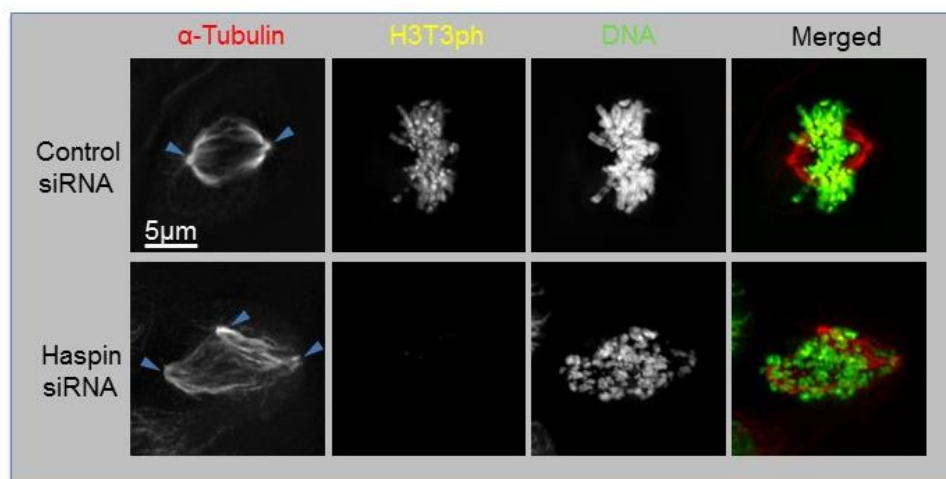


Figure 4. *Haspin depletion by siRNA. Immunofluorescence images of Haspin and control siRNA on U2 OS cells. Haspin depleted cells show chromosome alignment defects, impaired spindles and ectopic spindle poles.*

Mitosis duration, measured by video microscopy, is increased up to several hours in Haspin-depleted U-2 OS cells depleted of Haspin (36). Mitotic spindles are disorganized with often extra centrosome-like foci. Impaired centromeric cohesion and premature separation of chromatid have been reported in Higgins et al 2009 (36). Haspin as been shown to be the major H3T3 phosphorylating kinase in various organisms (7,8,10,11,13,15). Phosphorylation on H3T3 appears first at the end of G2 phase of the cell cycle and disappears during anaphase B (Figure 5 upper panel). Phosphorylation on Thr3 of histone H3 is well marked in prophase. At this stage it is nuclear and more precisely located on condensing chromosome arms. During prometaphase, phosphorylation is concentrated on centromeres in a region delimited by centromeric CENP-A (inner centromere). The phosphorylation decreases rapidly at anaphase and can still be observed on telomeres present in the vicinity of Aurora B activity area on the midzone. It is no longer detected on chromosomes when cells are in late telophase (Figure 5 upper panel) (6,7,13,14).

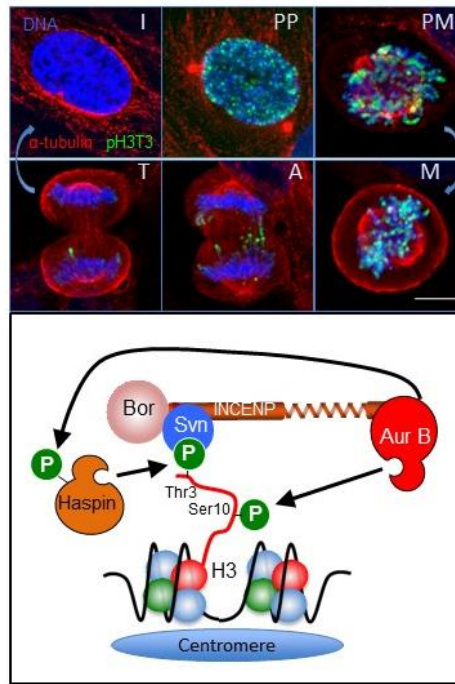


Figure 5. Haspin activity on Thr3 of histone H3. Upper panel, localization of Haspin activity on Thr3 of histone H3 along the cell cycle in mammal cells. Lower panel, schematic representation of Haspin-Aurora B positive feedback loop at centromere

The H3T3ph-dephosphorylating enzyme as been shown to be the PP1 γ phosphatase specifically targeted to anaphase-chromosomes by its regulatory subunit Repo-Man (37,38). Further studies showed that Repo-Man targeting to chromosomes is negatively regulated through Aurora B phosphorylation explaining the persistent H3T3ph signal observed on telomeres at anaphase (37).

Histone H3 phosphorylated on threonine 3 is directly recognized by the conserved BIR domain of Survivin, a member of the chromosomal passenger complex (CPC) (14,19,39). Thus, anchoring the CPC at centromeres. The CPC is a complex of four subunits, Survivin, Borealin, INCENP and the Aurora B kinase. Aurora B is an essential kinase, which regulates mitotic progression, including spindle assembly checkpoint, condensation and chromosomal bi-orientation and cytokinesis (40–42). Additionally, Aurora B phosphorylates Haspin N-terminus on several sites allowing its over-activation and creating a positive feedback loop triggering the accumulation of CPC at the centromeres (14) (Figure 4 lower panel).

The recruitment of CPC at centromere is not only dependent on H3T3ph by Haspin. A second parallel pathway involving histone H2A phosphorylation on Thr120 by Bub1, creates a binding site for Shugoshin, a protein involved in the protection of centromeric cohesion. Shugoshin binds directly to Survivin in yeast and to Borealin CPC member in human in a comparable manner (14,43,44).

Therefore, one of the major functions of Haspin is, together with Bub1 kinase, to bring the CPC at centromeres (Figure 6).

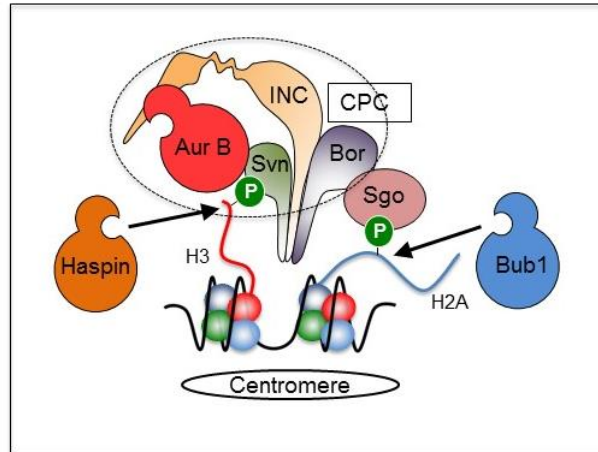


Figure 6. Haspin, together with Bub1, is required for anchoring the CPC at centromere. Svn: Survivin; INC: INCENP; Bor: Borealin; Aur B: Aurora B; Sgo: Shugoshin; CPC: Chromosomal Passenger Complex.

Haspin has been shown to be involved in chromosomal cohesion. Defects in chromosome alignment in Haspin-depleted cells are probably due, at least in part, to a premature loss of sister chromatid cohesion (6).

A recent study has demonstrated that, during mitosis, Haspin binds to the cohesin-associated protein Pds5B (45). During prophase and prometaphase sister chromatids resolution occurs through cohesion release upon binding of Wapl protein to Pds5B. Zhou *et al.* showed that Haspin interaction with Pds5B inhibits Wapl binding, protecting from premature centromeric cohesion loss (45).

5.5- Regulation of Haspin activity

The N-terminal domain of Haspin appears to be involved in both the intracellular localization of the protein and in the regulation of its kinase domain activity. Indeed, it has been shown that presence of the N-terminal domain changes the phosphorylation kinetics of Histone H3 substrate peptides, when compared to the catalytic C-terminal part alone, increasing the K_m for ATP and lowering the affinity for Histone H3 (10). Thus, the N-terminal domain has the potential to modulate the activity of the enzyme (10).

Haspin is expressed throughout the cell cycle (13,46). However, it is highly phosphorylated during mitosis (13). Phosphoproteomic studies showed that these phosphorylations are on the N-terminal domain of the protein, where phosphorylation consensus sites for Cdk1, Plk1 and Aurora B are present (45–47). Phosphorylation events on the N-terminal domain at the onset of mitosis trigger conformational changes and influence Haspin kinetics parameters (see above). Haspin phosphorylation by Cdk1/cyclin B starts on T128 of human Haspin (T206 in *X. laevis*) (47,48). Gheniou *et al.* showed that *Xenopus* Haspin auto-inhibits itself during interphase through a conserved basic site in its N-terminus part close to its kinase domain (47). This auto-inhibition is released through Cdk1 phosphorylation of Haspin N-terminus followed by the recruitment of Plk1 on the Cdk1 phospho-site and its activation. Activated Plk1 phosphorylates several sites on Haspin N-terminus releasing its activity in a timely manner at the beginning of mitosis triggering H3T3 phosphorylation and CPC recruitment at centromeres (47,48). Furthermore, Wang *et al.* showed that Aurora B further phosphorylates Haspin N-terminus enhancing its ability to generate H3T3 phospho-sites for Survivin/CPC binding (49) (Figure 5 lower panel). Another recent study showed that Aurora A also phosphorylates Haspin N-terminus triggering the Aurora B/Haspin feedback loop (50).

Several reports showed that H3T3 phosphorylation by Haspin is regulated by modifications on adjacent residues Arg2 and Lys4. As such, methylation on Arg2 as well as acetylation and methylation on Lys4 strongly decreased the ability of Haspin to phosphorylate Thr3 (8,51). These results imply a likely epigenetic regulation of Haspin and Aurora B activities.

5.6- Haspin function in meiosis

Studies of Haspin function during meiosis were performed on mouse oocytes using small molecule inhibitors and overexpression. Similarly to mitosis, Haspin phosphorylates Thr3 of histone H3 (29,46). This phosphorylation is necessary for accurate meiosis including chromatin condensation and formation of the microtubule assembly checkpoint, ensuring faithful segregation of chromosomes during meiosis I (29,46). Furthermore, Haspin

phosphorylation on H3T3 has been shown to be required for Aurora C kinase proper localization during meiosis (29,46). During meiosis I, in contrast to mitosis, where Haspin is involved in CPC targeting to centromeres, Haspin regulates Aurora C localization to the inter-chromatid axis (29,30). Inhibition of Haspin by 5-ITu showed a failure to organize microtubules and an increase in microtubule organizing centers (MTOCs) as well as an impaired localization of Aurora C at this location. These results suggested a new role for Haspin in the regulation of MTOCs clustering during meiosis and Aurora C localization at MTOC supporting the idea of different functions of Haspin in meiosis compared to mitosis (30).

6- Haspin as a therapeutic target

Mitotic protein kinases are considered as targets of choice for drugs developed by the pharmaceutical industry (52). Because of its role in controlling the activity of Aurora B, and in maintaining the cohesion of centromeres and spindle poles, Haspin has become a relevant target for cancer therapy and is considered as an emerging anti-mitotic drug target (53,54). The fact that Haspin is an atypical ePK with a divergent structure may lead to the development of inhibitors with fewer side effects (4,5). Haspin inhibitor CHR6494 described by Huertas et al. showed antitumor activity in a xenograph mouse model (53). Haspin is also overexpressed in some malignant tumors such as Burkitt's lymphoma and chronic lymphocytic leukemias (55,56). In addition, Haspin was identified in a whole kinome siRNA screen, together with Plk1, as one of the top hit kinases whose depletion decreased both cell viability and estrogen receptor transcriptional activity in MCF7 breast cancer cells (57). Thus, Haspin may represent a new anti-cancer therapeutic target.

7- Haspin inhibitors

There are only few reports on conception of Haspin inhibitors (Figure 7). Most publications reported the evaluation of molecules on a kinase panel, including Haspin kinase.

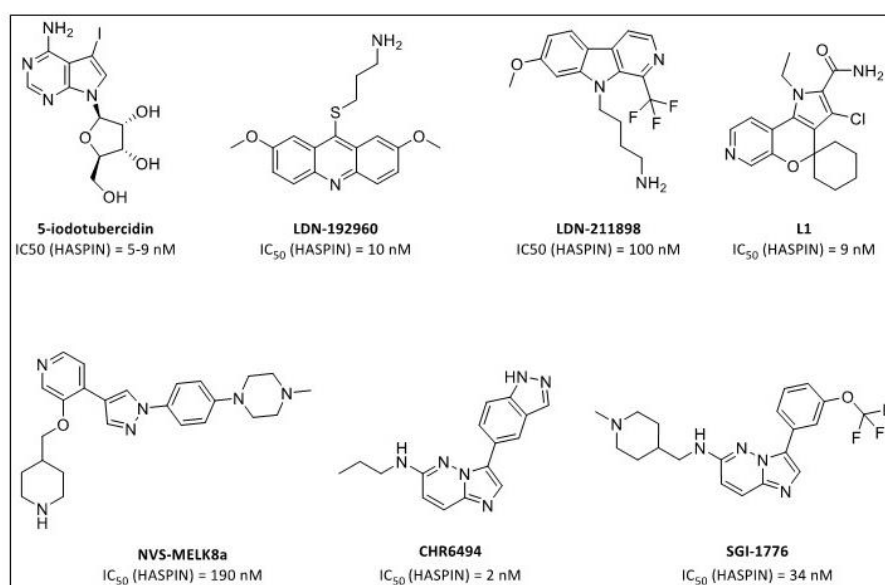


Figure 7. Haspin inhibitors described in the literature

One of the first molecules used in researches on Haspin was the well-known 5-ITu for its potent inhibition of adenosine kinase. This nucleotide-like molecule inhibits strongly Haspin with IC_{50} ranged between 5 and 9 nM. Initially, 5-ITu was mostly used to get a better understanding of Haspin structure and could also be considered as a tool for biological studies. 5-ITu was recently used to assess biological function of Haspin on the cell cycle, especially during mitosis and meiosis (see above). Cuny *et al.* described the screening, synthesis and biological evaluation of two compounds with interesting activities on Haspin (58). The study was mostly devoted to target Dyrk2 and Haspin kinases for their role on proliferative cells. After a screening of 140,000 species, an acridine analog demonstrated an interesting profile and authors isolated LDN-192960, which showed remarkable inhibition of Haspin kinase (IC_{50} = 10 nM). In 2012, the same team synthesized a library of harmine derivative with the same amino-alkyl chain. The newly generated LDN-211898 is described as an inhibitor active at submicromolar concentration against Haspin in an *in vitro* assay (100 nM). Recently, Novartis realized a large screen using Melk inhibitors and found that the compound Melk8a had the best inhibition potency against Haspin (IC_{50} = 190 nM).

However, this compound also showed activities below 1 μ M of other kinases including Gsk3, Cdk2, Akt1, Flt3 and was therefore not selective. This year, Pastor Fernández *et al.* described the synthesis of tricyclic compounds as new kinases inhibitors (59). Mostly, the patented molecules have strong activities against Cdk8, Cdk19, and Haspin, as shown for inhibitor L1 (IC_{50} = 9 nM). A similar approach was used by Chen *et al.*, who first described SGI-1776 as a Pim1 inhibitor (60). *In vitro* evaluation of this compound on a panel of kinases gave an IC_{50} of 34 nM on Haspin. This study was the starting point for screening of other imidazopyridazine as strong Haspin inhibitors. In 2012, Huertas *et al.* described *in vitro*, in cells, and *in vivo* activities of a little imidazoipyridazine, named CHR6494 (53). This molecule seems to be an ATP competitive drug commonly denominated as a type I kinase inhibitor showing a strong inhibition of Haspin with a remarkable IC_{50} of 2 nM.

Kestav *et al.* developed another original type of inhibitors. They synthesized conjugates bearing an aromatic fragment fused to a peptide mimicking the N-terminus of histone H3. Their best compounds showed a K_d of 0.42 nM on Haspin kinase with a good selectivity index (61).

8- Conclusion

Haspin protein kinase was discovered two decades ago. Despite several years of research, the only well characterized substrate, with a specific function, is Histone H3 Thr3. This atypical kinase and its essential role in the regulation of CPC activity in space and time along mitosis, through Thr3 phosphorylation of Histone H3, has become a very attractive subject. The latest findings reviewed here show that there is still much to discover about the function and regulation of this kinase. Although Haspin inhibitors have shown to be very useful tools in dissecting the kinase function in diverse biological mechanisms within multiple organisms, we expect to see their development towards therapeutic drugs in the coming years.

Acknowledgments

We thank Dr. Jonathan Dorival (Roscoff Biological Station, UMR8227) for his help on illustrating Figure 1 and Dr. Julien Duez (Roscoff Biological Station, USR3151) for helpful criticisms on text and figures. Our work is supported by La Ligue Contre le Cancer, Fondation ARC, Cancéropôle GrandOuest and GIS Biogenouest. OF was supported by a Brittany Region ARED Doctoral fellowship.

References

1. Ma HT, Poon RYC. How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *Biochem J.* 2011 Apr 1;435(1):17–31.
2. Combes G, Alharbi I, Braga LG, Elowe S. Playing polo during mitosis: PLK1 takes the lead. *Oncogene* [Internet]. 2017 Apr 24 [cited 2017 Jul 26]; Available from: <http://www.nature.com/insb.bib.cnrs.fr/onc/journal/vaop/ncurrent/full/onc2017113a.html?foxtrotcallback=true>
3. Tanaka H, Yoshimura Y, Nishina Y, Nozaki M, Nojima H, Nishimune Y. Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Lett.* 1994 Nov 21;355(1):4–10.
4. Tanaka H, Yoshimura Y, Nozaki M, Yomogida K, Tsuchida J, Tosaka Y, et al. Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem.* 1999 Jun 11;274(24):17049–57.
5. Higgins JMG. Haspin-like proteins: A new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein Sci.* 2001 Aug 1;10(8):1677–84.
6. Dai J, Sullivan BA, Higgins JMG. Regulation of Mitotic Chromosome Cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell.* 2006 Nov 1;11(5):741–50.
7. Markaki Y, Christogianni A, Politou AS, Georgatos SD. Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin. *J Cell Sci.* 2009 Aug 15;122(16):2809–19.
8. Eswaran J, Patnaik D, Filippakopoulos P, Wang F, Stein RL, Murray JW, et al. Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Dec 1;106(48):20198–203.
9. Higgins JMG. Structure, function and evolution of haspin and haspinrelated proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2003 Mar 1;60(3):446–62.
10. Villa F, Capasso P, Tortorici M, Forneris F, Marco A de, Mattevi A, et al. Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Dec 1;106(48):20204–9.
11. Maiolica A, Medina-Redondo M de, Schoof EM, Chaikuad A, Villa F, Gatti M, et al. Modulation of the Chromatin Phosphoproteome by the Haspin Protein Kinase. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Jul 1;13(7):1724–40.
12. Huse M, Kuriyan J. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell.* 2002 May 3;109(3):275–82.
13. Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JMG. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* 2005 Feb 15;19(4):472–88.
14. Wang F, Ulyanova NP, van der Waal MS, Patnaik D, Lens SMA, Higgins JMG. A Positive Feedback Loop Involving Haspin and Aurora B Promotes CPC Accumulation at Centromeres in Mitosis. *Curr Biol CB.* 2011 Jun 21;21(12):1061–9.
15. Polioudaki H, Markaki Y, Kourmouli N, Dialynas G, Theodoropoulos PA, Singh PB, et al. Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett.* 2004 Feb 27;560(1–3):39–44.
16. Kozgunova E, Suzuki T, Ito M, Higashiyama T, Kurihara D. Haspin has Multiple Functions in the Plant Cell Division Regulatory Network. *Plant Cell Physiol.* 2016 Apr;57(4):848–61.
17. Ashtiyani RK, Moghaddam AMB, Schubert V, Rutten T, Fuchs J, Demidov D, et al. AtHaspin phosphorylates histone H3 at threonine 3 during mitosis and contributes to embryonic patterning in Arabidopsis. *Plant J.* 2011 Nov 1;68(3):443–54.
18. Panigada D, Grianti P, Nespoli A, Rotondo G, Gallo Castro D, Quadri R, et al. Yeast Haspin Kinase Regulates Polarity Cues Necessary for Mitotic Spindle Positioning and Is Required to Tolerate Mitotic Arrest. *Dev Cell.* 2013 Sep 16;26(5):483–95.
19. Yamagishi Y, Honda T, Tanno Y, Watanabe Y. Two Histone Marks Establish the Inner Centromere and Chromosome Bi-Orientation. *Science.* 2010 Oct 8;330(6001):239–43.
20. Costanzi C, Pehrson JR. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature.* 1998 Jun 11;393(6685):599–601.
21. Kim W, Chakraborty G, Kim S, Shin J, Park C-H, Jeong M-W, et al. Macro Histone H2A1.2 (MacroH2A1) Protein Suppresses Mitotic Kinase VRK1 during Interphase. *J Biol Chem.* 2012 Feb 17;287(8):5278–89.
22. Muthurajan UM, Bao Y, Forsberg LJ, Edayathumangalam RS, Dyer PN, White CL, et al. Crystal structures of histone Sin mutant nucleosomes reveal altered protein–DNA interactions. *EMBO J.* 2004 Jan 28;23(2):260–71.

23. Gascoigne KE, Takeuchi K, Suzuki A, Hori T, Fukagawa T, Cheeseman IM. Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell*. 2011 Apr 29;145(3):410–22.
24. Kimura M, Kotani S, Hattori T, Sumi N, Yoshioka T, Todokoro K, et al. Cell Cycle-dependent Expression and Spindle Pole Localization of a Novel Human Protein Kinase, Aik, Related to Aurora of Drosophila and Yeast Ipl1. *J Biol Chem*. 1997 May 23;272(21):13766–71.
25. Golsteyn RM, Mundt KE, Fry AM, Nigg EA. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. 1995 Jun 15 [cited 2017 May 17]; Available from: <https://lra.le.ac.uk/handle/2381/38961>
26. Hindriksen S, Bramer AJ, Truong MA, Vromans MJM, Post JB, Verlaan-Klink I, et al. Baculoviral delivery of CRISPR/Cas9 facilitates efficient genome editing in human cells. *PLoS ONE* [Internet]. 2017 Jun 22 [cited 2017 Jul 13];12(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5480884/>
27. Caperta AD, Rosa M, Delgado M, Karimi R, Demidov D, Viegas W, et al. Distribution patterns of phosphorylated Thr 3 and Thr 32 of histone H3 in plant mitosis and meiosis. *Cytogenet Genome Res*. 2008;122(1):73–9.
28. Houben A, Demidov D, Caperta AD, Karimi R, Agueci F, Vlasenko L. Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr*. 2007 May;1769(5–6):308–15.
29. Nguyen AL, Gentilello AS, Balboula AZ, Shrivastava V, Ohring J, Schindler K. Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes. *J Cell Sci*. 2014 Dec 1;127(23):5066–78.
30. Balboula AZ, Nguyen AL, Gentilello AS, Quartuccio SM, Drutovic D, Solc P, et al. Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. *J Cell Sci*. 2016 Oct 1;129(19):3648–60.
31. Losada A, Yokochi T, Hirano T. Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci*. 2005 May 15;118(10):2133–41.
32. Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C, Peters BH, Peters J-M. Characterization of Vertebrate Cohesin Complexes and Their Regulation in Prophase. *J Cell Biol*. 2000 Nov 13;151(4):749–62.
33. Carretero M, Ruiz-Torres M, Rodríguez-Corsino M, Barthelemy I, Losada A. Pds5B is required for cohesion establishment and Aurora B accumulation at centromeres. *EMBO J*. 2013 Nov 13;32(22):2938–49.
34. Yoshida MM, Ting L, Gygi SP, Azuma Y. SUMOylation of DNA topoisomerase II α regulates histone H3 kinase Haspin and H3 phosphorylation in mitosis. *J Cell Biol*. 2016 Jun 20;213(6):665–78.
35. Edgerton H, Johansson M, Keifenheim D, Mukherjee S, Chacón JM, Bachant J, et al. A noncatalytic function of the topoisomerase II CTD in Aurora B recruitment to inner centromeres during mitosis. *J Cell Biol*. 2016 Jun 20;213(6):651–64.
36. Dai J, Kateneva AV, Higgins JMG. Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J Cell Sci*. 2009 Nov 15;122(22):4168–76.
37. Qian J, Lesage B, Beullens M, Van Eynde A, Bollen M. PP1/Repo-Man Dephosphorylates Mitotic Histone H3 at T3 and Regulates Chromosomal Aurora B Targeting. *Curr Biol*. 2011 May 10;21(9):766–73.
38. Vagnarelli P, Ribeiro S, Sennels L, Sanchez-Pulido L, de Lima Alves F, Verheyen T, et al. Repo-Man coordinates chromosomal reorganization with nuclear envelope reassembly during mitotic exit. *Dev Cell*. 2011 Aug 16;21(2):328–42.
39. Kelly AE, Ghenoiu C, Xue JZ, Zierhut C, Kimura H, Funabiki H. Survivin Reads Phosphorylated Histone H3 Threonine 3 to Activate the Mitotic Kinase Aurora B. *Science*. 2010 Oct 8;330(6001):235–9.
40. Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Dec;13(12):789–803.
41. van der Horst A, Lens SMA. Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma*. 2014;123(1–2):25–42.
42. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Oct;8(10):798–812.
43. Lordier L, Chang Y, Jalil A, Aurade F, Garçon L, Lécluse Y, et al. Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. *Blood*. 2010 Sep 30;116(13):2345–55.

44. Storchová Z, Becker JS, Talarek N, Kögelsberger S, Pellman D. Bub1, Sgo1, and Mps1 mediate a distinct pathway for chromosome biorientation in budding yeast. *Mol Biol Cell*. 2011 May 1;22(9):1473–85.
45. Zhou L, Liang C, Chen Q, Zhang Z, Zhang B, Yan H, et al. The N-Terminal Non-Kinase-Domain-Mediated Binding of Haspin to Pds5B Protects Centromeric Cohesion in Mitosis. *Curr Biol*. 2017 Apr 3;27(7):992–1004.
46. Wang Q, Wei H, Du J, Cao Y, Zhang N, Liu X, et al. H3 Thr3 phosphorylation is crucial for meiotic resumption and anaphase onset in oocyte meiosis. *Cell Cycle*. 2015 Dec 4;15(2):213–24.
47. Ghenoiu C, Wheelock MS, Funabiki H. Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Mol Cell* [Internet]. 2013 Dec 12 [cited 2017 Jul 13];52(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3865225/>
48. Zhou L, Tian X, Zhu C, Wang F, Higgins JM. Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep*. 2014 Mar;15(3):273–81.
49. Wang F, Dai J, Daum JR, Niedzialkowska E, Banerjee B, Stukenberg PT, et al. Histone H3 Thr-3 Phosphorylation by Haspin Positions Aurora B at Centromeres in Mitosis. *Science*. 2010 Oct 8;330(6001):231–5.
50. Yu F, Jiang Y, Lu L, Cao M, Qiao Y, Liu X, et al. Aurora-A promotes the establishment of spindle assembly checkpoint by priming the Haspin-Aurora-B feedback loop in late G2 phase. *Cell Discov*. 2017 Jan 10;3:celldisc201649.
51. Han A, Lee KH, Hyun S, Lee NJ, Lee SJ, Hwang H, et al. Methylation-mediated control of aurora kinase B and Haspin with epigenetically modified histone H3 N-terminal peptides. *Bioorg Med Chem*. 2011 Apr 1;19(7):2373–7.
52. Guillermo de Carcer IP de C and MM. Targeting Cell Cycle Kinases for Cancer Therapy [Internet]. <http://www.eurekaselect.com>. Available from: <http://www.eurekaselect.com/58964/article>
53. Huerta EE. Cancer Prevention in the 21st Century: The Preventorium Concept. *J Health Care Poor Underserved*. 2012 Oct 31;23(4):1698–703.
54. Dominguez-Brauer C, Thu KL, Mason JM, Blaser H, Bray MR, Mak TW. Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Mol Cell*. 2015 Nov 19;60(4):524–36.
55. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of Gene Expression Phenotype to Immunoglobulin Mutation Genotype in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Exp Med*. 2001 Dec 3;194(11):1639–48.
56. Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma E-J, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*. 2006 Jun 8;354(23):2431–42.
57. Bhola NE, Jansen VM, Bafna S, Giltane JM, Balko JM, Estrada MV, et al. Kinome-wide functional screen identifies role of PLK1 in hormone-independent, ER-positive breast cancer. *Cancer Res*. 2015 Jan 15;75(2):405–14.
58. Cuny GD, Ulyanova NP, Patnaik D, Liu J-F, Lin X, Auerbach K, et al. Structure–activity relationship study of beta-carboline derivatives as haspin kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Mar 1;22(5):2015–9.
59. Brevet US9682991 - Tricyclic compounds for use as kinase inhibitors - Google Brevets [Internet]. [cited 2017 Jul 27]. Available from: <https://www.google.com/patents/US9682991>
60. Chen LS, Redkar S, Bearss D, Wierda WG, Gandhi V. Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2009 Nov 5;114(19):4150–7.
61. Kestav K, Lavogina D, Raidaru G, Chaikuad A, Knapp S, Uri A. Bisubstrate Inhibitor Approach for Targeting Mitotic Kinase Haspin. *Bioconjug Chem*. 2015 Feb 18;26(2):225–34.

IV. L'Haspine représente une nouvelle cible thérapeutique en santé humaine

1. La cellule cancéreuse: définition scientifique (non clinique)

Huit altérations de la physiologie cellulaire sont communes au développement d'un cancer (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

N°1- L'autosuffisance en facteurs de croissance : les cellules cancéreuses présentent fréquemment la faculté de réguler leur propre croissance via leurs sécrétions autocrines. D'autre part, les cellules cancéreuses peuvent également sécréter des facteurs paracrines afin de stimuler les cellules normales du stroma péri-tumoral qui, en réponse, libèreront des facteurs favorisant le développement de la masse tumorale (Cheng et al., 2008).

N°2- L'insensibilité des cellules aux signaux antiprolifératifs : des douzaines de gènes suppresseurs de tumeurs exerçant un contrôle négatif sur la croissance et la prolifération cellulaire sont connus pour leur inactivation caractéristique dans plusieurs formes de cancers chez l'animal ou chez l'humain. Ainsi, la dérégulation fonctionnelle TP53 et/ou pRB (protéine du rétinoblastome) joue un rôle important dans le développement d'une majorité de cancers humains. L'inactivation de pRB résulte en une prolifération cellulaire dérégulée. La dérégulation du facteur de transcription p53 par mutation de structure ou de fonction tend à affranchir les cellules cancéreuses de l'effet régulateur négatif exercé par les points de contrôle en viabilité et leur échappement à la cascade apoptotique (Burkhart and Sage, 2008; Deshpande et al., 2005).

N°3- Le potentiel de division infini : la maintenance des extrémités télomériques est essentielle à la stabilité chromosomique. La régulation de l'activité télomérase est strictement réprimée dans une majorité des cellules normales somatiques. Un raccourcissement télomérique est observé au cours de chaque réplication cellulaire. Ce raccourcissement est considéré comme un dispositif d'horloge délimitant le potentiel de réplication des cellules normales. Le processus d'immortalisation cancéreuse est associé à la restauration d'une activité télomérase permettant une réplication cellulaire anormalement illimitée. L'ensemble des mécanismes permettant cette restauration ne sont pas tous formellement connus, mais impliquent l'amplification génique de la télomérase hTERT et la transactivation du promoteur

associé par l'oncogène myc (Artandi and DePinho, 2010; Blasco, 2005; Shay and Wright, 2000).

N°4- La sécrétion de facteurs pro-angiogéniques : il s'agit par exemple du facteur de croissance endothéliale vasculaire A (VEGF-A) (Crawford et al., 2009; Mac Gabhann and Popel, 2008) ou de la thrombospondine-1 (TSP-1) (Kazerounian et al., 2008). Le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux existants permet un apport en éléments nutritifs et en oxygène nécessaire au développement tumoral, ainsi que l'évacuation des déchets métaboliques et du dioxyde de carbone (Baeriswyl and Christofori, 2009; Bergers and Benjamin, 2003).

N°5- L'acquisition d'un phénotype invasif à potentialité métastatique : les cellules cancéreuses ne respectant plus les relations structurelles tissulaires vont infiltrer puis envahir les tissus adjacents. De même, elles pourront migrer à distance de leur localisation d'origine par les voies sanguines ou lymphatiques, formant ainsi des métastases.

N°6- Une résistance à la mort cellulaire programmée notamment apoptotique : Il existe plusieurs capteurs d'anomalies qui déclenchent la voie apoptose dans la cellule, qui jouent un rôle clé dans le développement des tumeurs (Adams and Cory, 2007). Le plus remarquable est un capteur de dommages à l'ADN qui fonctionne via le suppresseur de la tumeur TP53 (Junttila and Evan, 2009); Les cellules tumorales développent une variété de stratégies pour limiter ou contourner l'apoptose. Le plus courant est la perte de la fonction suppresseur de tumeur TP53, qui élimine ce capteur de dommages et conduit la cellule vers l'apoptose.

N°7- L'échappement à l'immuno-surveillance : les cellules cancéreuses sont capables d'échapper aux mécanismes de reconnaissance par le système immunitaire hôte via différents systèmes, dont un mécanisme d'immuno échappement : par exemple, une surexpression de récepteurs de co-stimulation B7 (B7-H3 ou CD276) à effet immuno suppressif (Guery et al., 2015) . La combinaison de différentes stratégies d'immuno-échappement est souvent observée en cancérologie et est à l'origine des rechutes cliniques, liée à la dormance tumorale (Saudemont and Quesnel, 2004).

N°8- L'établissement d'un microenvironnement tumoral inflammatoire favorisant l'angiogénèse et toutes les étapes de la progression tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011).

2. Le processus de cancérisation est complexe

Les recherches menées au cours de ces dernières décennies ont permis de faire évoluer notre compréhension du processus de cancérisation. Le cancer nous apparaît dorénavant comme une masse cellulaire non seulement anormale mais aussi hétérogène. Cette hétérogénéité se complexifiant à l'échelle des populations humaines, et cela pour chaque type et grade de cancer, la recherche scientifique et clinique s'efforce actuellement d'identifier et de retracer les séquences d'altérations mécanistiques ou signalétiques pro-oncogéniques. Ces études dégagent progressivement des pistes de recherche thérapeutiques relativement diversifiées. Actuellement, les thérapies ciblées ne représentent qu'une option minoritaire dans l'arsenal médicamenteux anticancéreux employé en clinique.

Chaque année, plus de 12 millions de nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués et 7,6 millions d'individus meurent du cancer. En l'absence de mesures appropriées, on estime que ces chiffres pourraient atteindre 26 millions de nouveaux cas d'ici 2030 (La ligue contre cancer : www.ligue-cancer.net/article/8244_mener-une-lutte-internationale).

Au cours des dernières décennies, la compréhension des mécanismes à l'origine de l'initiation et du développement des cancers a beaucoup évolué. Un effort de hiérarchisation désigne l'instabilité chromosomique, l'instabilité microsatellite et la méthylation des îlots CpG comme des mécanismes généraux distincts y contribuant lourdement. De nouveaux mécanismes en cause se dégagent, par exemple avec l'intervention des ARN longs non codants ou des microARN.

L'instabilité chromosomique (CIN) fait référence à l'aneuploïdie, c'est-à-dire une différence en nombre de chromosomes ou un changement structural des chromosomes faisant appel aux événements de translocations, d'éliminations et/ou d'insertion. Elle est donc caractérisée par une perte généralisée d'hétérozygotie (LOH) et des anomalies chromosomiques graves (Jones et al., 2008; Lin et al., 2003). C'est une caractéristique clé du processus de cancérisation. L'aneuploïdie est l'une des "marques distinctives" du cancer de par son association à 90 % de tumeurs solides et à plus de 50 % des cancers hématopoïétiques chez l'homme (Base de données Mitelman des Aberrations chromosomiques et fusions génétiques dans le cancer, 2014).

3. Tout commence avec des mutations

Les modifications génétiques conduisant à la formation d'un cancer sont généralement associées à deux types de gènes : les gènes suppresseurs de tumeurs et les proto-oncogènes. Les gènes suppresseurs de tumeurs exercent un effet de régulation négative sur le cycle de la division cellulaire. A contrario, les proto-oncogènes exercent un levier de régulation positive. Des altérations génétiques ou des dysfonctionnements signalétiques amenant à une activité anormale des produits de ces gènes sont en cause dans le cancer. La mutation des proto-oncogènes possède un caractère dominant. Ainsi, il suffit qu'un seul des deux allèles soit muté pour qu'une anomalie de séquence s'exprime et prenne une dimension mécanistique fonctionnelle (William-Faltaos et al., 2007; Yokota, 2000). L'activation d'un proto-oncogène en oncogène se traduit alors par une sur-activité de la protéine codée correspondante, favorisant en excès le processus de croissance, de différenciation tissulaire etc. ou encore de survie qui découle de sa fonction initiale. C'est généralement l'altération combinée de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou proto-oncogènes (par translocation(s), amplification(s) génétique(s) ou encore par mutation(s)) qui établit une cascade d'aberrations intracellulaires à finalité cancéreuse.

4. Des mutations génèrent un dysfonctionnement du cycle cellulaire, cause et/ou conséquence de l'instabilité

D'un point de vue mécanistique, la mutation d'effecteurs régulant des points clé du cycle cellulaire va générer des erreurs ou aberrations lors de son exécution, résultant in fine en un caryotype biaisé. De façon intéressante, le dysfonctionnement de protéines kinases apparaît très souvent associé à l'aneuploïdie (Fleuren et al., 2016).

-Les activités kinases anormales au niveau du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC; *Spindle Assembly Checkpoint*) peuvent causer une aneuploïdie chez l'humain (Hanks et al., 2004; Matsuura et al., 2006; Snape et al., 2011). Les défauts à ce niveau peuvent provoquer un passage brusque de la métaphase à l'anaphase malgré la présence de kinétochores libres, ce qui se traduit par un gain ou une perte de chromosomes dans les cellules filles (Figure 15 a). La déficience du SAC peut résulter de la mutation des composants clé du SAC ou d'une modification de leur expression et de leur élimination. Des mutations de la kinase BUBR1 ont été identifiées au niveau germinale chez les patients atteints du syndrome

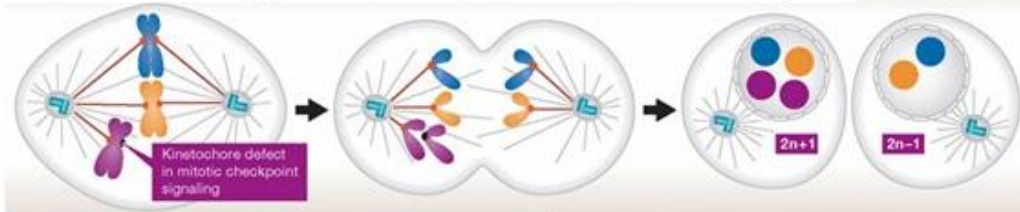
d'aneuploïdie en mosaïque (MVA ; *Mosaic variegated aneuploidy*). Les kinases Aurora sont surexprimées dans de nombreux cancers et leur expression ectopique génère des cellules polyploïdes avec de multiples centrosomes (Yeung et al., 2008).

-Pendant la mitose, des défauts dans les composants de la machinerie moléculaire qui maintient les chromatides sœurs attachées (séparase, cohésine, sécurine) peuvent contribuer aussi à l'aneuploïdie (Figure 15 b). Les kinases et enzymes mitotiques dérégulées génèrent des défauts de cohésion ou une incapacité à séparer les chromatides sœurs. (Barber et al., 2008). Par exemple, une étude récente qui a identifié des délétions ou des mutations inactivantes du gène STAG2 (nommé aussi SA2) dans une diversité de tumeurs primaires aneuploïdes et de lignées cellulaires cancéreuses humaines a confirmé cette idée (Solomon et al., 2011).

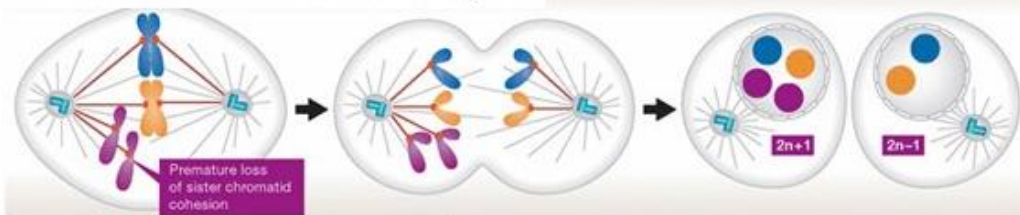
-Le dysfonctionnement de kinases mitotiques peut générer des fuseaux multipolaires, tel est le cas pour Aurora A, Aurora B (Cheng et al., 2008), Plk1 (Takahashi et al., 2003) et Nek9 (Nam et al., 2015). Les fuseaux multipolaires provenant de multiples centrosomes n'empêchent pas la cellule de subir une division, mais en conséquence provoquent souvent des attachements mérotéliques et une aneuploïdie (Figure 15 c) (Brinkley, 2001; Silkworth et al., 2009). L'amplification des centrosomes survient dans les tumeurs humaines primaires et est fortement corrélée avec les CIN (Instabilité chromosomique) (Nigg, 2006).

-Attachement très stable du fuseau mitotique - Les défauts d'attachements mérotéliques (un attachement très stable) lors de la mitose se traduisent souvent par des ségrégations biaisées (partielles ou tardives) ce qui cause une aneuploïdie (Cimini, 2008). Les défauts mérotéliques résultent d'une augmentation du nombre des centrosomes et/ou d'une stabilité accrue des attachements kinétochore-microtubule (Figure 15 d) (Bakhoum et al., 2009; Ganem et al., 2009). Les cellules cancéreuses montrent également une fréquence élevée des attachements mérotéliques (Cimini, 2008). Par exemple, une surexpression de la kinase mitotique Mps1 a été montrée dans le développement du cancer du côlon (Zhang et al., 2016). Egalement, la surexpression du MAD2 hyperstabilise les attachements du kinétochore-microtubule indépendamment du point de contrôle mitotique, expliquant comment des niveaux plus élevés de MAD2 peuvent causer des CIN dans les tumeurs (Sotillo et al., 2010).

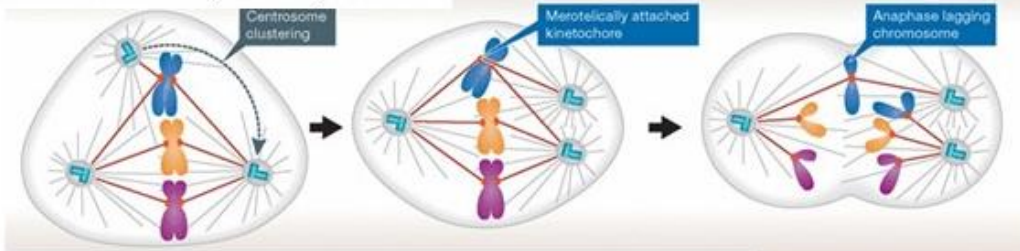
a. Défauts dans la signalisation des points de contrôle mitotiques



b. Défauts de cohésion chromosomique.



c. Fuseau mitotique multipolaire.



d. Attachement hyper-stables de kinétochore-microtubule.

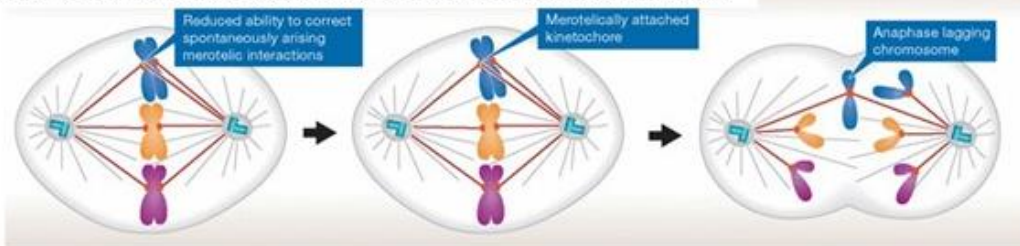


Figure 15. Chemins vers l'aneuploïdie. Il existe plusieurs voies par lesquelles une cellule peut gagner ou perdre des chromosomes pendant la mitose. (Holland and Don W Cleveland 2012)

5. Le kinome fait l'objet d'importantes études pharmaceutiques

La dérégulation des protéines kinases est observée dans une variété de pathologies cancéreuses et non cancéreuses, tel que le diabète et les troubles auto-immunes, cardiovasculaires, inflammatoires et nerveux. Ainsi, les protéines kinases représentent des cibles d'intérêt pharmaceutique potentiel pour un large panel d'états physiopathologiques. De fait, les universités et les entreprises commerciales ont déployé des efforts considérables pour déterminer les fonctions physiologiques et pathologiques des voies de transduction du signal protéine kinase au cours des 45 dernières années (Roskoski, 2016).

Une vue d'ensemble de l'état du développement thérapeutique des kinases est illustrée dans la (Figure 16).

6. Des inhibiteurs de kinase anti-cancéreux sont en cours de développement

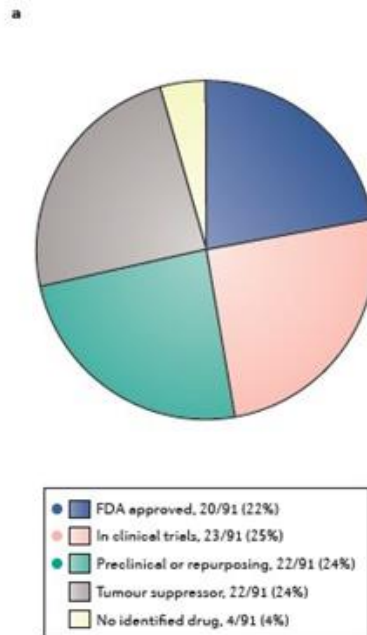
Il existe différents traitements pour chaque cancer et à chaque stade de la maladie. Parmi les plus courants figurent : la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie.

La chimiothérapie est un traitement du cancer consistant à administrer des médicaments qui tuent les cellules cancéreuses ou qui limitent leur croissance. Il existe deux types de chimiothérapie :

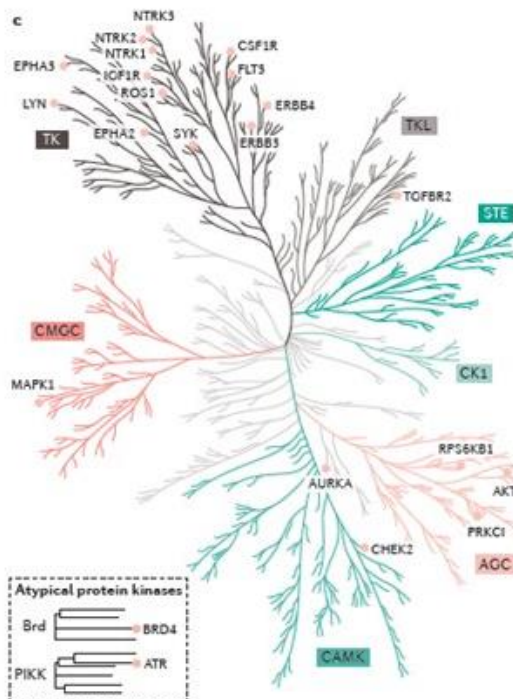
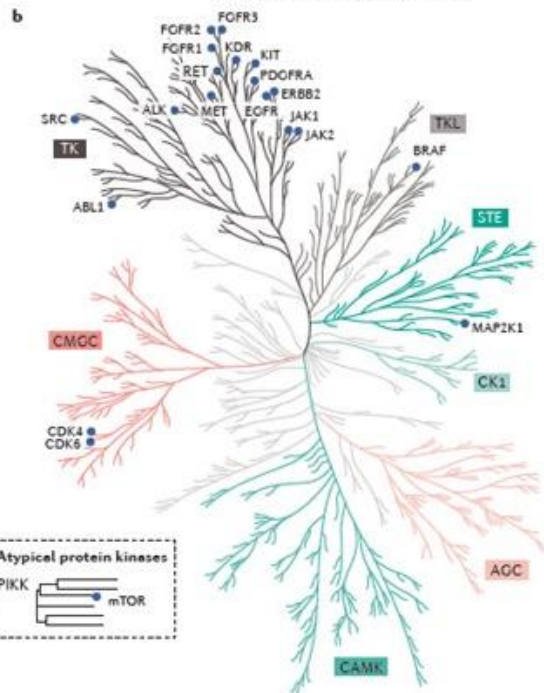
La chimiothérapie conventionnelle non ciblée implique l'administration d'agents induisant la mort des cellules cancéreuses par action directe ou indirecte. Ces agents ciblent soit l'ADN ou l'ARN (Agents intercalants ou les Alkylants), soit les protéines nécessaires à la division cellulaire. Ces médicaments sont des molécules toxiques à faible sélectivité. Ces médicaments sont souvent efficaces à court terme mais provoquent des effets secondaires graves. Par exemple, la Doxorubicine est un agent modificateur de la structure ADN par inhibition des topoisomérases I et II. Le paclitaxel, membre de la famille des Taxanes, inhibe quant à lui, la dépolymérisation des microtubules.

La chimiothérapie ciblée est en essor et résulte des progrès dans la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule cancéreuse. Son caractère ciblé lui octroie l'avantage de réduire les effets secondaires du traitement.

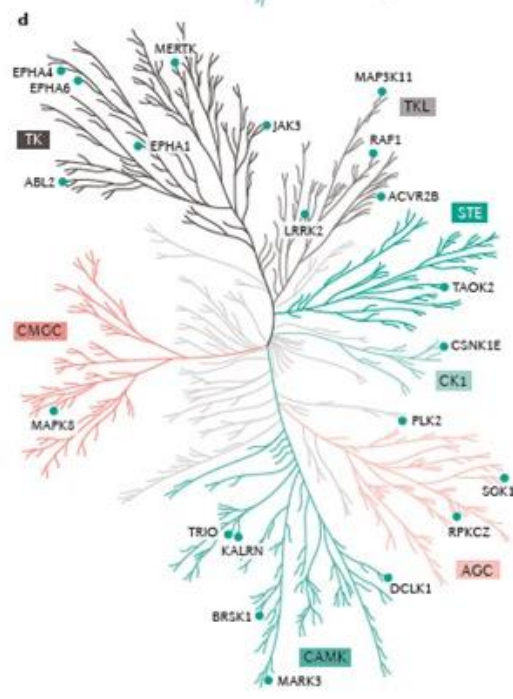
Proportion des kinases dans chaque catégorie de développement thérapeutique



Kinases ciblées par les thérapies approuvées (FDA) sur l'arbre du kinome



Inhibiteurs de kinases ou anticorps qui font actuellement l'objet d'essais cliniques chez des patients atteints de cancer,



Kinases potentielles visées par la réaffectation de thérapies ou de thérapies approuvées dans le cadre d'essais cliniques, ou qui sont visées par des thérapies en développement préclinique

Figure 16. Etat du développement thérapeutique des kinases
(Emmy D. G. Fleuren et al., 2016)

7. Les protéines kinase : cible principale de la chimiothérapie ciblée

Jusqu'à ce jour, plusieurs inhibiteurs de kinase chez l'humain ont été approuvés et commercialisés par la FDA. Actuellement 36 molécules sont approuvées pour l'usage chez l'homme (Figure 17.) (Wu et al., 2015)(FDA 2017). La plupart de ces molécules sont employées en oncologie et sont des inhibiteurs des tyrosines kinase (Levitzki, 2013). Imatinib a été le premier inhibiteur de tyrosine kinase approuvé par la FDA en 2001. C'est un inhibiteur de l'Abl kinase pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LCM) (Jemal et al., 2007) qui montre une efficacité élevée avec une faible toxicité par rapport aux chimiothérapies traditionnelles (Jemal et al., 2007).

Bien que les molécules sélectionnées soient en majorité des tyrosines kinase, au cours des dernières années, les inhibiteurs des Ser/Thr kinases sont en cours de développement. Par exemple, la sérine/thréonine kinase B-Raf, l'une des trois isoformes de la famille Raf, est une cible anticancéreuse très intéressante (Bollag et al., 2012). Vemurafénib (Zelboraf®, Roche), un inhibiteur du B-Raf, est utilisé depuis 2011 pour le traitement du mélanome métastatique et des tumeurs thyroïdiennes (Bollag et al., 2012). Puis, en 2013, le dabrafénib (Tafinlar®, GlaxoSmithKline) a été approuvé.

Actuellement, malgré leur efficacité, le développement d'inhibiteurs de kinases se trouve confronté à plusieurs défis :

En premier lieu, seul un petit sous-ensemble du kinome humain a été étudié. La plupart des efforts d'inhibition des kinases se limitent à un groupe sélectionné appartenant au groupe des tyrosine-kinases. Il apparaît donc nécessaire de développer l'étude d'un panel plus vaste de kinases.

D'autre part, de nombreux inhibiteurs actuels de kinases ont été développés à partir de composés approuvés précédemment qui sont en nombre limité, ce qui se traduit clairement par le nombre réduit des molécules approuvées.

D'ailleurs, la plupart des inhibiteurs fonctionnent comme des inhibiteurs réversibles qui se lient dans la poche de liaison de l'ATP et, en raison de la similarité élevée des séquences autour des poches de kinases se liant à l'ATP, cela a été une tâche difficile de mettre au point des inhibiteurs de kinases ayant une inhibition puissante contre les cibles souhaitées et des interactions minimales avec les cibles non visées.

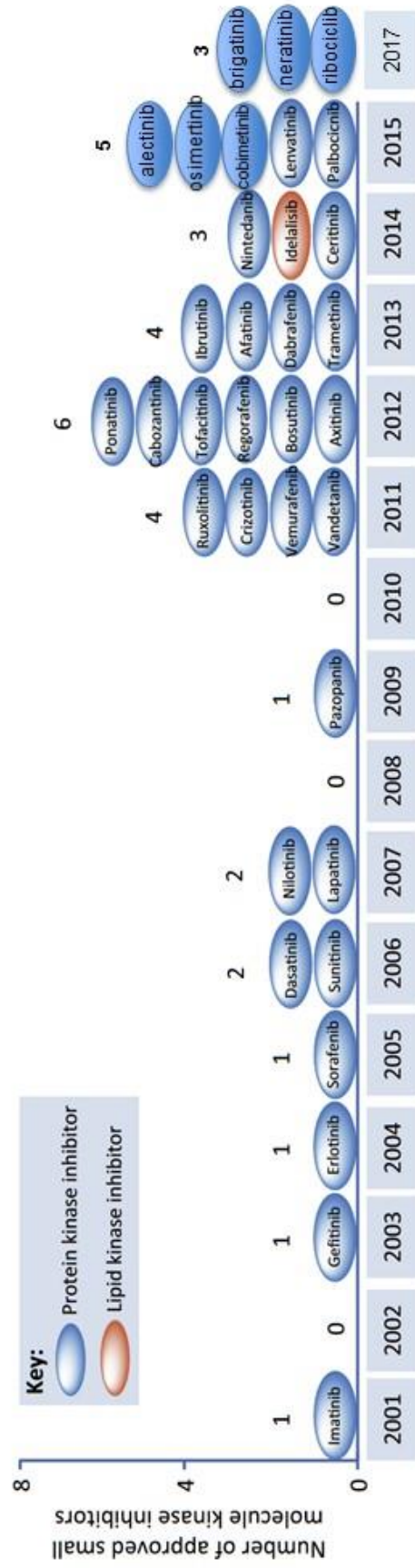


Figure 17. Les petites molécules inhibitrices de kinases approuvées par la FDA, (Extrait et miss a jour de Wu et al, 2015, FDA 2017)

Étroitement liés au point précédent, un grand nombre d'inhibiteurs interagissent avec plus d'une cible. En revanche, il existe peu d'inhibiteurs sélectifs absolus, qui pourraient être évalués comme inhibiteurs à double ou multiple cible si un test de dépistage plus complet pouvait être utilisé.

8. Les inhibiteurs de kinases validés ou en cours de développement

Les inhibiteurs de type I se lient à la protéine kinase sous forme conformationnelle active (*DFG-Asp in*, *C-helix in*). Les inhibiteurs de type I^{1/2} se lient à un motif DFG-Asp en conformation active tandis que les inhibiteurs de type II se lient à un DFG-Asp en conformation inactive. Les inhibiteurs de type I, I^{1/2} et II se fixent dans la poche de liaison à l'ATP via des liaisons de type hydrogène avec la région charnière reliant les petits et les grands lobes de l'enzyme. Les inhibiteurs de type III, d'une nature allostérique, se lient à un site adjacent à la poche de liaison à l'ATP. Les inhibiteurs de type IV, qui sont purement allostériques, se lient à une poche éloignée d'ATP. Les inhibiteurs de type V se lient à deux régions différentes du domaine des protéines kinases et sont donc des inhibiteurs bivalents. Les derniers sont les inhibiteurs de type VI qui se lient de façon covalente à leurs enzymes cible. (Roskoski, 2016).

9. Haspine est une kinase prometteuse dans le champ de la chimiothérapie anti-cancéreuse

Un nombre croissant d'études désigne Haspine comme une cible thérapeutique potentielle sérieuse en oncologie. La protéine kinase Haspine est surexprimée dans certaines tumeurs malignes, tel le lymphome de Burkitt et les leucémies lymphoïdes chroniques. (Rosenwald et al., 2001). Haspine a récemment été identifiée comme l'une des kinases les plus surexprimées dans un test d'ARNi sur kinome entier, conjointement avec Plk1, dont l'appauvrissement a diminué la viabilité cellulaire et l'activité transcriptionnelle des récepteurs des œstrogènes dans les cellules du cancer du sein MCF7 (Bhola et al., 2015). Les études en modélisation indiquent également que la kinase atypique Haspine présente des particularités structurales par rapport aux autres kinases en faveur du développement d'inhibiteurs spécifiques pour cette kinase (Cf chapitre ouvrage Feizbakhsh et al. 2017).

Résultats

I. Article 1:

The protein kinase Haspin is required for spindle pole integrity as a negative regulator of nucleation

Omid Feizbakhsh¹, Xavier Fant¹, Nathalie Desban¹, Jonathan Elie², Blandine Baratte¹, Jérôme Martin³, Frédéric Buron², Sylvain Routier² and Sandrine Ruchaud¹

¹ Sorbonne Universities, UPMC Univ Paris 06, CNRS USR 3151, Protein Phosphorylation & Human Diseases, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff Cedex F-29688, France

² Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, BP 6759, 45067, Orléans Cedex 2, France

³ Hôpital Privé des Cotes d'Armor - Groupe CARIO, Faculté de médecine de Brest, Plérin, Brittany, France

Résumé de l'article 1

La protéine Haspine est une serine/thréonine kinase atypique décrite pour la première fois chez la souris comme : ***Haploide germ cell-specific nuclear protein kinase***. Haspine est localisée sur les chromosomes en cours de mitose ainsi que sur les centrosomes et le fuseau mitotique. Elle phosphoryle la thréonine 3 de Histone H3 de la prophase jusqu'en début d'anaphase et, ainsi, permet le recrutement de la kinase Aurora B via le complexe des protéines passagères (CPC) au niveau des centromères. L'accumulation du CPC aux centromères entraîne la sur-activation d'Aurora B dont une des fonctions est de corriger les liaisons incorrectes entre les kinétochores et les microtubules. La protéine Haspine joue ainsi un rôle essentiel dans l'alignement des chromosomes, le maintien de la cohésion des centromères et du fuseau mitotique. Malgré son rôle important dans la division cellulaire, la connaissance de son activité reste limitée à la phosphorylation de la Thr3 de l'Histone H3 pendant les premières phases de la mitose.

La première partie de mes travaux a consisté à préciser les fonctions de l'Haspine dans la cellule en mitose.

Dans ce contexte, les cellules U-2 OS (lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome) ont été utilisées comme modèle principal de la recherche. Nous avons étudié les conséquences de la déplétion de l'Haspine par siARN sur le déroulement séquentiel

du processus mitotique. Nous avons, dans un premier temps, confirmé que la déplétion de l'Haspine est cause d'erreurs d'alignement des chromosomes, ainsi que de problèmes au niveau des fuseaux mitotiques et de l'intégrité centrosomique. Parallèlement, nous avons traité les cellules avec un inhibiteur spécifique de l'activité Haspine, caractérisé au sein de notre laboratoire (voir Article 2), et avons ainsi montré que l'activité kinase de l'Haspine était nécessaire à l'alignement des chromosomes et à l'intégrité des centrosomes et du fuseau.

Afin de mieux comprendre de problème d'intégrité des centrosomes en absence de Haspine, un test de nucléation des microtubules a été effectué. De façon surprenante, les résultats ont montré que l'Haspine est un régulateur négatif de la nucléation des microtubules pendant la mitose. D'autre part, des expériences de double déplétion de l'Haspine et d'Aurora B ainsi que l'expression d'une protéine d'ancrage centromérique pour Aurora B en absence d'Haspine (fusion CENP-B:INCENP) nous ont permis de conclure que les défauts d'intégrité des centrosomes en absence d'Haspine ne sont pas lié à l'activité d'Aurora B.

Ces résultats suggèrent l'existence d'autres fonctions potentielles de Haspine, notamment au niveau des centrosomes. Ainsi, nous avons cherché d'autres substrats et avons identifié Nek9 (*NIMA-related protein kinase 9*) que nous avons validé comme substrat de Haspine *in vitro*. Nek9 est impliquée dans la maturation et la séparation des centrosomes ainsi que dans l'organisation du fuseau et la nucléation des microtubules par phosphorylation de NEDD1. En procédant à une double déplétion de Nek9 et de l'Haspine, nous avons montré une franche diminution des centrosomes ectopiques en comparaison à une déplétion de l'Haspine seule. Ces derniers résultats suggèrent que Nek9 possède une fonction antagoniste à celle de l'Haspine au niveau des centrosomes.

The protein kinase Haspin is required for spindle pole integrity as a negative regulator of nucleation

Omid Feizbakhsh¹, Xavier Fant¹, Nathalie Desban¹, Jonathan Elie², Blandine Baratte¹, Jérôme Martin³, Frédéric Buron², Sylvain Routier² and Sandrine Ruchaud¹

¹ Sorbonne Universities, UPMC Univ Paris 06, CNRS USR 3151, Protein Phosphorylation & Human Diseases, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff Cedex F-29688, France

² Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, BP 6759, 45067, Orléans Cedex 2, France

³ Hôpital Privé des Cotes d'Armor - Groupe CARIO, Faculté de médecine de Brest, Plérin, Brittany, France

Correspondence should be addressed to:

Sandrine Ruchaud: Sorbonne Universities, UPMC Univ Paris 06, CNRS USR 3151, Protein Phosphorylation & Human Diseases, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff Cedex F-29688, France (sruchaud@sb-roscoff.fr; tel. +33.(0)2.98.29.23.09)

ABSTRACT

Haspin is a key mitotic kinase localizing at spindle poles, chromosomes and centromere where it recruits Aurora B. Using immuno-staining, we confirmed that Haspin is required for chromosome alignment and centrosome integrity. Use of a specific Haspin inhibitor, we recently developed, showed that centrosome integrity is dependent on Haspin kinase activity. We further show that this phenotype is independent of Aurora B function. Moreover, we show that Haspin acts as negative regulator of microtubule nucleation. To further understand the role of Haspin in microtubule nucleation, we searched for new substrate using a protein chip. We identified several candidates amongst which the microtubule nucleation effector Nima kinase Nek9. We confirmed that Nek 9 is a Haspin substrate *in vitro*. We further show that Nek9 depletion partly rescues Haspin depletion phenotype suggesting that Haspin has an antagonizing role to Nek9.

INTRODUCTION

The sequential coordination of the different phases of mitosis is tightly regulated by essential kinases of which expression and activity are found deregulated in many cancers (Li and Li, 2006; Malumbres and Barbacid, 2009). Cyclin-dependent kinase-1 (Cdk1) and Polo-like kinase 1 (Plk1) cooperate to regulate mitotic entry (Lindqvist et al., 2009) and Plk1, together with Aurora B, is subsequently essential for initiating bipolar spindle formation (Lénárt et al., 2007; Petronczki et al., 2008; Sumara et al., 2004; Sunkel and Glover, 1988). Later on, they act to ensure proper spindle stability, chromosome congression and bi-orientation (Carmenta et al., 2009; Hümmer and Mayer, 2009; Petronczki et al., 2008; Ruchaud et al., 2007). Aurora B kinase regulates many aspects of mitosis ranging from chromosome and spindle structure to the correction of kinetochore-microtubule attachment errors, regulation of mitotic progression and completion of cytokinesis (Ruchaud et al., 2007; Vader et al., 2006; Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Aurora B is part of the chromosomal passenger complex (CPC) composed of INCENP (Adams et al., 2000; Cooke et al., 1987; Terada et al., 1998), Survivin and Borealin/Dasra B (Gassmann et al., 2004; Honda et al., 2003; Klein et al., 2006; Sampath et al., 2004). Aurora B centromeric localization and activation is under the control of several protein kinases such as Haspin and Bub1 (Storchová et al., 2011; Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). Haspin-mediated phosphorylation of H3T3 and Bub1-mediated H2AS121 are two histone modifications responsible for Aurora B recruitment at centromeres. H3T3p stands as an anchorage for the conserved BIR domain of Survivin and, H2AS121p is a binding site for Shugoshin bridging the CPC to centromere (Kelly et al., 2010; Wang et al., 2011; Yamagishi et al., 2010).

Haspin protein is an atypical serine/threonine kinase mainly localized on chromosomes, spindle poles and emanating spindle microtubules during mitosis (Dai et al., 2005; Tanaka et al., 1999). Haspin depletion by siRNA or inhibition of its activity causes chromosome alignment and spindle defects as well as premature loss of chromatid cohesion during early mitosis (Dai and Higgins, 2005; Dai et al., 2006). Haspin is recruited onto centromeric chromatin via two distinct interactions: with the cohesin-related protein Pds5B and with SUMOylated C-terminal domain of Topoisomerase II α (Carretero et al., 2013; Edgerton et al., 2016; Yamagishi et al., 2010; Yoshida et al., 2016).

During prophase and prometaphase sister chromatids resolution occurs through cohesion release upon binding of Wapl protein to Pds5B. Haspin interaction with Pds5B inhibits Wapl binding, preventing centromeric cohesion loss until anaphase onset (Zhou et al., 2017). Moreover, Haspin depletion induces loss of centrosomal integrity, a phenotype partially linked with chromatid cohesion defects (Dai et al., 2009). However, Haspin localization to centrosomes has not been correlated to any functions or specific substrates so far. This prompted us to further examine the effect of Haspin depletion during early mitosis.

In this study we report that Haspin is a negative regulator of microtubule nucleation and is required for centrosome integrity independently of Aurora B function. In addition, we identified the microtubule nucleation effector Nima kinase Nek9 as a new Haspin substrate *in vitro*. We further show that loss of centrosome integrity in Haspin-depleted cells is antagonized by Nek9 depletion.

RESULTS

Haspin kinase is required for both chromosome alignment and spindle poles integrity

In order to analyze Haspin function during mitosis, we performed siRNA depletion experiments on U-2 OS cells. As reported previously, depletion of Haspin triggered severe defects in chromosome alignment as shown in Figure 1A, with more than 40% of early mitotic cells showing mis-aligned chromosomes (Dai et al. 2006)(Fig. 1E). This phenotype was accompanied by a slightly increased mitotic index (from 4% for control cells to 6% for depleted cells) and early mitosis delays shown by an accumulation of early mitotic cells and a decrease in late mitotic cells (Fig. S 1B). Video microscopy experiments showed an increased length of mitosis extending from around 1h for control cells to up to 7h in depleted cells (Mov. M1 and M2 and Fig. S1B). In order to validate the specificity of our siRNA we conducted rescue experiments on a stable U-2 OS cell line expressing a siRNA-resistant GFP:Haspin (GFP:HaspinSil) under a Tet-on promoter. We verified the proper activity and resistance to siRNA of GFP:HaspinSil by measuring and comparing H3T3p fluorescence signal over DAPI in wild type U-2 OS and GFP:HaspinSil cells transfected with Haspin siRNA (Fig. 1D). Although Haspin activity in GFP:HaspinSil cells was slightly increased due to overexpression after doxycyclin addition compared to control; activity levels similar to control were observed upon depletion of the endogenous protein. These results confirmed the functionality of our rescue both in terms of activity and resistance to siRNA. Chromosome alignment defects observed in Haspin depleted cells were totally rescued by the expression of GFP:HaspinSil (Fig. 1E and S1C).

Another striking observed phenotype in Haspin-depleted cells was the presence of extra spindle poles and loss of pole definition or what appeared to be centrosome

splitting accompanied with disorganized spindles (Fig. 1A and B, white arrowheads). Quantification of these defects showed that 32% of early mitotic Haspin-depleted cells had more than 2 microtubules organizing centers (MTOCs) (Fig. 1F). These effects were reversed to normal by the expression of GFP:HaspinSil rescue construct (Fig. 1F).

Similar results were obtained on cells treated with the specific Haspin inhibitor, JE255, we recently characterized (Elie et al. in progress) (Fig. 1C, E and F). After 24h of treatment we observed 24% of early mitotic cells bearing misaligned chromosomes and 17 % with more than 2 MTOCs. These later results indicate that both observed phenotypes are linked to Haspin activity and are not the result of a structural Haspin function. Therefore, our results confirmed that Haspin is required for chromosome alignment and spindle poles integrity as previously reported by Dai et al. (Dai et al., 2009) and we further show that Haspine kinase activity is needed for both.

Haspin is a negative regulator of microtubule nucleation

In order to assess nucleation properties of the ectopic MTOCs in Haspin-depleted cells, we performed a microtubules regrowth assay after cold-induced microtubule depolymerization (Fig. 2A). After 30s regrowth, Haspin depleted cells clearly displayed an increased number of nucleating MTOCs as showed by α -Tubulin staining (Fig. 2A). Unexpectedly, Haspin depleted cells harbored decreased levels of Pericentrin at centrosomes foci compared to control cells. Fluorescence signals measured at each MTOCs showed that Pericentrin was decreased by a factor of 7 when compared to the control cells (Fig. 2B). Furthermore, and much surprisingly, we noticed a marked increase in α -Tubulin present in the asters. Quantification at each MTOCs showed that α -Tubulin signal was 4.5 times higher than at control cells MTOCs. These

quantifications recounted as "per cells" showed that the observed dissimilarities were persistent with a 2.7 times decrease in Pericentrin levels and a 6 times increase in α -Tubulin signal at nucleating MTOCs of Haspin depleted cells compared with control cells (Fig. S2B).

Furthermore, we observed microtubule nucleation in the vicinity of chromosomes in 30% of Haspin depleted cells after 30s regrowth and none in the control cells implying that Haspin is also involved in the regulation of this process (see Fig. 2C).

Co-staining of Centrin and Pericentrin showed that ectopic MTOCs in Haspin-depleted cells were acentriolar as shown by the presence of only two sets of double Centrin spots per cell and no Centrin staining on extra MTOCs stained by Pericentrin, as previously described (Dai et al., 2009)(Fig. 2D). Taken together, our results suggest that Haspin is a negative regulator of microtubule nucleation both at ectopic MTOCs and chromosomes/kinetochores.

Haspin kinase requirement for centrosome integrity/stability is independent of Aurora B function

Haspin main reported functions are CPC recruitment to chromosomes and centromeres accumulation via phosphorylation of Histone H3 on threonine 3 and sister chromatids cohesion in early mitosis (ref). CPC gathering on chromosomes triggers Aurora B activation (ref). In order to test Aurora B involvement in the observed phenotypes we conducted a comparison of Haspin and Aurora B depletion by siRNA (Fig. 3). As expected, Aurora B depletion as well as Haspin depletion both showed chromosome alignment defects (Fig. 3A) with 54% and 45% of late prometaphase/metaphase cells bearing misaligned chromosomes respectively (Fig.

3B). Double depletion of Aurora B and Haspin triggered a synergistic effect with 70% of cells with severe chromosome alignment defects. In opposition, when quantifying cells with more than 2 MTOCs, Aurora B depletion showed a much less pronounced phenotype when compared to Haspin depletion (8% and 28% respectively) (Fig. 3C). Double depletion gave a result similar to Haspin depletion alone with 27% cells with more than 2 MTOCs. These results suggested that Haspin involvement in centrosome stability is partly independent of Aurora B.

Haspin kinase requirement for centrosome integrity is independent of H3T3ph and Aurora B localization

Haspin and Aurora B are involved in a positive feedback loop at centromeres (Wang et al., 2011); Aurora B phosphorylates and activates Haspin while the latter phosphorylates H3T3, a histone hallmark in part responsible for the recruitment and activation of Aurora B at centromeres (Yamagishi et al., 2010). Haspin depletion therefore impairs CPC localization and Aurora B activation. In order to dissociate Aurora B localization and activation from Haspin activity we transiently expressed an INCENP chimera fused to CENP-B centromere targeting domain (Pluta et al., 1992) allowing us to bypass the need for Haspin phosphorylation of H3T3 to bring the CPC to centromeres and maintain Aurora B activity in the absence of Haspin. Co-staining of Centrin and Pericentrin allowed us to distinguish cells with ectopic MTOCs from multipolar cells (Fig. 4A). We compared the effect of Haspin depletion in presence or absence of CenpB:Incenp chimera quantifying chromosome misalignment, cells with multiple ectopic MTOCs and multipolar cells. Quantification of early mitotic cells bearing misaligned chromosomes indicated that the expression of the chimeric protein induced defects in microtubule/kinetochore attachment in 37% of cells (Fig. 4B). This probably resulted partly from an excess Aurora B activity at centromeres as shown by

increased phosphorylation levels of CENP-A on Ser-7 (x3 compared to control), a known centromeric Aurora B substrate (Fig. 4D, lane 2)(Zeitlin et al., 2001). A slight increase in the multi-MTOCs phenotype was observed in Haspin depleted cells expressing CenpB:Incenp when compared to Haspin siRNA alone, 60% versus 55% respectively. When comparing the numbers of ectopic MTOCs in Haspin depleted cells expressing or not CenpB:Incenp, we observed no significant differences (36% versus 40% respectively). Beside, we showed that Aurora B activity was restored by CenpB:Incenp expression (Fig. 4D, lane 4). Taken together, these results confirmed that the loss of Aurora B activity in Haspin-depleted cells is not responsible for the spindle pole defects observed and that Haspin kinase requirement for centrosome integrity is independent of H3T3p and Aurora B localization and activation.

Nek9 is a new centrosomal Haspin substrate

Our data led us to the hypothesis that Haspin may have a centrosomal function linked with its activity. In order to identify new Haspin substrates we used protein chips from Invitrogen (9000 proteins) on which we performed kinase assays comparing active Haspin kinase domain (aa470-798) to an inactive kinase dead counterpart (Haspin KD) (Fig. 5A). We identified 7 substrates (see list on Fig. S4) amongst which the NIMA-related protein kinase 9 (Nek9) appeared as an interesting candidate (Fig. 5A). In order to confirm the chip results, we performed a Haspin kinase assay on heat-inactivated Nek9 protein, avoiding strong autophosphorylation of Nek9 (Fig. 5B). Clear phosphorylation of Nek9 by Haspin was observed (lane 2 and 4) while a slight Nek9 autophosphorylation signal remains (see lane 1). Thus, our results confirm that Nek9 is a new *in vitro* Haspin substrate.

Loss of MTOCs integrity in Haspin-depleted cells is antagonized by Nek9 depletion

Nek9 is a centrosomal protein kinase involved in mitotic spindle dynamics and chromosome segregation with essential centrosome function (Bertran et al., 2011; Roig et al., 2002, 2005). Nek9 is a positive regulator of nucleation at centrosome (Sdelci et al., 2012). In order to study the relationship between Haspin and Nek9, we performed single and double depletion experiments for Haspin and Nek9. We measured chromosome alignment defect and quantified cells with multiple MTOCs (Fig. 6A). Little chromosome alignment defects were observed in Nek9 depleted cells compared to Haspin depletion (12 versus 44% respectively). Double depletion showed similar results to simple Haspin depletion (42%). Interestingly, double depletion of both Haspin and Nek9 showed a clear reduction in cells with more than 2 MTOCs compared to Haspin depletion alone (12% versus 38% respectively) (Fig. 6B). These results showed that loss of centrosomes integrity in Haspin depleted cells is antagonized by Nek9 depletion, suggesting that both proteins have opposite functions in microtubule nucleation process.

DISCUSSION

Our data suggest that Haspin is required for centrosome and spindle integrity that is independent from Aurora B activity. They also suggest that Haspin is negatively regulating microtubule nucleation from both MTOCs and chromosomes. We further show that Nek9 is phosphorylated by Haspin *in vitro* and our data suggest that the two proteins have opposite functions in the microtubule nucleation process.

Loss of spindle pole integrity in early mitosis has been attributed to defect in chromosome cohesion (Dai et al., 2009). Premature loss of chromatid cohesion in Haspin-depleted cells has been reported to be partly responsible for the induction of ectopic MTOCs. However, chromosome cohesion in early mitosis is under the control of Aurora B kinase activity through Sororin phosphorylation preventing its binding to the cohesin subunit Pds5A (Giménez-Abián et al., 2004; Nishiyama et al., 2010, 2013; Shintomi and Hirano, 2009). Here we show that the ectopic MTOCs in Haspin-depleted cells are mainly independent of Aurora B activity therefore suggesting that this phenotype is not just a consequence of impaired chromosome cohesion.

Mitotic spindle establishment and maintenance is finely regulated and results in the balanced coordination of three microtubule-nucleating pathways depending on centrosomes, chromatin and microtubules themselves (Prosser and Pelletier, 2017). Our results show that Haspin depletion impairs this equilibrium generating ectopic MTOCs. The use of a specific Haspin inhibitor showed that this Haspin depletion phenotype is linked to its kinase activity and not to a structural function such as binding to Pds5B via its N-terminus domain protecting centromeric cohesion (Zhou et al., 2017).

Pericentrin is part of the γ -TuRC centrosome-anchoring complex from where

microtubule nucleation is initiated (Raynaud-Messina and Merdes, 2007; Zheng et al., 1995). As previously described, we didn't observe significant changes in γ -Tubulin levels at MTOCs of Haspin-depleted cells (Dai et al., 2009)(data not shown). However we saw a clear decrease in cell Pericentrin levels (Fig. S2B) and notably at main centrosome foci, indicating a change in centrosome composition in Haspin-depleted cells. Concomitantly, in those cells, we observed an increase in microtubule nucleation ability suggesting that Haspin may have negative regulatory functions. Excessive nucleation in Haspin-depleted cells could account for the observed spindle defects and ectopic MTOCs. One could have expected a diminution in microtubule nucleation upon Pericentrin decrease; hence, our results presuppose that Haspin may have a role in the stability regulation of microtubule fibers emanating from MTOCs. It has been shown that microtubules can be nucleated from mitotic chromosomes, in a Ran-GTP and γ -Tubulin dependent manner (Mahoney et al., 2006; Prosser and Pelletier, 2017; Wilde and Zheng, 1999). We could observe clear chromosome nucleation in Haspin-depleted cells while none was detectable in control cells where nucleation was dominant at centrosomes. Hence, the role of Haspin in negative stability regulation of nucleation extends to chromosome nucleation in our model system. A full network of proteins, also called the "mesh", is involved in microtubule fibers stability such as Clathrin or the microtubule connector protein TACC3 (for review see (Booth et al., 2011; Nixon et al., 2015). Whether and how Haspin is interacting with the "mesh" remains to be determined.

The fact that the ectopic MTOCs phenotype is not linked to Aurora B activity nor to its recruitment at centromeres via H3T3 phosphorylation and its association to Haspin kinase activity prompted us to look for other Haspin substrates. We have identified Nek9, a NIMA-family kinase, as a new Haspin substrate *in vitro*. Besides, we have

verified that Haspin was not a substrate for Nek9 (data not shown). Nek9 is required for mitotic progression, centrosome separation and maturation and spindle organization (Bertran et al., 2011; Roig et al., 2002, 2005). Nek9 has been also shown to be required for microtubule nucleation through the phosphorylation of the γ -TuRC targeting factor GCP-WD/NEDD1 (Sdelci et al., 2012). It is therefore considered as a positive regulator of nucleation. Our data suggest that Haspin and Nek9 have opposite functions in microtubule nucleation strengthening our supposition that Haspin may be a negative regulator of nucleation. It is to be noted that Haspin and Nek9 are both activated by the Cdk1/Plk1 duo; therefore, they are part of the same signaling cascade at mitosis entry (Bertran et al., 2011; Ghenoïu et al., 2013; Moutinho-Santos and Maiato, 2014; Sdelci et al., 2012; Zhou et al., 2014). Whether Haspin acts upstream of Nek9 and regulates its activity *in vivo* remains to be determined.

In summary we described a novel function of Haspin kinase in the negative control of microtubule nucleation during early mitosis and uncovered Nek9 as a putative Haspin target substrate.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture and siRNA transfection

U-2 OS cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 50 IU penicillin and streptomycin, at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

Double-stranded siRNA oligomers were transfected into U-2 OS cells using nucleofection with the Neon system from Invitrogen, according to the manufacturer's instructions. Validated siRNAs targeting Haspin (SI00605241; GGCAUCUGAUGCUGAAAAGTT) were purchased from Ambion. Control depletion

was carried out using 'All star negative control' siRNA oligomers from Qiagen (UGGUUUACAUGUCGACUAA).

Microtubule regrowth assay

Cells grown on glass coverslips were transferred into pre-cooled medium on ice for 1h, then into pre-warmed medium at 37°C. Regrowth was stopped by methanol fixation.

Immunoblotting and antibodies

Whole cell lysates were prepared by lysing the cells in sample buffer. SDS-PAGE and immunoblotting were performed following standard procedures. Primary antibodies included mouse monoclonal anti- α -Tubulin antibody (B512; Sigma), rabbit monoclonal anti-H3 phospho-Thr 3 (Millipore), mouse monoclonal anti- β -Actin (Calbiochem), rabbit polyclonal anti-CenpA phospho-Ser7 (Novex), mouse monoclonal anti-Centrin (Millipore) and rabbit polyclonal anti-Pericentrin (Novus).

Indirect immunofluorescence microscopy

Cells grown on coverslips were fixed in 4% PFA /PBS buffer for 10 min and permeabilized in 0.15% Triton X-100 in PBS buffer for 2 min. After blocking in 1% BSA/PBS/0.05% Tween 20 for 1 h, cells were probed with the antibodies described above and slides mounted using Vectashield/DAPI (Vector laboratories). Image stacks were acquired with a Coolsnap HQ2 CCD camera (Photometrics) on a Zeiss Axio microscope (Carl Zeiss) using a 100x NA 1.40 objective. Image acquisition and processing were performed using Metamorph (Molecular Device). Deconvolution was performed using AutoQuant module in Metamorph. Quantification of signal intensity

was performed using ImageJ software (NIH). For immunofluorescence signal quantification of Histone H3T3p, prometaphase cells were imaged (n>11) and average projections of equal numbers of stacks were generated. H3T3p signal on chromosomes was normalized against the DAPI levels after background deduction.

Live cell imaging

For live cell imaging U-2 OS cells were seeded onto Lab-Tek II Chamber coverglass (Thermo Fisher Scientific). The chambers were transferred to the incubation chamber of a Zeiss Axio microscope (Carl Zeiss) and kept at 37°C in the presence of RPMI1640 medium without phenol red for 24h prior to imaging. Images were collected every 5 minutes with an Evolve, EM-CCD camera (Photometrics) controlled by Metamorph (Molecular Devices), using a 40x NA 1.40 objective.

Cloning and Site-directed mutagenesis

Cloning of Human Haspin kinase domain (Haspin aa 470 to 798) in pGex-6P-3 was previously described (Dago et al., 2015). Haspin point mutants, HaspinSil (resistant to Haspin siRNA) and HaspinKD (Kinase Dead, mutation aaD687A), were generated by site-directed mutagenesis (QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit from Stratagene) using the plasmid pEGFP:Haspin, pTRE tight_Haspin and pGex-6P-3_Haspin (aa470-798) as templates. The Cenp-B:Incenp construct was described in (Eckley et al., 1997).

Kinase assays

GST-tagged Haspin kinase domain (aa470-798) was expressed in *E-coli* BL21 strain. For proteins extraction, bacterial pellet was resuspended in lysis Buffer (PBS pH 7.5; 1% NP-40; 1 mM EDTA; 1 mM DTT) with the addition of protease inhibitors (inhibitor cocktail, Complete from Roche), pretreated with lysozyme (300 µg/ml final) and DNase I (500 units) for 30 min, followed by a short sonication then centrifugation. The clear lysate was incubated with Glutathione sepharose beads (High performance GE Healthcare) for 1 h at 4°C. Beads were washed three times with lysis buffer, three times with wash buffer (50 mM Tris A pH 8; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT) and finally two times with PBS pH 8. Protein was eluted from the beads using elution buffer (PBS pH 8.0; reduced glutathione 30 mM) at 4°C for 15 min under rotation. The eluted kinase was aliquoted and stored frozen at -80°C after addition of 15% glycerol.

Kinase assays were performed on Histone H3 in 100 mM MOPS pH=7, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 1% NP40, 0.4 mM ATP, and 1 µCi of [³²P]ATP. After 30 min at 30°C, reactions were stopped by the addition of SDS sample buffer. Samples were separated by SDS-PAGE, gels dried and phosphate incorporation determined by phosphorImager Typhoon (Amersham GE Healthcare).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Joan Roig for useful discussion and comment on this work. This work was supported by “La Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest” comity, (districts: 22, 29, 56 and 79), the ARC Fondation and Région Bretagne of which OF is a recipient.

REFERENCES

- Adams, R.R., Wheatley, S.P., Gouldsworthy, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D.L., and Earnshaw, W.C. (2000). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr. Biol. CB* 10, 1075–1078.
- Bertran, M.T., Sdelci, S., Regué, L., Avruch, J., Caelles, C., and Roig, J. (2011). Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *EMBO J.* 30, 2634–2647.
- Booth, D.G., Hood, F.E., Prior, I.A., and Royle, S.J. (2011). A TACC3/ch-TOG/clathrin complex stabilises kinetochore fibres by inter-microtubule bridging. *EMBO J.* 30, 906–919.
- Carretero, M., Ruiz-Torres, M., Rodríguez-Corsino, M., Barthelemy, I., and Losada, A. (2013). Pds5B is required for cohesion establishment and Aurora B accumulation at centromeres. *EMBO J.* 32, 2938–2949.
- Cooke, C.A., Heck, M.M., and Earnshaw, W.C. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J. Cell Biol.* 105, 2053–2067.
- Dago, C.D., Ambeu, C.N., Coulibaly, W.-K., Békro, Y.-A., Mamyrbékova, J., Defontaine, A., Baratte, B., Bach, S., Ruchaud, S., Guével, R.L., et al. (2015). Synthetic Development of New 3-(4-Arylmethylamino)butyl-5-arylidene-rhodanines under Microwave Irradiation and Their Effects on Tumor Cell Lines and against Protein Kinases. *Mol. Basel Switz.* 20, 12412–12435.
- Dai, J., and Higgins, J.M.G. (2005). Haspin: A Mitotic Histone Kinase Required for Metaphase Chromosome Alignment. *Cell Cycle* 4, 665–668.
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S.S., and Higgins, J.M.G. (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* 19, 472–488.
- Dai, J., Sullivan, B.A., and Higgins, J.M.G. (2006). Regulation of Mitotic Chromosome Cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev. Cell* 11, 741–750.

- Dai, J., Kateneva, A.V., and Higgins, J.M.G. (2009). Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J. Cell Sci.* **122**, 4168–4176.
- Eckley, D.M., Ainsztein, A.M., Mackay, A.M., Goldberg, I.G., and Earnshaw, W.C. (1997). Chromosomal proteins and cytokinesis: patterns of cleavage furrow formation and inner centromere protein positioning in mitotic heterokaryons and mid-anaphase cells. *J. Cell Biol.* **136**, 1169–1183.
- Edgerton, H., Johansson, M., Keifenheim, D., Mukherjee, S., Chacón, J.M., Bachant, J., Gardner, M.K., and Clarke, D.J. (2016). A noncatalytic function of the topoisomerase II CTD in Aurora B recruitment to inner centromeres during mitosis. *J. Cell Biol.* **213**, 651–664.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L., and Earnshaw, W.C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **166**, 179–191.
- Ghenoiu, C., Wheelock, M.S., and Funabiki, H. (2013). Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Mol. Cell* **52**.
- Giménez-Abián, J.F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Regulation of Sister Chromatid Cohesion between Chromosome Arms. *Curr. Biol.* **14**, 1187–1193.
- Honda, R., Körner, R., and Nigg, E.A. (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3325–3341.
- Kelly, A.E., Ghenoiu, C., Xue, J.Z., Zierhut, C., Kimura, H., and Funabiki, H. (2010). Survivin Reads Phosphorylated Histone H3 Threonine 3 to Activate the Mitotic Kinase Aurora B. *Science* **330**, 235–239.
- Klein, U.R., Nigg, E.A., and Gruneberg, U. (2006). Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2547–2558.
- Li, J.J., and Li, S.A. (2006). Mitotic kinases: the key to duplication, segregation, and

- cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol. Ther.* **111**, 974–984.
- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., and Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J. Cell Biol.* **185**, 193–202.
- Mahoney, N.M., Goshima, G., Douglass, A.D., and Vale, R.D. (2006). Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Curr. Biol. CB* **16**, 564–569.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153–166.
- Moutinho-Santos, T., and Maiato, H. (2014). Plk1 puts a (Has)pin on the mitotic histone code. *EMBO Rep.* **15**, 203–204.
- Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A.A., Mechtler, K., et al. (2010). Sororin Mediates Sister Chromatid Cohesion by Antagonizing Wapl. *Cell* **143**, 737–749.
- Nishiyama, T., Sykora, M.M., Huis in 't Veld, P.J., Mechtler, K., and Peters, J.-M. (2013). Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13404–13409.
- Nixon, F.M., Gutiérrez-Caballero, C., Hood, F.E., Booth, D.G., Prior, I.A., and Royle, S.J. (2015). The mesh is a network of microtubule connectors that stabilizes individual kinetochore fibers of the mitotic spindle. *ELife* **4**.
- Pluta, A.F., Saitoh, N., Goldberg, I., and Earnshaw, W.C. (1992). Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere. *J. Cell Biol.* **116**, 1081–1093.
- Prosser, S.L., and Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 187–201.
- Raynaud-Messina, B., and Merdes, A. (2007). Gamma-tubulin complexes and microtubule organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 24–30.

- Roig, J., Mikhailov, A., Belham, C., and Avruch, J. (2002). Nercc1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes Dev.* 16, 1640–1658.
- Roig, J., Groen, A., Caldwell, J., and Avruch, J. (2005). Active Nercc1 protein kinase concentrates at centrosomes early in mitosis and is necessary for proper spindle assembly. *Mol. Biol. Cell* 16, 4827–4840.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 798–812.
- Sampath, S.C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A., and Funabiki, H. (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* 118, 187–202.
- Sdelci, S., Schütz, M., Pinyol, R., Bertran, M.T., Regué, L., Caelles, C., Vernos, I., and Roig, J. (2012). Nek9 phosphorylation of NEDD1/GCP-WD contributes to Plk1 control of γ -tubulin recruitment to the mitotic centrosome. *Curr. Biol. CB* 22, 1516–1523.
- Shintomi, K., and Hirano, T. (2009). Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev.* 23, 2224–2236.
- Storchová, Z., Becker, J.S., Talarek, N., Kögelsberger, S., and Pellman, D. (2011). Bub1, Sgo1, and Mps1 mediate a distinct pathway for chromosome biorientation in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* 22, 1473–1485.
- Tanaka, H., Yoshimura, Y., Nozaki, M., Yomogida, K., Tsuchida, J., Tosaka, Y., Habu, T., Nakanishi, T., Okada, M., Nojima, H., et al. (1999). Identification and Characterization of a Haploid Germ Cell-specific Nuclear Protein Kinase (Haspin) in Spermatid Nuclei and Its Effects on Somatic Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 17049–17057.
- Terada, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Yasuda, Y., Fujita, S., and Otsu, M. (1998). AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J.* 17, 667–676.
- Vader, G., Medema, R.H., and Lens, S.M.A. (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J. Cell Biol.* 173, 833–837.

- Vagnarelli, P., and Earnshaw, W.C. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 113, 211–222.
- Wang, F., Dai, J., Daum, J.R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P.T., Gorbsky, G.J., and Higgins, J.M.G. (2010). Histone H3 Thr-3 Phosphorylation by Haspin Positions Aurora B at Centromeres in Mitosis. *Science* 330, 231–235.
- Wang, F., Ulyanova, N.P., van der Waal, M.S., Patnaik, D., Lens, S.M.A., and Higgins, J.M.G. (2011). A Positive Feedback Loop Involving Haspin and Aurora B Promotes CPC Accumulation at Centromeres in Mitosis. *Curr. Biol. CB* 21, 1061–1069.
- Wilde, A., and Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* 284, 1359–1362.
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Two Histone Marks Establish the Inner Centromere and Chromosome Bi-Orientation. *Science* 330, 239–243.
- Yoshida, M.M., Ting, L., Gygi, S.P., and Azuma, Y. (2016). SUMOylation of DNA topoisomerase II α regulates histone H3 kinase Haspin and H3 phosphorylation in mitosis. *J Cell Biol* 213, 665–678.
- Zeitlin, S.G., Shelby, R.D., and Sullivan, K.F. (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 155, 1147–1157.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578–583.
- Zhou, L., Tian, X., Zhu, C., Wang, F., and Higgins, J.M. (2014). Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep.* 15, 273–281.
- Zhou, L., Liang, C., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, B., Yan, H., Qi, F., Zhang, M., Yi, Q., Guan, Y., et al. (2017). The N-Terminal Non-Kinase-Domain-Mediated Binding of Haspin to Pds5B Protects Centromeric Cohesion in Mitosis. *Curr. Biol.* 27, 992–1004.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Haspin depletion promotes chromosome misalignments and the formation of ectopic MTOCs. A, U-2 OS cells in early mitosis transfected with either control or Haspin siRNA were immuno-stained for α -Tubulin (green) and H3T3p (red). DNA was visualized using DAPI (blue). Scale bar 5 μ M. B, quantification of early and late mitosis in cells transfected with either control or Haspin siRNA. C, U-2 OS cells in early mitosis transfected with Haspin siRNA or treated with the Haspin inhibitor JE255 or DMSO control. Cells were immuno-stained for α -Tubulin (red), Pericentrin and H3T3p (blue). DNA was visualized using Sybr Green. Scale bar 5 μ M. D, evaluation of Haspin activity on H3T3 in U-2 OS cells and U-2 OS cells expressing a GFP:HaspinSil rescue (sil, resistant to siRNA) after transfection with either control or Haspin siRNA. H3T3p signal over DAPI signal ratio of prometaphase/metaphase cells is shown (n=30). E, quantification of late prometaphase/metaphase showing misaligned chromosomes and F, early mitosis with more than 2 MTOCs respectively, on U-2 OS and U-2 OS GFP:HaspinSil cells treated as in D as well as cells treated with the Haspin inhibitor JE255 or DMSO control.

Figure 2. Haspin is a negative regulator of nucleation. A, microtubule regrowth assay on U-2 OS cells transfected with either control or Haspin siRNA, labelled with anti- α -Tubulin (green) and anti-Pericentrin (red), DNA was visualized using DAPI (blue). Cells are showed after 30s of regrowth at 37°C. Scale bar 10 μ M. B, Pericentrin and α -Tubulin signal quantification at each MTOCs of cells treated in A after 30s in arbitrary units. Integrated graph shows the ratio of Pericentrin/ α -Tubulin. C, selected Haspin depleted and control cells treated as in A showing chromosome nucleation in blowup enhanced image. D, U-2 OS cells transfected with either control or Haspin

siRNA and immuno-stained for Pericentrin (red) and Centrin (green). DNA was visualized using DAPI (blue).

Figure 3. Haspin kinase requirement for centrosome stability is independent of Aurora B function. A, U-2 OS cells in early mitosis treated with either control, Haspin or Aurora B siRNA or both Haspin and Aurora B siRNA. Cells were immuno-stained for α -Tubulin (green), Pericentrin and H3T3p (red). DNA was visualized using DAPI (blue). Scale bar 10 μ M. B and C, quantification of late prometaphase/metaphase showing misaligned chromosomes and early mitosis with more than 2 MTOCs respectively, on cells shown in A.

Figure 4. Haspin kinase requirement for centrosome integrity is independent of H3T3ph and Aurora B localization. A, U-2 OS cells expressing or not the fusion protein CENP-B-CTD:INCENP ^{Δ CENbox} were transfected with either control or Haspin siRNA and immuno-stained for Pericentrin (red) and Centrin (green). DNA was visualized using DAPI (blue). Scale bar 10 μ M. B, quantification of late prometaphase/metaphase cells showing misaligned chromosomes and early mitosis with more than 2 MTOCs as well as multipolar cells showing more than 2 clusters of Centrin dual spots, on cells shown in A. C and D, western blot analysis of H3T3p and CenpAS7p levels on cells treated as in A. β -Actin is used as loading control. Mitotic index (MI) are indicated for each condition as well as H3T3p/ β -Actin and CenpAS7p/ β -Actin ratios compensated against MI and normalized to control.

Figure 5. Nek9 is a new centrosomal Haspin substrate. A, Haspin Kinase assay on protein chips, left panel: assay with Haspin KD (Kinase Dead); right panel: assay with active Haspin kinase. Arrows indicate protein candidates phosphorylated by active Haspin kinase that appear negative with Haspin KD, white arrows: Nek9 (see Supplementary Fig. 4; list of positive candidate proteins). Chips region containing Nek9 has been enlarged. B, heat-inactivated Nek9 protein kinase was used as substrate in kinase assays for Haspin; left panel: Coomassie gel staining showing protein loading; right panel: autoradiography of ^{32}P signal incorporation. Histone H3 and GST are used as controls. Note the slight autophosphorylation of Nek9 on lane 1.

Figure 6. Loss of MTOCs integrity in Haspin-depleted cells is antagonized by Nek9 depletion. U-2 OS cells in early mitosis treated with either control, Haspin or Nek9 siRNA or both Haspin and Nek9 siRNA. Cells were immuno-stained for α -Tubulin, Pericentrin and H3T3p; DNA was visualized using DAPI. A, quantification of late prometaphase/metaphase showing misaligned chromosomes and B, early mitosis with more than 2 MTOCs.

Supplementary Figure 1. GFP:HaspinSil rescues Haspin siRNA. A, Immunoblotting of U-2 OS cells lysates after transfection with either control (siControl) or Haspin siRNA (siHaspin) and probed with anti-Haspin, anti α -Tubulin and anti H3T3p. B, Mitotic index of cells transfected with control siRNA or Haspin siRNA. C, Immunostaining of U-2 OS cells expressing a GFP:HaspinSil rescue (sil, resistant to siRNA) after transfection with either control (siControl) or Haspin siRNA (siHaspin) using anti- α -Tubulin (red) and anti H3T3p (yellow) antibodies. DNA in blue, GFP in green.

Supplementary Figure 2. Haspin depletion promotes microtubule nucleation at MTOCs. A, microtubule regrowth assay on U-2 OS cells transfected with either control or Haspin siRNA, labelled with anti- α -Tubulin (green), DNA was visualized using DAPI (blue). Cells are showed after 30s, 1 minute or 2 minutes of regrowth at 37°C. B, Pericentrin and α -Tubulin signal quantification at MTOCs per cell treated in A after 30s.

Supplementary Figure 3. Aurora B targeting at the centromere, doesn't rescue Haspin siRNA phenotype. A Quantification of H3T3p signal normalized with DNA amount in U-2 OS cells transfected with control siRNA or Haspin siRNA, Aurora B siRNA or both Haspin and Aurora B siRNA. B Immunoblotting of U-2 OS cells lysates after transfection with control (siControl), Haspin (siHaspin) or Aurora B siRNA (siAurora B) and cells transfected with both Haspin siRNA and CENP-B-CTD:INCENP ^{Δ CENbox} and probed with anti-Haspin, anti- β -actin and anti Aurora B.

Supplementary Figure 4. Putative Haspin substrates. List of protein candidates identified by Haspin kinase assay on protein chip shown in Figure 5.

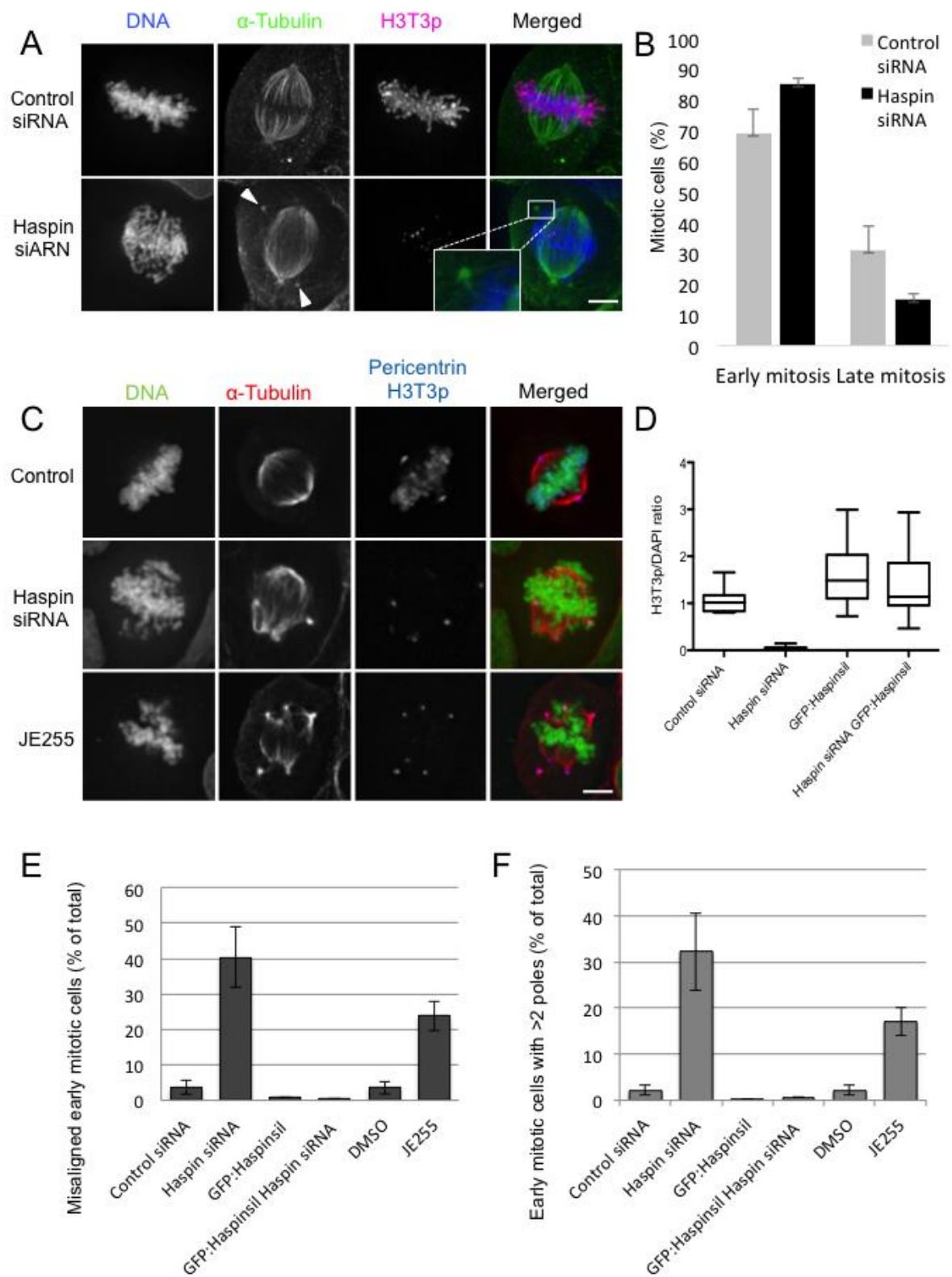


Figure. 1. Omid Feizbakhsh

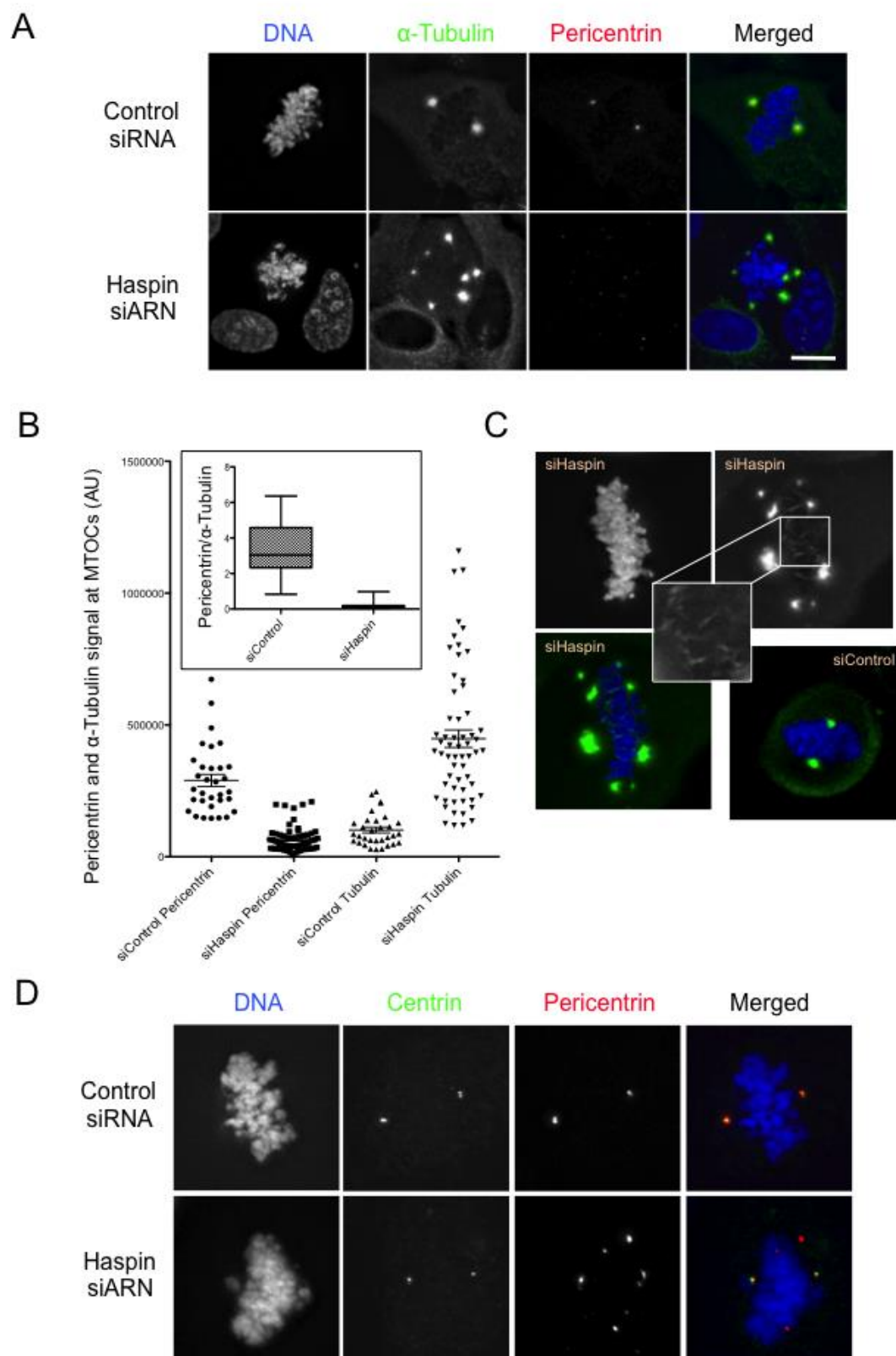


Figure. 2. Omid Feizbakhsh

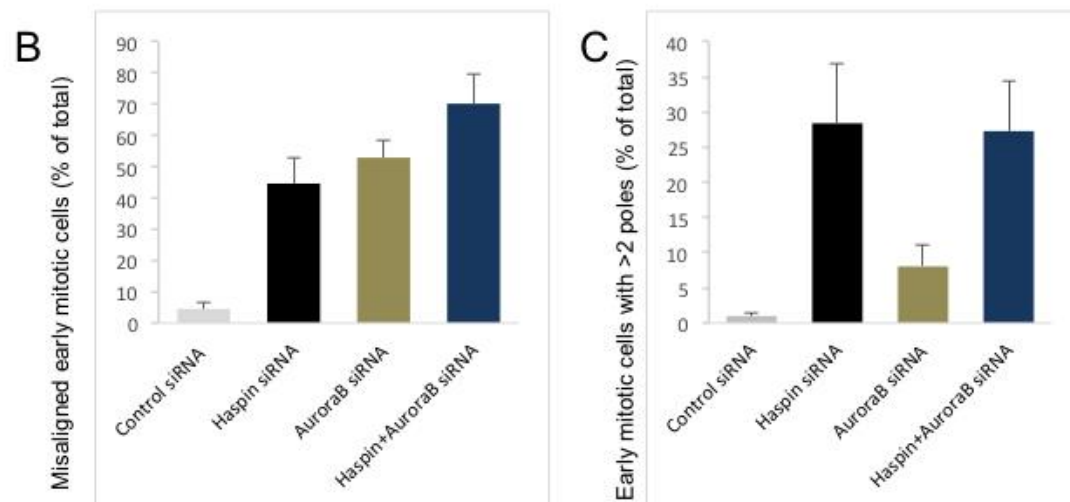
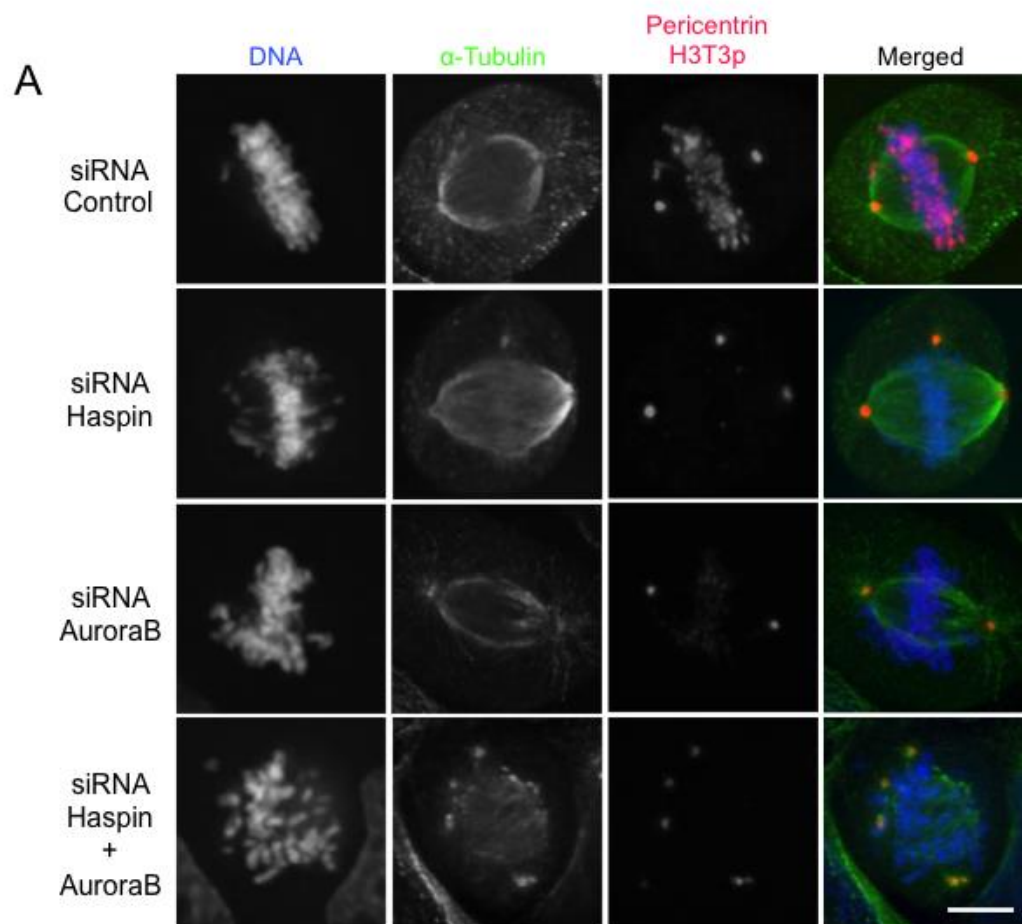


Figure. 3. Omid Feizbakhsh

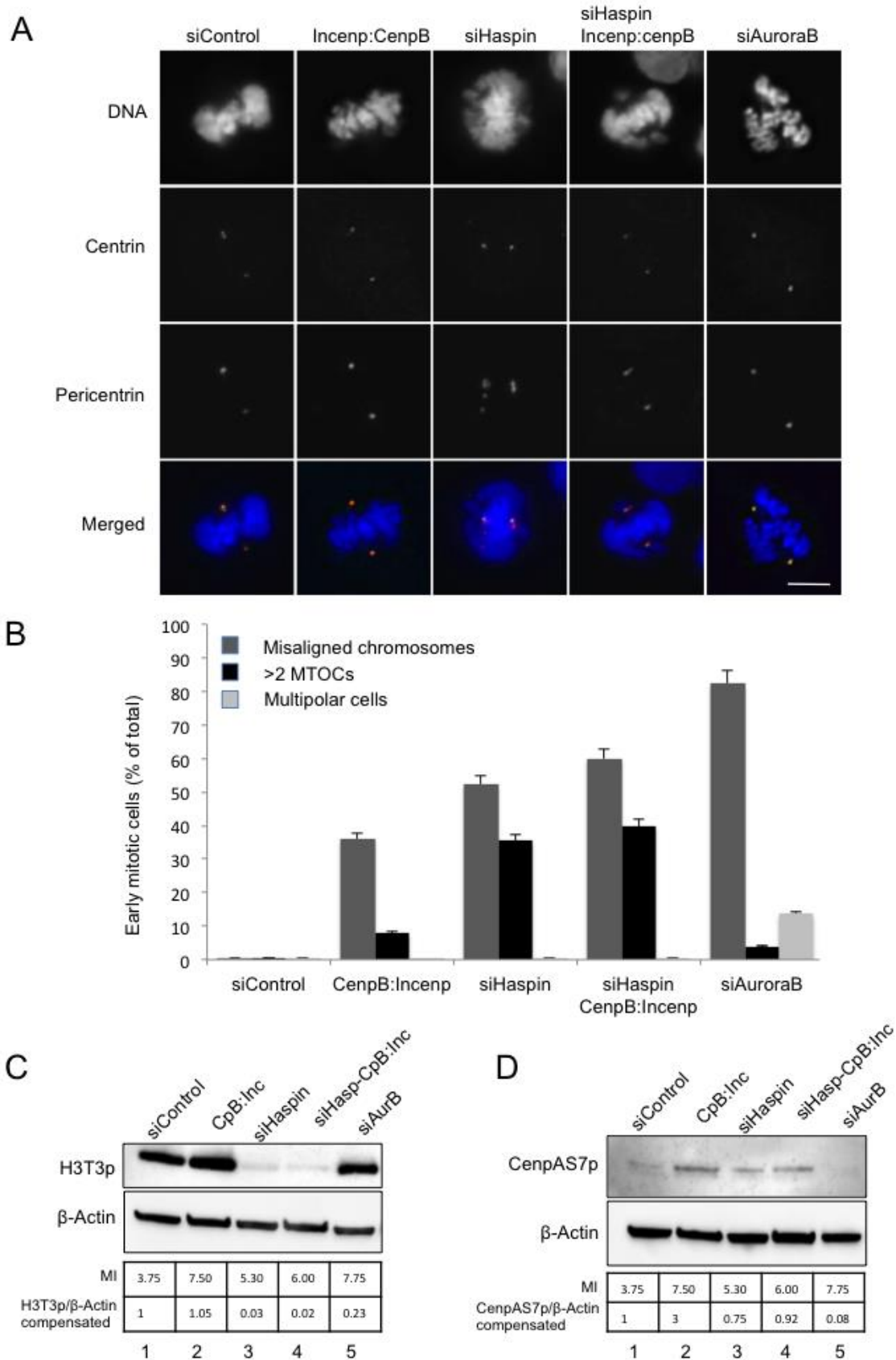


Figure. 4. Omid Feizbakhsh

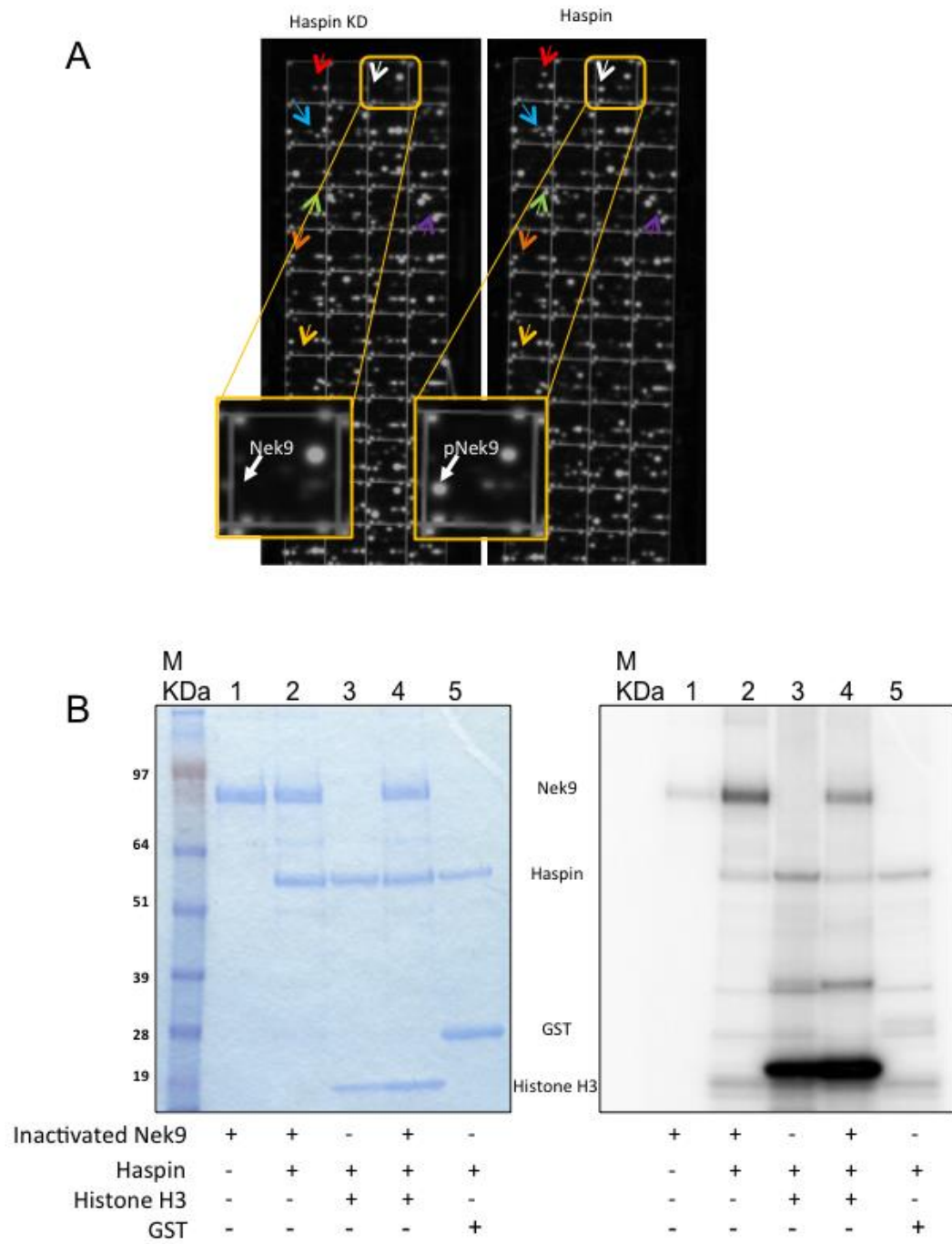


Figure. 5. Omid Feizbakhsh

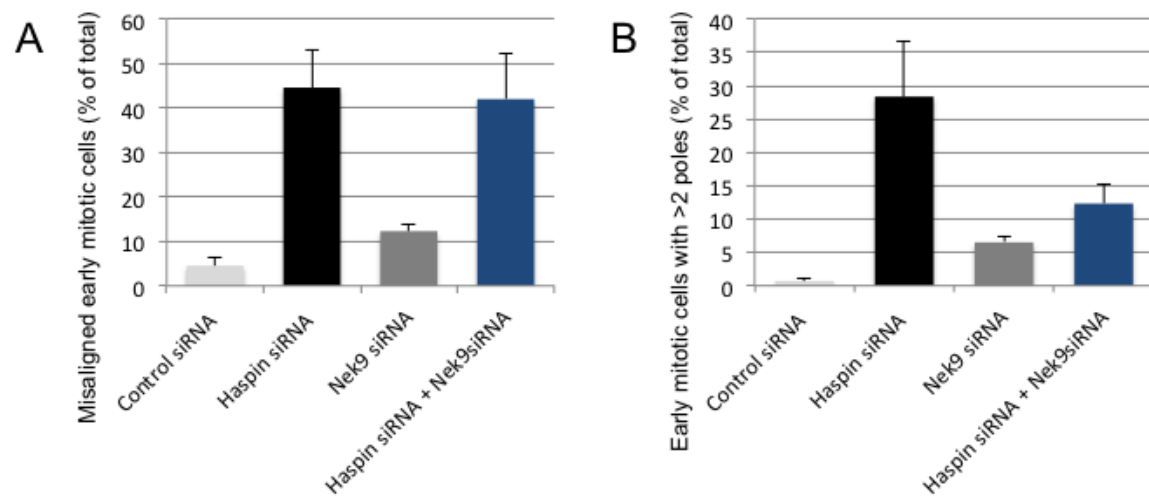


Figure. 6. Omid Feizbakhsh

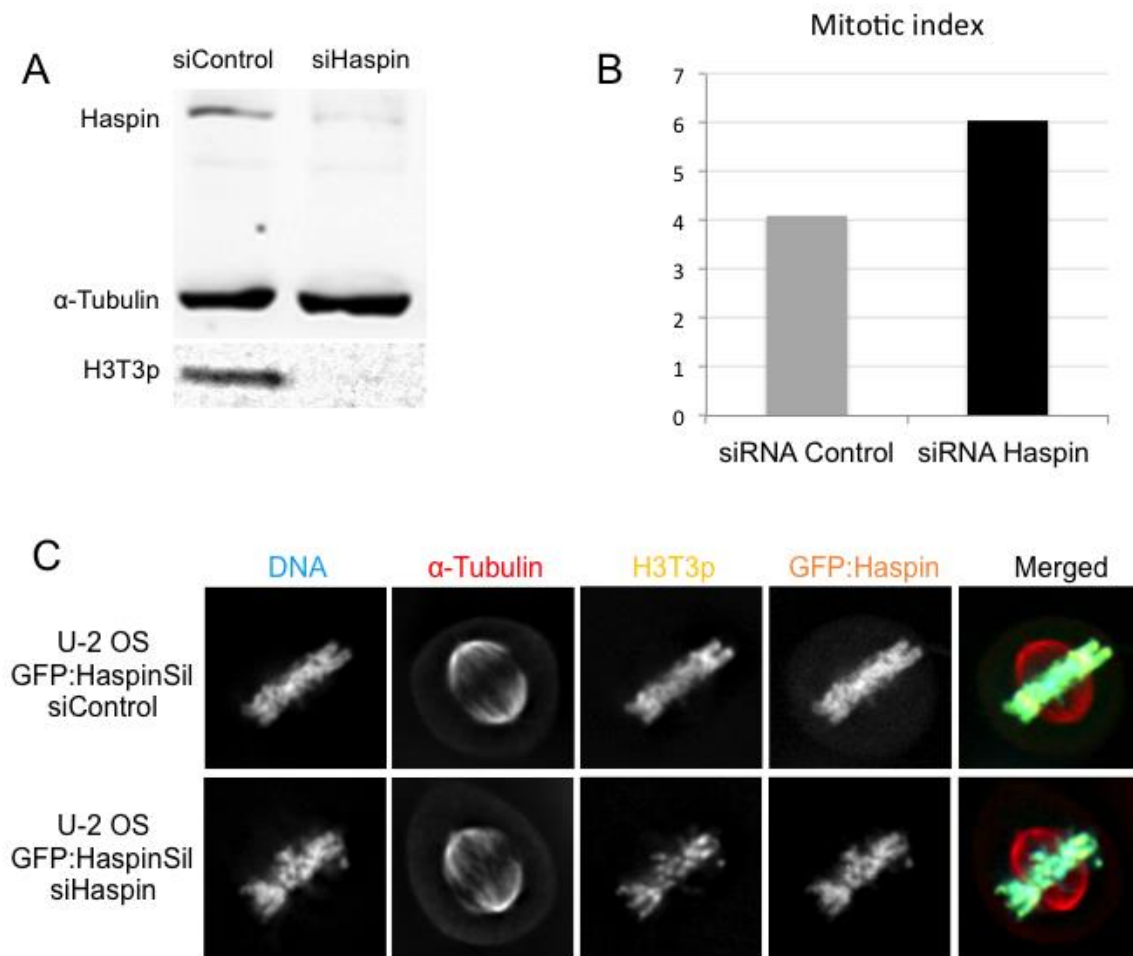


Figure. S1. Omid Feizbakhsh

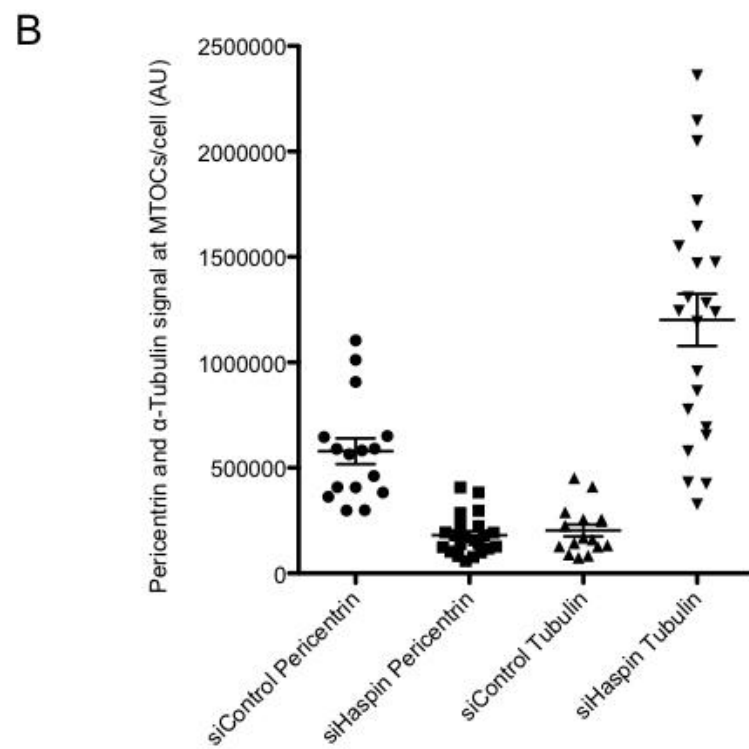
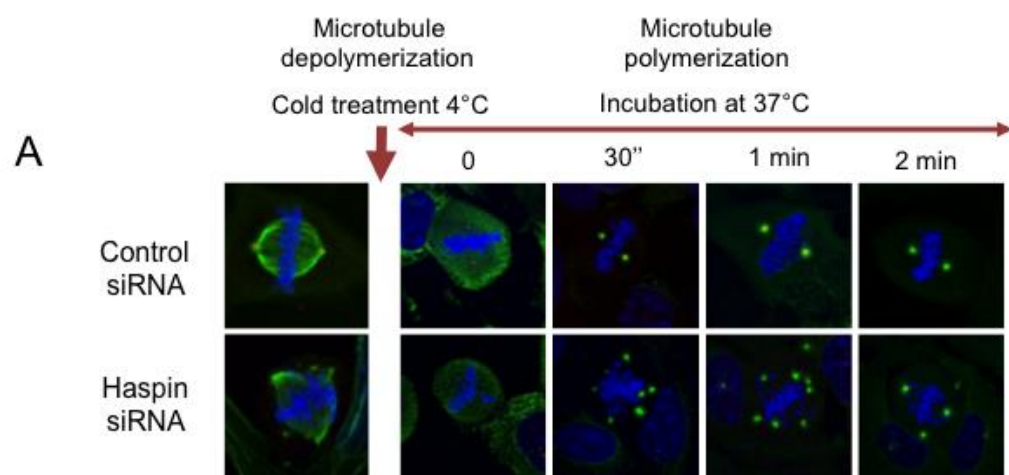


Figure. S2. Omid Feizbakhsh

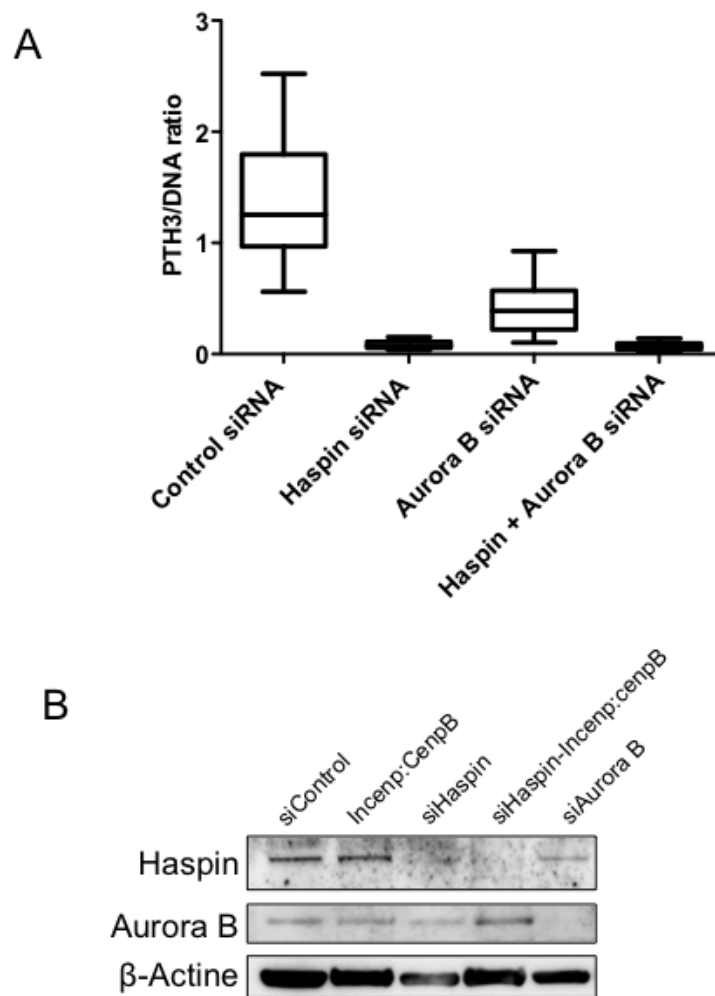


Figure. S3. Omid Feizbakhsh

MGC42105

Homo sapiens, similar to serine/threonine kinase (KIN1/SNF1/Nim1 subfamily)

NEK9

Homo sapiens NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 9 (NEK9)

PRKCD

Protein kinase C, delta (PRKCD), transcript variant 1

SPRY2

NM_005842.2| Homo sapiens sprouty homolog 2
(Drosophila) (SPRY2)

ANKHD1

Homo sapiens multiple ankyrin repeats, single KH-domain (MASK) homolog (MASK)

ABCF1

Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1,

ADRBK1

Homo sapiens adrenergic, beta, receptor kinase 1

Figure. S4. Omid Feizbakhsh

I. Article 2:

SAR optimization of imidazopyridine series for the design of selective Haspin inhibitors. Synthesis, in vitro and in vivo studies

Jonathan Elie^{2}, Omid Feizbakhsh^{1*}, Xavier Fant¹, Julien Duez¹, Blandine Baratte¹, Nathalie Desban¹, Matthieu Place², Frédéric Buron², Pascal Bonnet², Sylvain Routier² and Sandrine Ruchaud¹*

¹ Sorbonne Universities, UPMC Univ Paris 06, CNRS USR 3151, Protein Phosphorylation & Human Diseases, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff Cedex F-29688, France

² Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, BP 6759, 45067, Orléans Cedex 2, France

*Both authors contributed equally to the work

Résumé de l'article 2

Haspine est une protéine kinase mitotique, essentielle à la division cellulaire. Elle régule l'activité et la localisation de la kinase Aurora B et se présente comme une nouvelle cible thérapeutique pertinente en oncologie. Nous avons établi une collaboration avec une équipe de chimistes médicaux et un groupe de modélisateurs de l'Institut de Chimie Organique (ICOA) de l'université d'Orléans, afin de développer de nouveaux inhibiteurs de l'Haspine. Nous sommes parti d'une structure connue, le CHR6494, décrit par Huertas et al. en 2012. Cette molécule, inhibitrice de l'Haspine, a montré une activité anti-tumorale dans un modèle de souris xénographées. Malgré son efficacité, elle montre une faible stabilité et une sélectivité réduite.

Nous avons donc développé une nouvelle série d'imidazopyridine à partir de la structure de base du CHR6494. La synthèse s'est appuyée sur la modélisation et notre bio-guidage pour améliorer les structures en terme de spécificité et sélectivité (SAR ; Structure Activity Relationship).

Dans cette partie du travail, nous avons choisi de présenter les résultats des expériences de caractérisation biologique des composés sous forme d'article. La description des différentes synthèses chimiques est en cours d'écriture par nos collègues chimistes et viendra compléter le manuscrit pour soumission. Il est à noter que la soumission de ce travail est sous la dépendance d'un dépôt de brevet qui sera effectué en amont.

La structure du CHR6494 ainsi que celles des composés caractérisés au niveau biologique dans cette étude sont présentées au début de la partie résultats du manuscrit.

Plusieurs dérivés ont présenté de bonnes propriétés inhibitrices de l'Haspine; la plupart des IC⁵⁰ sont inférieures au micromolaire et deux sont dans la fenêtre du nanomolaire. Certains de nos dérivés ont montré une plus grande sélectivité que le composé d'origine tout en conservant une bonne spécificité et ont montré des propriétés antiprolifératives contre diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines. Nos composés ont également montré une stabilité améliorée.

Il a été démontré que le CHR6494 causait un arrêt en G2/M du cycle cellulaire (Huertas et al., 2012). Nous avons confirmé que nos meilleurs hits, notamment le JE255, sont de puissants inhibiteurs de l'Haspine dans les cellules humaines qui, comparés à la référence CHR-6494, ne bloquent pas les cellules en G2/M. Aussi, l'arrêt en G2/M observé avec le CHR6494 n'est pas une conséquence de son inhibition de l'Haspine mais est plutôt due à ses effets sur une autre cible. Nous avons testé ses propriétés inhibitrices sur des kinases connues pour leur implication dans l'entrée en mitose telles que Plk1 et Cdk1. Aucun de nos composés ni le CHR6494 ne ciblent Plk1. Cependant, nous avons montré que le CHR6494, comparé à nos composés, était un puissant inhibiteur de Cdk1 expliquant l'arrêt du G2/M observé.

Ce travail de synthèse et de caractérisation a mené à l'élaboration d'un outil puissant pour disséquer la fonction de l'Haspine dans la mitose en plus de nous donner une base structurale solide pour le développement de la série vers un outil thérapeutique.

SAR optimization of imidazopyridine series for the design of selective Haspin inhibitors. Synthesis, in vitro and in vivo studies

Jonathan Elie^{2}, Omid Feizbakhsh^{1*}, Xavier Fant¹, Julien Duez¹, Blandine Baratte¹, Nathalie Desban¹, Matthieu Place², Frédéric Buron², Pascal Bonnet², Sylvain Routier² and Sandrine Ruchaud¹*

¹ Sorbonne Universities, UPMC Univ Paris 06, CNRS USR 3151, Protein Phosphorylation & Human Diseases, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff Cedex F-29688, France

² Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, BP 6759, 45067, Orléans Cedex 2, France

*Both authors contributed equally to the work

Correspondence should be addressed to:

Sandrine Ruchaud (biology): Sorbonne Universities, UPMC Univ Paris 06, CNRS USR 3151, Protein Phosphorylation & Human Diseases, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff Cedex F-29688, France (sruchaud@sb-roscoff.fr; tel. +33.(0)2.98.29.23.09)

Sylvain Routier (chemistry): Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, BP 6759, 45067, Orléans Cedex 2, France

ABSTRACT

Haspin is a mitotic protein kinase required for proper cell division regulating Aurora B kinase activity and localization. A novel series of imidazopyridine series developed from CHR-6494 a recently published Haspin inhibitor, was synthesized and evaluated for its inhibitory properties against *HsHaspin* and several other protein kinases. Several derivative exhibited good inhibitory properties with most IC₅₀s below the micromolar range, two within the nanomolar. Some of our derivatives showed greater selectivity than the original compound while retaining its specificity and displayed anti-proliferative properties against various human cancer cell lines. We show that our best hits are powerful Haspin inhibitors in human cells which when compared to the reference CHR-6494 do not block cells in G2/M and do not inhibit Cdk1/CyclinB.

INTRODUCTION

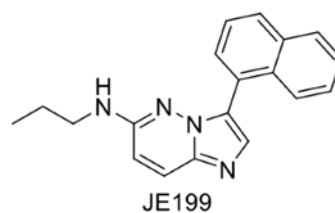
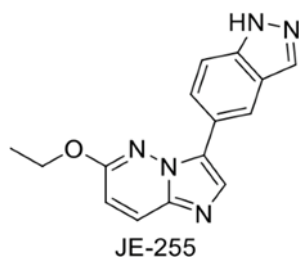
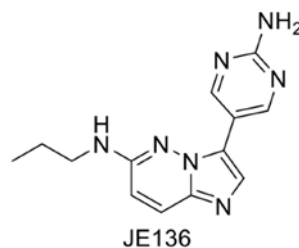
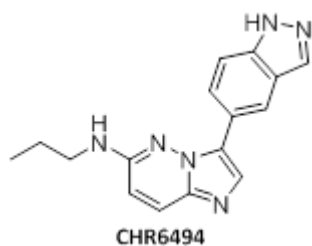
Aneuploidy and polyploidy can predispose cells to cancerous transformation. These conditions often arise from defects occurring during mitosis and cytokinesis. Defects in chromosome segregation may lead to developmental diseases and cancers. To prevent such mistakes, cells developed several mechanisms to ensure faithful chromosome segregation at mitosis. These include microtubule-kinetochore attachments, and keeping sister chromatids cohesion until anaphase onset. The coordination of these two processes is tightly regulated by essential protein kinases of which expression or activity is found deregulated in many cancers. Aurora B kinase controls many aspects of mitosis, including the correction of microtubule-kinetochore attachment errors and cytokinesis (Ruchaud et al., 2007). The deregulation of its activity or expression is often associated with genomic instability and aneuploidy, commonly observed in a vast majority of solid tumors and hematological malignancies (Vader and Lens, 2008). In 2011, there were a dozen of Aurora kinase inhibitors in phase I clinical trial (Cheung et al., 2014). Despite recent advances, effectiveness of Aurora B kinase inhibitors is so far limited by apparition of resistance (Guo et al., 2009). It is therefore of great importance to develop new strategies targeting Aurora B not directly but through its upstream natural regulators. It has been shown that other protein kinases control Aurora B activity directly or indirectly making them potential therapeutic targets (Jelluma et al., 2008; Petsalaki et al., 2011). Amongst them, the protein kinase Haspin (also known as GSG2, germ cell associated 2) emerged as a key regulator of Aurora B functions. It has been shown to act upstream of Aurora B regulating both its centromeric localization and activity (Antoni et al., 2012; Dai and Higgins, 2005; Dai et al., 2005, 2006, Wang et al., 2011, 2012). Haspin kinase is essential to mitosis (Antoni et al., 2012; Dai et al., 2005, 2006, 2009, Wang et al., 2011, 2012) where it plays several key roles both in maintaining chromatin and centromeric cohesion and spindle pole structures (Dai and Higgins, 2005; Dai et al., 2005, 2006). Haspin phosphorylates Histone H3 on threonine 3 (H3T3p) (Dai and Higgins, 2005) at mitosis leading to recruitment and clustering of Aurora B to centromere (Kelly et al., 2010; Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). This clustering is essential for

Aurora B kinase activation which in return phosphorylates and activates Haspin creating a positive feedback loop between the two kinases (Wang et al., 2011). Hence, through its role in controlling the activity of Aurora B, Haspin is a target for cancer therapy.

Deregulation of protein phosphorylation is at the origin of several pathologies and protein kinases are now considered as promising drug targets. Therefore, specifically targeting kinases essential to unwanted cancerous dividing cells is a leading way towards therapy. The search for pharmacological kinases inhibitors has become a major way to discover new therapeutic agents. Mitotic protein kinases are now considered prime targets for drugs developed by the pharmaceutical industry (de Cárcer et al., 2007). Haspin is overexpressed in some malignancies such as Burkitt's lymphoma and B cell chronic lymphocytic leukemia (Dave et al., 2006; Rosenwald et al., 2001). Additionally, Haspin reveals an atypical structure that do not fall into any known large protein kinase family, increasing the likelihood of identifying specific inhibitors that may result in fewer off-target effects (Eswaran et al., 2009; Villa et al., 2009). There are currently very few described Haspin inhibitors which often display poor selectivity: CHR-6494 (Huertas et al., 2012) (imidazopyridazine; Chroma Biotech.), 5-iodotubercidine (Antoni et al., 2012; Wang et al., 2012) (nucleotide-like), LDN-192960 (Cuny et al., 2010; Wang et al., 2012) (acridine analogs), harmine (β -carboline) derivative LDN-211898 (Cuny et al., 2012; Wang et al., 2012) (Antoni et al., 2012; Wang et al., 2012) and SGI-1776 (Chen et al., 2009). Heterocyclic derivative CHR-6494 was described to be active both *in vitro* and on tumor cells (Han et al., 2017; Huertas et al., 2012). Moreover, CHR-6494 reduces angiogenesis and tumor growth on nude mice xenographed with HCT-116 cells (Huertas et al., 2012). However, the compound is cytotoxic at doses incompatible with drug administration on humans and has poor selectivity (Huertas et al., 2012). In this study we report the development of CHR-6494 derivatives that display equal potency towards Haspin with a better selectivity. Compared with CHR-6494, they don't affect the cell cycle, however, they display anti-proliferative properties against various human cancer cell lines.

RESULTS

Compounds selection



Assessment of Haspin inhibition

We tested the inhibitory activity of the 27 synthesized compounds on recombinant *HsHaspin* activity compared to the reference compound **CHR-6494**. Compounds **JE129**, **JE136**, **JE210**, **JE214**, **JE215**, **JE218**, **JE234**, **JE255**, **JE265**, **JE272**, **JE276**, **JE277**, **JE278**, **JE283**, **JE299** inhibited *HsHaspin* the most efficiently with IC_{50} s below 1 μ M (Table 1). Best IC_{50} s (<100 nM) were obtained with compounds **JE234**, **JE235**, **JE255**, **JE272**, **JE277**, **JE278** and **JE299** (85 nM, 50 nM, 69 nM, 31 nM, 63 nM, 76 nM and 53 nM respectively).

Compound	JE137	JE120	JE125	JE129	JE140	JE136	JE199	JE201	JE203	JE210	JE214	JE215	JE218
IC ₅₀ (μM)	0.055	2.225	3.1	0.695	2.4	0.95	>10	>10	>10	0.12	4.8	0.85	0.16

Compound	JE234	JE235	JE243	JE244	JE245	JE249	JE255	JE265	JE272	JE276	JE277	JE278	JE283	JE299
IC ₅₀ (μM)	0.085	0.05	6.2	>10	4	6.1	0.069	0.17	0.031	0.39	0.063	0.076	0.71	0.043

Table 1. IC₅₀ (μM) of the indicated compounds on *HsHaspin* Kinase. In bold are compounds with IC₅₀<0.1 μM

We then tested the selectivity of the best hit compounds on a larger panel of kinases (Table 2) including *HsAurora B*, *HsCdk2/CyclinA*, *HsCdk5/p25*, *HsCdk9/cyclinT*, *RnDYRK1A*, *MmCLK1*, *HsPim1*, *SscGSK3*, *SscCK1*. Compound **JE199** was also added to the selectivity study as a negative Haspin control. Similarly to compound **CHR-6494**, the selected compounds affected several of the kinases we tested besides *HsHaspin*. Most compounds with IC₅₀ below 1 μM towards *HsHaspin* kinase (**JE129**, **JE136**, **JE210**, **JE212**, **JE218**, **JE234**, **JE235**, **JE255**, **JE265**, **JE272**, **JE276**, **JE277**, **JE278**, **JE283**, **JE299**) shared common inhibitory properties towards *MmCLK1* and/or *RnDYRK1A* (table 2). Compound **JE129** slightly inhibited *HsAurora B* kinase, a feature shared with reference compound **CHR-6494** whereas other molecules including **JE136** and **JE255** had no effect on *HsAurora B* activity (Table 2). Cross-inhibition of *HsHaspin*, *RnDYRK 1A* and *MmCLK1* is likely due to close proximity of the kinase domain structures of these three enzymes as previously reported (Eswaran et al., 2009). Compound **JE136** was one of the most selective compounds of the collection (Table 2).

Compound		HsHaspin	HsAurora B	HsCdk2	HsCdk5	HsCdk9	MmClk1	RnDYRK1A	SsGSK3	HsPim1
JE 137 CHR-6494	1	0.055	0.82	0.091	0.08	0.038	0.009	0.017	0.07	0.2
JE 129	4	0.695	0.6	1.01	0.9	0.6	0.032	0.065	1.1	0.21
JE 136	6	0.95	>10	>10	4.8	>10	1.1	4.1	>10	7.8
JE 210	11	0.12	>10	0.1	0.15	0.59	0.011	0.021	0.29	0.5
JE 214	12	1.08	>10	0.28	0.21	>10	0.016	0.078	>10	>10
JE 215	13	0.85	>10	>10	2.2	3	0.42	2.1	>10	>10
JE 218	14	0.16	>10	0.3	0.4	0.1	0.18	0.045	0.17	1
JE 234	15	0.085	1.6	0.12	0.9	0.04	0.016	0.017	0.069	0.27
JE 235	16	0.05	2	0.11	0.074	0.03	0.07	0.012	0.051	0.2
JE 255	21	0.069	> 10	0.17	0.24	0.1	0.06	0.028	0.14	0.78
JE 265	22	0.17	1.9	0.5	0.08	0.21	0.018	0.031	2	1.8
JE 272	23	0.031	2.8	0.06	0.028	0.019	0.018	0.013	0.05	0.21
JE 276	24	0.39	> 10	0.38	0.6	0.051	0.046	0.05	0.5	2.2
JE 277	25	0.063	2.3	0.052	0.039	0.023	0.011	0.012	0.08	0.1
JE 278	26	0.076	> 10	0.14	0.22	0.081	0.02	0.011	0.08	0.17
JE 283	27	0.71	> 10	0.78	0.99	0.98	0.04	0.079	1.9	4.5
JE 299	28	0.043	> 10	0.05	0.2	0.028	0.013	0.0057	0.007	0.071

Table 2: IC₅₀ (μM) of the CHR6494 derivatives on various protein kinases

Despite a relatively high IC₅₀ (0.95 μM) towards *HsHaspin*, compound **JE136** displayed a better selectivity than the other compounds and we decided to pursue its characterization, together with compound **JE255** due to its interesting selectivity/specificity profile. Compound **JE199** whose specificity was extremely poor (Table 1) was chosen as negative control for the rest of the study.

We tested the effect of selected compounds on cell viability of various cancer cell lines (Table 3) from osteosarcoma (U-2 OS), colorectal cancer (HCT116) and neuroblastoma (SH-SY5Y) origins as well as normal retinal fibroblast RPE-1 immortalized with hTERT. Compound **CHR-6494** affected more efficiently viability of RPE-1 cells when compared to the other molecules (EC₅₀ were 3.8 μM vs. >10 μM, and 5.3 μM for compounds **CHR-6494**, **JE136**, and **JE255** respectively) and it was more efficient on RPE-1 cells than on cells from cancerous origin (EC₅₀ were 3.8 μM, 5.1 μM, >10 μM and 9 μM for RPE-1, U 2-OS, SH-SY5Y and HCT116 respectively). Compound **JE136**, didn't have any effect on RPE-1, U 2-OS and HCT-116 viability (Table 3, EC₅₀ were >10 μM, >10 μM and 6.7 μM respectively). However, it is the only compound we tested that was able to mildly affect SH-SY5Y cell viability (EC₅₀=3.4 μM). Compound **JE255** displayed the strongest effect of the selected compounds on RPE-1, HCT116 and U 2-OS cells.

Compound	RPE-1	U 2-OS	SH-SY5Y	HCT116
CHR-6494	3.8 (XF-ND)	5.1(XF-ND)	>10	9.0
JE136	>10 (XF)	>10 (XF)	3.4	6.7
JE199	>10	>10	>10	>10
JE255	3.7/7.0 moy 5.3	2.8/3.0 moy 2.9	>10	1.7/3.0 moy 2.3

Table 3: EC₅₀ (cell viability at 48h, μ M) of the indicated compound on several human cell lines

We next tested the *in cellulo* functional effects of compounds **JE136** and **JE255**, as well as compounds **CHR-6494** and **JE199** as positive and negative controls respectively. We monitored Haspin activity by western blotting and immunofluorescence techniques in U 2-OS cells following the phosphorylation of Threonine 3 of Histone H3 as a marker (Figure 1). Cells were treated with 500 nM of the various compounds for 48h. As shown in figure 1A, treatment of cells with compound **CHR-6494** and **JE255** greatly reduced H3T3 phosphorylation in selected prometaphase/metaphase cells. Note that typical chromosome misalignment defects are observed as previously reported in Haspin depletion studies (Dai et al., 2005). Quantification of H3T3p signal is represented in Figure 1B. **JE255** showed a strong effect on Haspin *in vivo* activity with only 9.3% of H3T3p signal remaining in prometaphase cells. This effect was slightly milder than results obtained with compound **CHR-6494** -treated cells where there was 2.2% of H3T3p signal left. Western blot analysis (Figure 1C) confirmed the results obtained by immunofluorescence showing that compound **CHR-6494** and **JE255** were the most efficient at reducing in-cell Haspin activity.

We next tested the effect of our compounds on the cell cycle. Cells were treated for 48 h with either 500 nM or 2.5 μ M of the various compounds and their cell cycle profile was analyzed by flow cytometry (Figure 1C). At the lower dose, none of the compounds significantly affected the cell cycle or displayed cell toxicity confirming the results obtained with viability tests (Table 3). However, when cells were treated with 2.5 μ M of compound **CHR-6494**, flow cytometry profile showed a marked increase of cells in G2/M stages (42.2% vs. 18.8% in control DMSO-treated cells, Figure 2A, B). This accumulation of cells in G2 phase of the cell cycle could be due to the inhibition of one or several kinases required to enter mitosis. We therefore tested our compounds on two obvious candidates, *HsCdk1* and *HsPlk1* (Table 4). While none of the tested compounds inhibited *HsPlk1* (table 4), **CHR-6494** showed a strong inhibition of *HsCDK1*

(IC₅₀ = 35 nM) that could account for the accumulation of cells in the G2/M phase of the cell cycle.

Compound		HsPLK1	HsCDK1
CHR-6494	1	>10	0.035
JE 136	6	>10	10.000
JE 255	21	>10	0.200

Table 4: IC₅₀ (μM) of selected CHR6494 derivatives on HsPLK1 and HsCDK1

DISCUSSION/CONCLUSION

We synthesized and evaluated a novel serie of imidazopyridine starting from CHR-6494, a known Haspin inhibitor (Huertas et al., 2012). We tested compounds inhibitory properties against HsHaspin and showed that our best hits have efficiency comparable to that of CHR-6494. Several derivative exhibited good inhibitory properties with most IC₅₀s below the micromolar range, two within the nanomolar. Some of our derivatives showed greater selectivity than the original compound while retaining good specificity and displayed anti-proliferative properties against various human cancer cell lines. Our compounds also showed an improved stability.

CHR6494 was shown to cause an arrest in G2/M phase of the cell cycle (Huertas et al., 2012). We show that our best hits are powerful Haspin inhibitors in human cells which when compared to the reference CHR-6494 do not block cells in G2/M. Therefore, we can conclude that the G2/M arrest observed with CHR6494 is not a consequence of its inhibition of Haspin but rather due to its effects on another target. Hence, we tested its inhibitory properties on kinases known for their involvement in mitotic entry, Plk1 and Cdk1, and showed that neither of our compounds nor CHR6494 targeted Plk1. However, we have shown that CHR6494, compared to our compounds, was a powerful inhibitor of Cdk1 explaining the G2/M arrest observed. Hence, our best hits are interesting tools to dissect Haspin function in mitosis.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Cell culture experiments

HCT116 cells were cultured in McCoy's 5a medium, SH-SY5Y and U-2 OS cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), hTERT RPE-1 were cultured in DMEM:F12 medium. All media were supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 50 IU penicillin and streptomycin.

Cell viability was assessed using the 'CellTiter96 A_{queous} cell proliferation assay' from PROMEGA according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were grown in 96-well plate in the presence of increasing concentrations of each compounds (from 50 to 0.05 μ M) for 48 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were then incubated for 3 hours with CellTiter A_{queous} One Solution following manufacturer instructions and the absorbance was measured at 490 nm using a 96-well plate reader. Each experiment was made in triplicate and IC₅₀ were determined according to the signal given by the control (0.1% DMSO) set at 100% viability.

Antibodies, immunoblotting, indirect immunofluorescence

Gel electrophoresis and immunoblotting were performed using standard protocols. For immunofluorescence, cells were grown on glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized by 0.15% Triton-X100 for 2 minutes and processed using standard protocols. Images were acquired with a Coolsnap HQ₂ CCD camera (Photometrics) on a Zeiss Axio microscope (Carl Zeiss) using a 100x NA 1.40 objective. Image acquisition and processing were performed using Metamorph (Molecular Device). Deconvolution was performed using AutoQuant module in Metamorph. Quantification of signal intensity was performed using ImageJ software (NIH). Primary antibodies used in this study included anti- α -Tubulin (DM1A, Sigma-Aldrich), anti-Pericentrin (Novus) and anti-phospho-Thr3 Histone H3 (Millipore).

Flow cytometry

5×10^6 cells were treated as described above, trypsinized and washed twice in cold PBS containing 0.1% F68-pluronic acid. Cells were fixed for 2h in ice-cold ethanol, then washed in PBS containing 0.1% F68-pluronic acid, centrifuged at 200 g and resuspended in propidium iodide/RNase staining kit (BD Bioscience). DNA content was determined using a FACS Calibur (BD) and the data were analyzed using Cell Quest software (BD). Twenty thousand events were collected in each run.

Protein kinase assays

Recombinant protein kinases were expressed and purified from *E. coli* (*HsHaspin*, *HsCdk5/p25*, *RnDyrk1A* kinase domain, *HsPim1*, *MmCLK1*) or baculovirus/Sf9 cells (*HsCdk2/CyclinA*, *HsCdk9/CyclinT*). Native *SsCK1* and *SsGSK3* were purified from pig brain whereas *HsPlk1*, *HsCdk1* and *HsAurora B* were purchased from ProQinase and SignalChem respectively. Kinase assays were performed in specific buffers and substrates for each kinase tested in the presence of 15 μM [γ - ^{33}P] ATP (3,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml; PerkinElmer) in a final volume of 30 μl . After 30 min incubation at 30°C, the reaction mix was spotted onto GE healthcare P81 phosphocellulose paper using a FilterMate Harvester (PerkinElmer), and filter was extensively washed with a 1% phosphoric acid solution. The wet filters-bound radioactivity was determined in the presence of 20 μl scintillation fluid (GE healthcare) with a TopCount® Scintillation and Luminescence Counter (PerkinElmer). IC_{50} values were determined in triplicates.

REFERENCES

- Antoni, A.D., Maffini, S., Knapp, S., Musacchio, A., and Santaguida, S. (2012). A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B. *J Cell Biol* **199**, 269–284.
- de Cárcer, G., Pérez de Castro, I., and Malumbres, M. (2007). Targeting cell cycle kinases for cancer therapy. *Curr. Med. Chem.* **14**, 969–985.
- Chen, L.S., Redkar, S., Bearss, D., Wierda, W.G., and Gandhi, V. (2009). Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **114**, 4150–4157.
- Cheung, C.H.A., Sarvagalla, S., Lee, J.Y.-C., Huang, Y.-C., and Coumar, M.S. (2014). Aurora kinase inhibitor patents and agents in clinical testing: an update (2011 - 2013). *Expert Opin. Ther. Pat.* **24**, 1021–1038.
- Cuny, G.D., Robin, M., Ulyanova, N.P., Patnaik, D., Pique, V., Casano, G., Liu, J.-F., Lin, X., Xian, J., Glicksman, M.A., et al. (2010). Structure-activity relationship study of acridine analogs as haspin and DYRK2 kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 3491–3494.
- Cuny, G.D., Ulyanova, N.P., Patnaik, D., Liu, J.-F., Lin, X., Auerbach, K., Ray, S.S., Xian, J., Glicksman, M.A., Stein, R.L., et al. (2012). Structure–activity relationship study of beta-carboline derivatives as haspin kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 2015–2019.
- Dai, J., and Higgins, J.M.G. (2005). Haspin: A Mitotic Histone Kinase Required for Metaphase Chromosome Alignment. *Cell Cycle* **4**, 665–668.
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S.S., and Higgins, J.M.G. (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* **19**, 472–488.
- Dai, J., Sullivan, B.A., and Higgins, J.M.G. (2006). Regulation of Mitotic Chromosome Cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev. Cell* **11**, 741–750.

- Dai, J., Kateneva, A.V., and Higgins, J.M.G. (2009). Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J. Cell Sci.* 122, 4168–4176.
- Dave, S.S., Fu, K., Wright, G.W., Lam, L.T., Kluin, P., Boerma, E.-J., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Rosenwald, A., Ott, G., et al. (2006). Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 354, 2431–2442.
- Eswaran, J., Patnaik, D., Filippakopoulos, P., Wang, F., Stein, R.L., Murray, J.W., Higgins, J.M.G., and Knapp, S. (2009). Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20198–20203.
- Guo, J., Anderson, M.G., Tapang, P., Palma, J.P., Rodriguez, L.E., Niquette, A., Li, J., Bouska, J.J., Wang, G., Semizarov, D., et al. (2009). Identification of genes that confer tumor cell resistance to the Aurora B kinase inhibitor, AZD1152. *Pharmacogenomics J.* 9, 90–102.
- Han, L., Wang, P., Sun, Y., Liu, S., and Dai, J. (2017). Anti-Melanoma Activities of Haspin Inhibitor CHR-6494 Deployed as a Single Agent or in a Synergistic Combination with MEK Inhibitor. *J. Cancer* 8, 2933–2943.
- Huertas, D., Soler, M., Moreto, J., Villanueva, A., Martinez, A., Vidal, A., Charlton, M., Moffat, D., Patel, S., McDermott, J., et al. (2012). Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin. *Oncogene* 31, 1408–1418.
- Jelluma, N., Brenkman, A.B., van den Broek, N.J.F., Cruijssen, C.W.A., van Osch, M.H.J., Lens, S.M.A., Medema, R.H., and Kops, G.J.P.L. (2008). Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* 132, 233–246.
- Kelly, A.E., Ghenoiu, C., Xue, J.Z., Zierhut, C., Kimura, H., and Funabiki, H. (2010). Survivin Reads Phosphorylated Histone H3 Threonine 3 to Activate the Mitotic Kinase Aurora B. *Science* 330, 235–239.
- Petsalaki, E., Akoumianaki, T., Black, E.J., Gillespie, D.A.F., and Zachos, G. (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *J. Cell Biol.* 195, 449–466.

- Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., et al. (2001). Relation of Gene Expression Phenotype to Immunoglobulin Mutation Genotype in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Exp. Med.* *194*, 1639–1648.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 798–812.
- Vader, G., and Lens, S.M.A. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1786*, 60–72.
- Villa, F., Capasso, P., Tortorici, M., Forneris, F., Marco, A. de, Mattevi, A., and Musacchio, A. (2009). Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 20204–20209.
- Wang, F., Dai, J., Daum, J.R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P.T., Gorbsky, G.J., and Higgins, J.M.G. (2010). Histone H3 Thr-3 Phosphorylation by Haspin Positions Aurora B at Centromeres in Mitosis. *Science* *330*, 231–235.
- Wang, F., Ulyanova, N.P., van der Waal, M.S., Patnaik, D., Lens, S.M.A., and Higgins, J.M.G. (2011). A Positive Feedback Loop Involving Haspin and Aurora B Promotes CPC Accumulation at Centromeres in Mitosis. *Curr. Biol. CB* *21*, 1061–1069.
- Wang, F., Ulyanova, N.P., Daum, J.R., Patnaik, D., Kateneva, A.V., Gorbsky, G.J., and Higgins, J.M.G. (2012). Haspin inhibitors reveal centromeric functions of Aurora B in chromosome segregation. *J. Cell Biol.* *199*, 251–268.
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Two Histone Marks Establish the Inner Centromere and Chromosome Bi-Orientation. *Science* *330*, 239–243.

Figure Legends

Figure 1: Cellular effects of CHR6494 derivatives. **A**, Immunofluorescence staining of DMSO-treated U-2 OS cells or cells treated 24h with 500 nM of each compounds. Haspin activity is monitored by staining of phosphorylated Histone H3 on threonine 3 (H3T3p, green), DNA is visualized by DAPI staining. Bar 10µm. **B**, Quantification of Haspin activity in prometaphase cells treated for 48h at 500 nM with the indicated compound; box and whiskers representation, $n \geq 30$. **C**, Whole lysates of cells treated with either DMSO, or 500 nM of the indicated compound for 48h were analyzed by immunoblotting with an anti-Histone H3 phospho-threonine 3 antibody. α -Tubulin is used as loading control. Numbers indicate Histone H3 phospho-threonine 3/ α -Tubulin signal intensity ratio.

Figure 2: Cell cycle effects of CHR6494 derivatives. **A**, DNA content FACS analysis of U-2 OS cells treated for 48h with either DMSO, 0.5 or 2.5 µM of the indicated compounds. **B**, Representation of A as percentage of cells in each phase of the cell cycle.

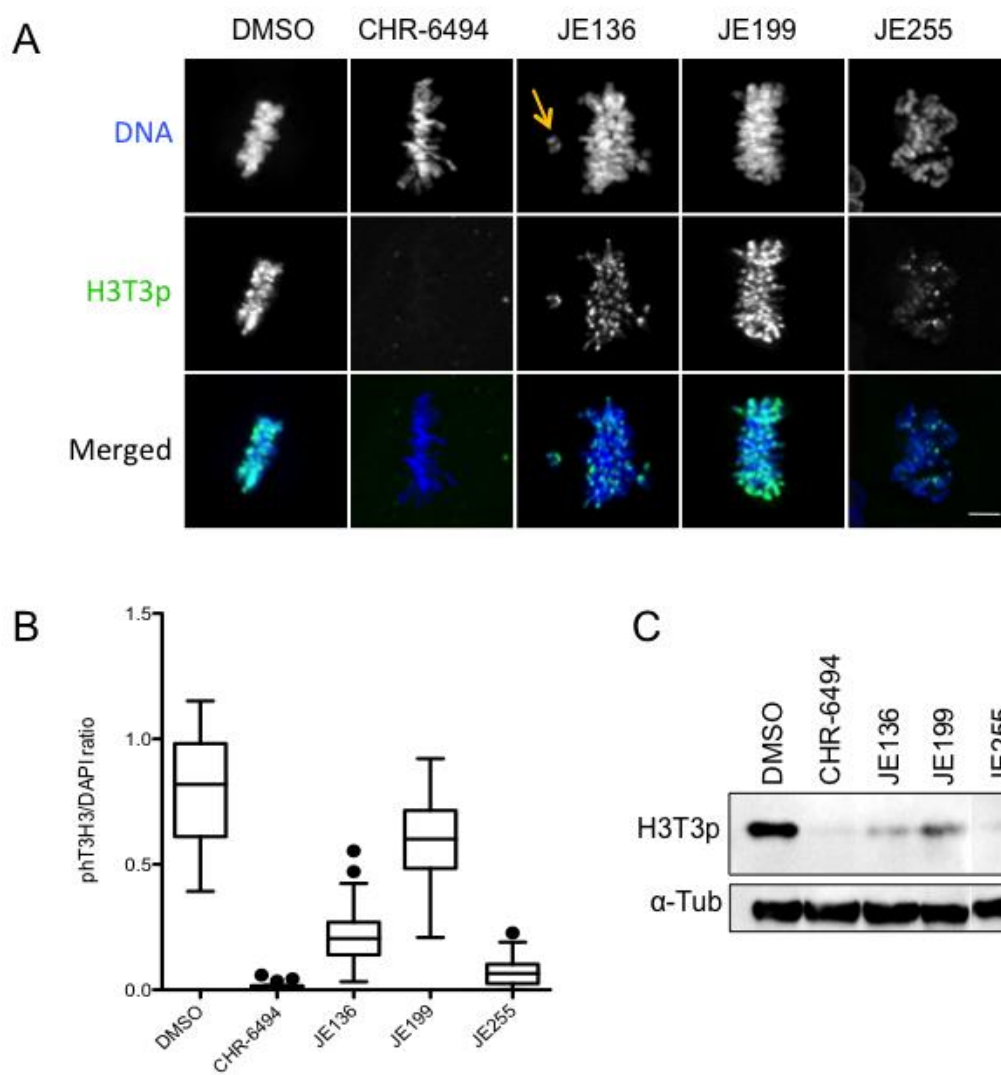


Figure. 1.

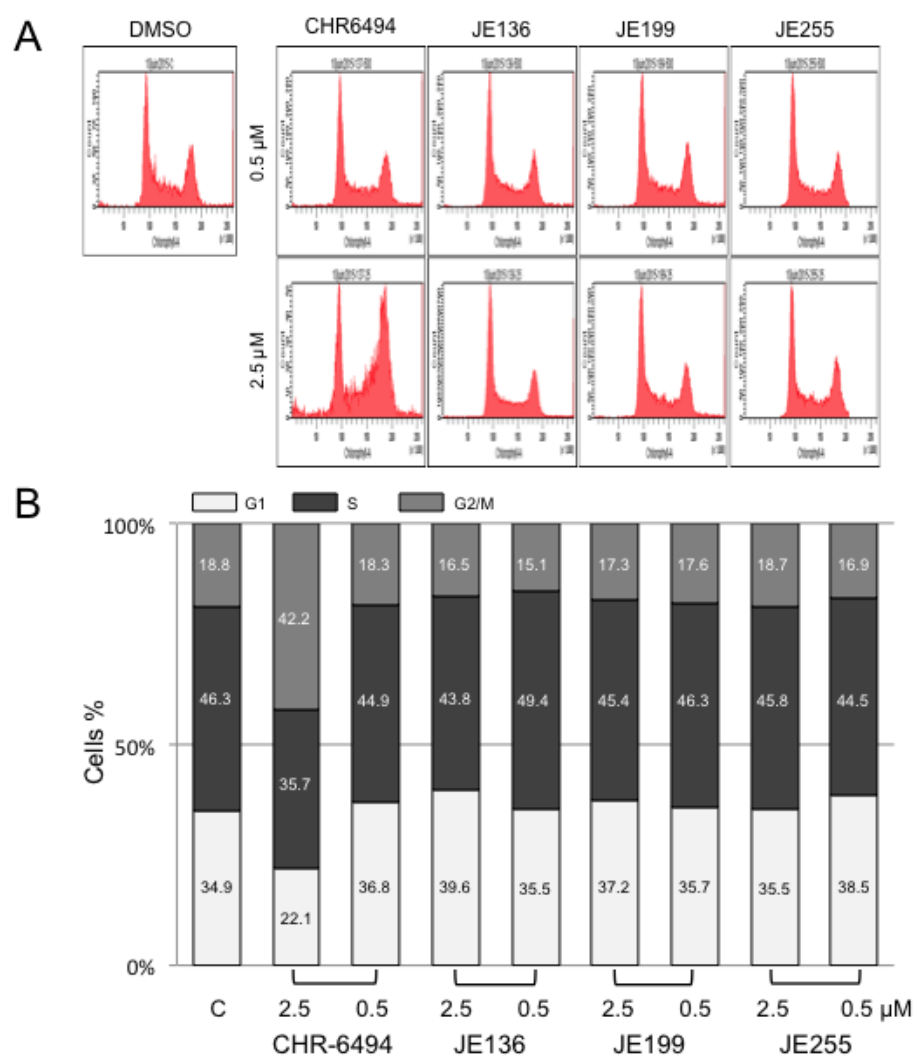


Figure. 2.

Discussion et perspectives

Haspine phosphoryle l'histone H3 sur la Thr3 permettant la localisation du CPC au centromère et le fonctionnement correct d'Aurora B. L'absence de Haspine dans la cellule provoque des défauts dans l'alignement des chromosomes, la cohésion centromérique et l'intégrité du fuseau mitotique. Le défaut d'alignement des chromosomes en l'absence de Haspine est essentiellement lié à l'activité d'Aurora B et à sa fonction de correction des erreurs de liaison entre microtubules et kinétochores.

Dans cette recherche nous avons montré que l'intégrité centrosomique pendant la mitose est dépendante de l'activité kinase de Haspine. De plus, l'apparition des centrosomes en l'absence d'activité de Haspine est indépendante de la fonction d'Aurora B. D'autre part, dans un test de nucléation de microtubules, nous avons montré dans les cellules déplétées en Haspine une augmentation des nucléations par rapport aux cellules de contrôle. Cet effet surprise a été plus spectaculaire en découvrant que malgré l'augmentation de nucléation des microtubules, nous avons détecté moins de péricentrine au niveau des centrosomes ectopiques dans les cellules déplétées en Haspine. L'ensemble de ces données nous a dirigé vers la recherche d'autres fonctions pour Haspine.

Nous avons trouvé que Nek9 est un substrat phosphorylé par l'Haspine *in vitro*. La double déplétion de Nek9 Haspine dans les cellules a montré une diminution du nombre des cellules ayant des centrosomes ectopiques.

L'ensemble de ces données nous permet de poser l'hypothèse que Haspine a un effet régulateur négatif sur la nucléation des microtubules. De plus, l'activité de Haspine a un effet sur la stabilité ou l'intégrité des centrosomes car elle semble réguler Nek9 en amont.

Il a été montré que dans les cellules déplétées en Haspine, l'intégrité des centrosomes dans la mitose est partiellement liée à la cohésion chromosomique (Dai et al., 2009). Cette cohésion dépend de l'activité d'Aurora B qui phosphoryle le complexe cohésine sur la sous-unité sororine (Nishiyama et al., 2013). Ces modifications conduisent à la dissociation de la sororine de son partenaire de liaison Pds5. Cette dissociation permet l'interaction avec Wapl qui provoque l'ouverture de anneaux de cohésine et la séparation des chromatide sœurs (Shintomi and Hirano, 2009; Sumara et al., 2000) . A l'opposé, nos résultats ont montré que le défaut d'intégrité des centrosomes observé en l'absence de Haspine était majoritairement indépendant de l'activité d'Aurora B. Ceci suggère donc que les défauts de cohésion chromosomique, en réponse à la déplétion de Haspine, ne sont pas majoritairement responsables des anomalies centrosomiques observées. Les deux causes ne sont pas mutuellement exclusives et nos conclusions ainsi que celles de la littérature laissent à penser que les fonctions de Haspine sont multiples.

Nos résultats suggèrent également que ces défauts centrosomiques ne sont pas liés à un problème de cohésion centromérique. En effet, récemment, Zhou et al. ont montré que la cohésion centromérique était protégée par l'interaction entre le domaine N-terminal de Haspine (domaine régulateur sans activité kinase) et la sous-unité Pds5B du complexe cohésine (Figure 18) (Zhou et al., 2017). Cette interaction bloque le site de liaison entre Pds5B et Wapl et, en conséquence, protège la cohésion centromérique jusqu'en début de l'anaphase. Or, nous avons montré, à l'aide d'un inhibiteur spécifique de l'Haspine caractérisé au sein de notre laboratoire (Article 2), que la perte d'intégrité centrosomique était la conséquence d'un défaut de l'activité kinase de Haspine.

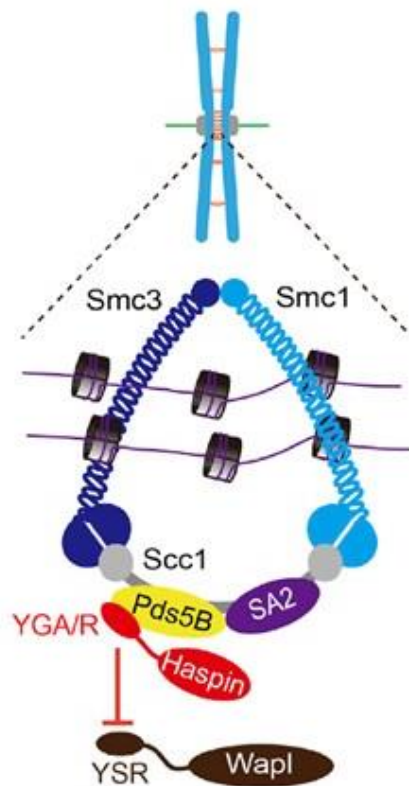


Figure 18, Interaction de la protéine kinase Haspine avec le complexe cohésine. Représentation de l'interaction entre le domaine régulateur de l'Haspine avec Pds5B, qui inhibe l'interaction avec Wapl et protège la cohésion centromérique jusqu'en début d'anaphase. (Zhou et al., 2017)

L'établissement des fuseaux mitotiques et leur maintien est régulé et coordonné par trois voies de nucléation des microtubules : les centrosomes, la chromatine et les microtubules (Figure19) (Prosser and Pelletier, 2017).

L'assemblage des microtubules est une procédure qui commence par le recrutement des dimères alpha- et beta-Tubuline sur la gamma-Tubuline au sein du complexe d'ancrage du gamma-TuRC (Kollman et al., 2011). La péricentrine est aussi un autre membre de ce complexe (Raynaud-Messina and Merdes, 2007; Zheng et al., 1995).

Les expériences de nucléation que nous avons menées sur les cellules déplétées en Haspine ont donné des résultats surprenants. En effet, nous avons observé une augmentation de la nucléation des microtubules en l'absence de Haspine par rapport aux cellules contrôles. De façon concomitante, nous avons observé que la quantité de péricentrine était diminuée, notamment aux niveaux des centrosomes principaux. Malgré cela, il a déjà été montré que la quantité de gamma-Tubuline restait intacte dans les cellules déplétées en Haspine; ce que nous avons également vérifié par ailleurs (Dai et al., 2009). Ces constatations nous ont dirigés vers une hypothèse de régulation négative de la nucléation des microtubules par l'activité Haspine.

Les microtubules se polymérisent et se dépolymérisent en continu, subissant des cycles rapides de croissance et de rétrécissement (Mitchison and Kirschner, 1984). A la vue de nos résultats, nous avons émis l'hypothèse que l'absence de Haspine entrainerait une stabilité accrue des microtubules ou bien la désinhibition d'un acteur positif de la nucléation. La raison de cette stabilité peut s'expliquer par l'existence d'une matrice des protéines aussi appelée " mesh ".

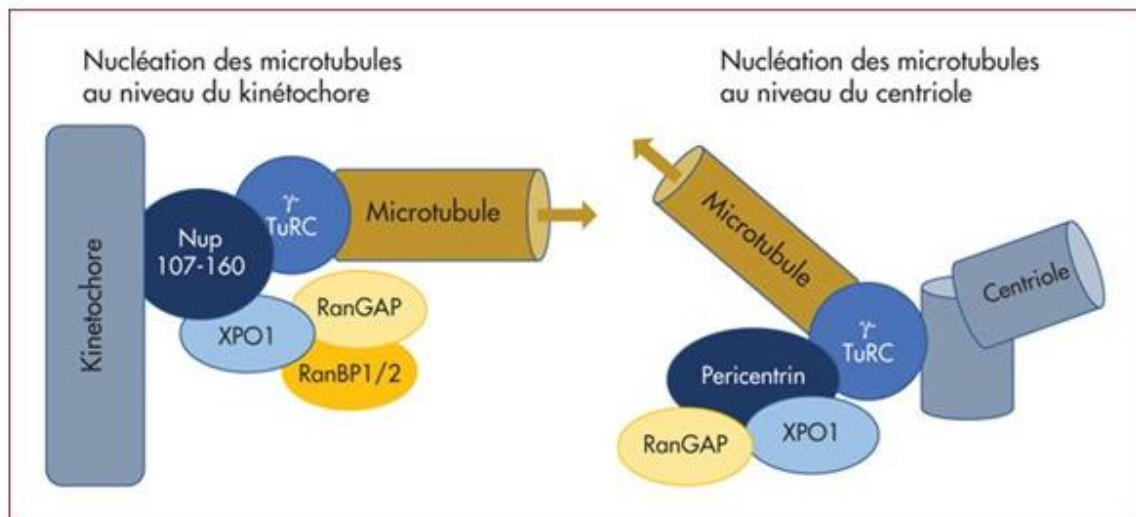


Figure 19. Nucléation des microtubules pendant la mitose. La nucléation des microtubules est réalisée par le recrutement des dimères alpha- et beta-Tubuline sur la gamma-Tubuline au sein du complexe d'ancrage du gamma-TuRC. (Miloudi et al.; 2017)

Cette matrice est composée de différentes protéines comme la clathrine ou les microtubules connecteurs TACC3 (Nixon et al., 2015).

Il a été démontré que les microtubules peuvent être nucléés à partir de chromosomes mitotiques, d'une manière dépendante de RAN-GTP (RAN : RAS-Related Nuclear Protein) et de la gamma-Tubuline (Mahoney et al., 2006). En effet, RAN-GTP, une fois activé par RCC1 au niveau des chromosomes, interagit avec l'Importin α/β , ce qui permet la libération des protéines nécessaires à la nucléation des microtubules au niveau des chromosomes et des kinétochores (figure 20). Il est remarquable de noter que RCC1 libre dans le cytoplasme se lie à RAN ou RANBP1 (RAN binding protein1) empêchant la nucléation ectopique des microtubules (Fleuren et al., 2016). Dans les cellules déplétées en Haspine nous avons observé une nette nucléation chromosomique qui n'est pas détectable dans les cellules contrôles dans lesquelles la nucléation centrosomale est dominante. Cette nucléation chromosomique pourrait être liée à une régulation négative du system RAN-GTP par Haspine. Ce système étant indépendant de d'Aurora B (Prosser and Pelletier, 2017).

Le phénotype de MTOC ectopiques indépendants de l'activité d'Aurora B dans les cellules déplétées en Haspine nous conduit à chercher d'autres fonctions associées à l'activité de Haspine par l'indentification de nouveaux substrats. A l'aide d'un test kinase *in vitro* sur des puces à protéines, nous avons identifié la protéine kinase Nek9 comme substrat de Haspine. Il a été montré que Nek9 est nécessaire à la nucléation des microtubules, à la migration et à la maturation des centrosomes ainsi qu'à l'organisation des fuseaux mitotiques (Roig et al., 2005). Nek9 phosphoryle NEDD1 dans le complexe gamma-TuRC, qui permet le recrutement de la gamma-Tubuline et favorise la nucléation des microtubules (Sdelci et al., 2012).

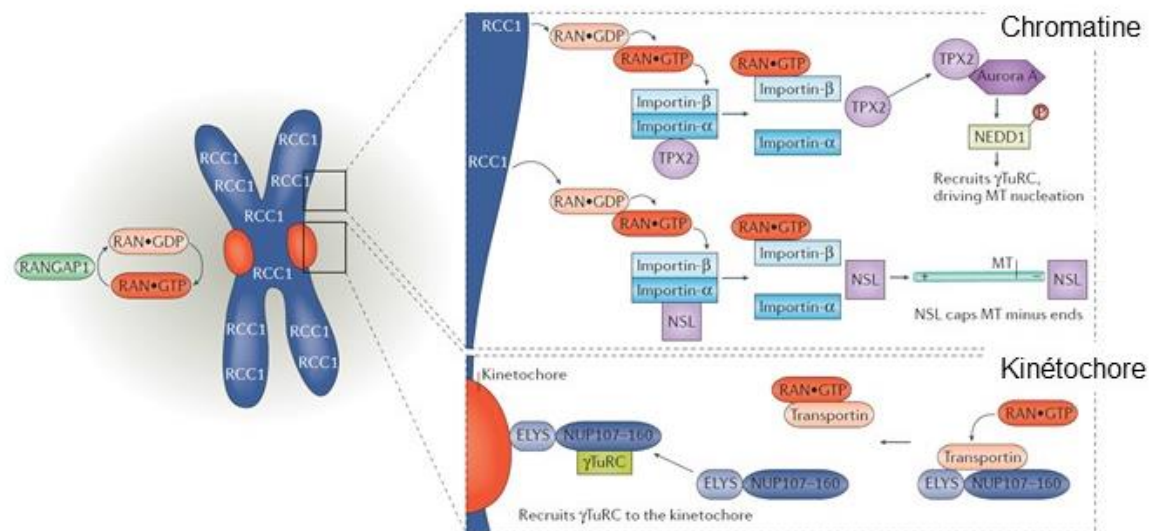


Figure 20. Nucléation des microtubules à partir de la chromatine. La nucléation des microtubules à partir de la chromatine est liée à un gradient de RAN-GDP contrôlé par la GEF (guanine exchange factor) RCC1 située sur les chromosome et RANGAP1 cytosolique. RAN-GDP est transformé en RAN-GTP qui interagit avec Importin-beta, qui va libérer les composants nécessaires à la nucléation des microtubules. (Prosser et al.; 2017)

Il est important de noter que Nek9 possède un domaine C-terminal non-catalytique contenant sept répétitions équivalentes à celles de la RAN-GEF, RCC1 ainsi qu'un domaine coiled-coil. Nek9 se lie spécifiquement à la RAN-GTPase par l'intermédiaire de ses domaines catalytiques et RCC1(Roig et al., 2002). Nek9 est donc considéré comme un régulateur positif de la nucléation. Nos données suggèrent que Haspine et Nek9 ont des fonctions opposées dans la nucléation des microtubules, ce qui renforce notre hypothèse selon laquelle Haspine pourrait être un régulateur négatif de la nucléation. La nature de la relation entre Haspine et Nek9 n'est pas encore connue mais le fait que Haspine phosphoryle Nek9 *in vitro* nous laisse penser qu'elle pourrait agir en amont et réguler négativement l'activité de Nek9. Nous avons recherché les sites de phosphorylation de Haspine sur Nek9 par spectrométrie de masse.

Pour cela deux tests ont été réalisés parallèlement, le premier en la seule présence de Nek9, et le deuxième en présence de Haspine et de Nek9. En la seule présence de Nek9, les résultats révèlent 7 sites de phosphorylation, très probablement liés à l'autophosphorylation de Nek9 (Y288 ; T322 ; T415 ; T421 ; T556 ; T571 ; T692). En présence de Haspine, 8 sites potentiels spécifiques ont été identifiés : S249 ; S252 ; S256 ; S258 ; S264 ; S265 ; S271 et T562 en plus de certains sites attribués à l'autophosphorylation de Nek9.

De façon inattendue, ces résultats montrent, en présence de Haspine, l'absence de plus de la moitié des sites autophosphorylés par Nek9 (Y288, T322, T415, T421, T556). Ces résultats peuvent être expliqués par un effet inhibiteur de Haspine sur l'activité de Nek9. Ils demandent à être confirmés en utilisant un substrat spécifique de Nek9.

Pour aller plus loin et confirmer ces résultats, nous allons comparer les mutations des résidus phosphorylés par Haspine sur Nek9 à des sites non phosphorylables et

phosphomimétiques. Ceci afin de surexprimer ces protéines mutées dans les cellules en présence ou en absence de Nek9 endogène, d'analyser et de comparer les résultats avec les cellules déplétées en Haspine.

Une immuno-précipitation de GFP-Haspine sur des extraits de centrosomes purifiés va être également réalisée afin de rechercher une interaction entre les deux protéines.

D'autre part, nous avons essayé de visualiser les effets de la déplétion de Haspine sur la localisation de Nek9 pendant la mitose. L'expérience a été effectuée avec un marquage Phospho-Thr210 Nek9, issu de la phosphorylation de Nek9 par Plk1 en début de mitose. Les résultats montrent la présence de Nek9 phosphorylé au niveau des centrosomes ectopiques dans les cellules déplétées en Haspine. Mais une autre découverte a attiré notre attention : une localisation de phospho Nek9 au niveau des centromères dans les cellules contrôle qui est difficilement détectable dans les cellules déplétées en Haspine (Figure 21).

Bien que ces résultats soient au stade préliminaire, nous pouvons les confirmer par des expériences complémentaires telles que l'analyse de la présence de Nek9 sur les centromères sur des étalements de chromosomes.

D'autre part, Nek9 régule la migration des centrosomes par l'activation de Nek6, Nek7 et ensuite d'Eg5 (Fry et al., 2012). Il a été montré que dans les cellules déplétées en Haspine, l'inhibition de Eg5 par le monastrol évite la formation de centrosomes ectopiques (Higgins, 2010). Cet effet peut être une indication supplémentaire de la régulation négative par Haspine de cette voie. L'Haspine pourrait avoir un effet direct sur les différentes kinases de la voie d'activation d'Eg5 ou agir directement sur Nek9.

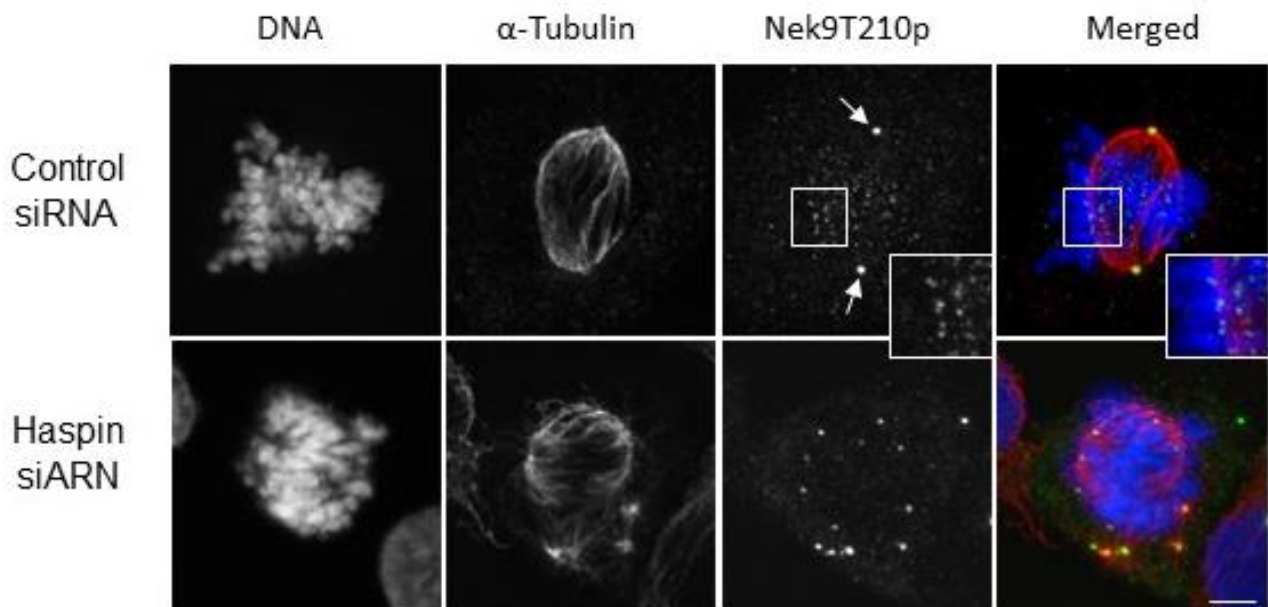


Figure 21. Présence de Nek9 au centromère. Les images prises par microscopie à fluorescence montrent les cellules U-2 OS en prométaphase dans deux conditions : Contrôle et dépléter en Haspine. Les cellules ont été immuno-marquées par un anti alpha-tubuline (Rouge), Anti phospho Thr210 Nek9 (vert) et l'ADN a été marqué par le DAPI (bleu).

Pourvue d'un site catalytique atypique, l'Haspine présente une structure quaternaire offrant de nouvelles perspectives de ciblage en chimie médicinale anticancéreuse.

Les projets de recherche ainsi consacrés à la découverte d'inhibiteurs de cette nouvelle cible thérapeutique potentielle dégagent un espace chimique anti-cancéreux en essor.

Haspine, par la phosphorylation de la Thr3 de l'Histone H3, contrôle la localisation du CPC et donc l'activité d'Aurora B et son rôle essentiel à la mitose. Cela est intéressant car l'inhibition de Haspine a un effet indirect et ponctuel sur l'activité d'Aurora B. Il est à noter qu'Aurora B possède des substrats différents et qu'elle intervient à différents niveaux du cycle cellulaire (Ruchaud et al 2007), donc inhibition d'Aurora B a un effet général sur la cycle cellulaire, quelle que chose qui diminue la précision de ciblage de son activité dans le cadre de traitement contre cancer. De plus des résistances à des traitements avec l'inhibiteur d'Aurora B émergé par exemple la résistance de ligné carcinoma MiaPaCa pancreatic contre traitement avec AZD1152, ce qui rend l'inhibiteur d'Aurora B moins intéressant (Guo et al., 2012).

Nous avons caractérisé une nouvelle série de petites molécules inhibitrices de l'Haspine, comprenant une structure imidazopyridine, et dérivée du CHR-6494, un inhibiteur connu (Hurtance 2012). Nos meilleures molécules montrent une activité inhibitrice avec une IC_{50} sur l'Haspine dans le nano molaire. A l'opposé de la molécule de référence, elles n'induisent pas un arrêt du cycle cellulaire en G2/M. indiquant une meilleure sélectivité par rapport à la molécule de base.

De plus, il a été démontré que nos produits ne présentent pas d'instabilité, a contrario de l'inhibiteur de référence de cette étude le CHR6494.

Le meilleur composé de la série, le JE255, s'est avéré être un excellent outil pour analyser le fonctionnement de l'Haspine dans la cellule. Le traitement des cellules avec cet inhibiteur reproduit les phénotypes induits par la déplétion de Haspine sans phénotype additionnel visible. Ce résultat indique une bonne sélectivité malgré le fait qu'il n'ait été testé que sur 14 kinases. Afin de poursuivre la caractérisation du JE255, il sera nécessaire de tester son activité sur un panel plus large de kinases (kinome scan). Les SAR (Structure Activity Relationship) sont toujours en cours sur notre série de composés et nous envisageons maintenant de poursuivre la caractérisation de nos meilleurs hits en testant leurs propriétés anti-tumorales sur plusieurs modèles de souris *nude* xénogreffées. De même, les composés les plus prometteurs seront soumis à une analyse ADME-Tox (absorption, distribution, métabolisme, excrétion, toxicité). Ces analyses sont des prérequis qui vont nous permettre de mener notre série chimique vers un stade pré-clinique.

L'Ensemble de nos résultats montre que la fonction Haspine, en plus d'avoir un effet sur la fonction d'Aurora B, agit sur l'intégrité des centrosomes et la nucléation des microtubules. Ces nouvelles découvertes peuvent être liées à la régulation de Nek9 par Haspine (voir figure 22). De plus, nous avons caractérisé une nouvelle série de petites molécules inhibitrices de Haspine dérivées de la molécule CHR6494, avec une amélioration de sélectivité et affinité pour la kinase Haspine.

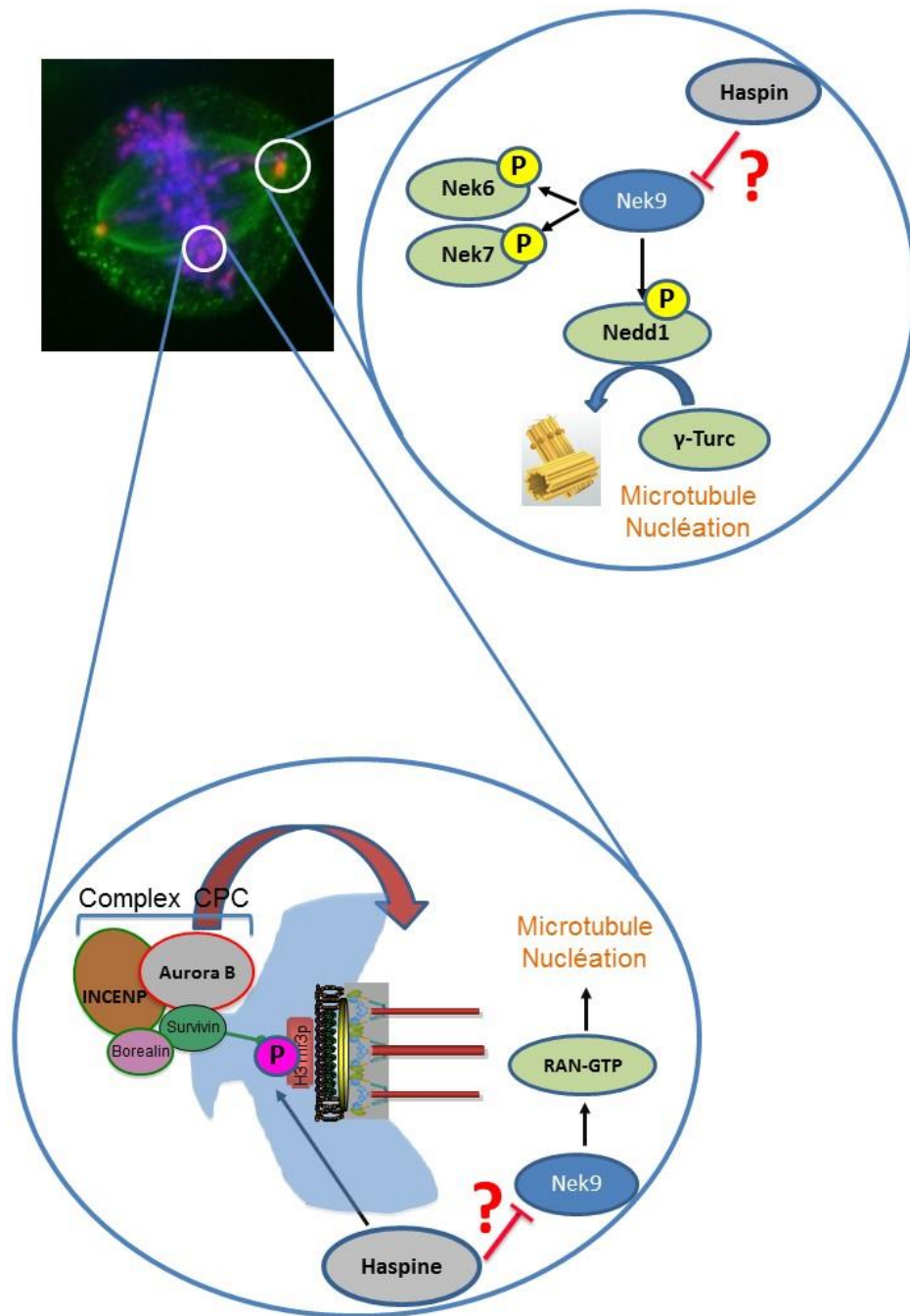


Figure 22. Régulation Négative de la nucléation des microtubules par Haspine.
Modèle implication de l'Haspine dans le contrôle négatif de la nucléation des microtubules aux centrosomes et sur les chromosomes.

Références bibliographiques

- Acquaviva, C., and Pines, J. (2006). The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *J. Cell Sci.* **119**, 2401–2404.
- Adams, J., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–1337.
- Adams, R.R., Wheatley, S.P., Gouldsworthy, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D.L., and Earnshaw, W.C. (2000). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr. Biol. CB* **10**, 1075–1078.
- Anderson, D.E., Losada, A., Erickson, H.P., and Hirano, T. (2002). Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J. Cell Biol.* **156**, 419–424.
- Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 9–18.
- Avidor-Reiss, T., and Gopalakrishnan, J. (2013). Cell Cycle Regulation of the Centrosome and Cilium. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* **10**, e119–e124.
- Baeriswyl, V., and Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 329–337.
- Bakhoun, S.F., Thompson, S.L., Manning, A.L., and Compton, D.A. (2009). Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat. Cell Biol.* **11**, 27–35.
- Balboula, A.Z., Nguyen, A.L., Gentilello, A.S., Quartuccio, S.M., Drutovic, D., Solc, P., and Schindler, K. (2016). Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. *J Cell Sci* **129**, 3648–3660.
- Barber, T.D., McManus, K., Yuen, K.W.Y., Reis, M., Parmigiani, G., Shen, D., Barrett, I., Nouhi, Y., Spencer, F., Markowitz, S., et al. (2008). Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 3443–3448.
- Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2004). Control of the SCFSkp2–Cks1 ubiquitin ligase by the APC/CCdh1 ubiquitin ligase. *Nature* **428**, 190–193.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., and Conti, E. (2003). Structural Basis of Aurora-A Activation by TPX2 at the Mitotic Spindle. *Mol. Cell* **12**, 851–862.
- Bayliss, R., Fry, A., Haq, T., and Yeoh, S. (2012). On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation. *Open Biol.* **2**, 120136–120136.
- Belham, C., Roig, J., Caldwell, J.A., Aoyama, Y., Kemp, B.E., Comb, M., and Avruch, J. (2003). A Mitotic Cascade of NIMA Family Kinases Nercc1/Nek9 ACTIVATES THE Nek6 AND Nek7 KINASES. *J. Biol. Chem.* **278**, 34897–34909.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 401–410.

- Bertran, M.T., Sdelci, S., Regué, L., Avruch, J., Caelles, C., and Roig, J. (2011). Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *EMBO J.* 30, 2634–2647.
- Bhola, N.E., Jansen, V.M., Bafna, S., Giltane, J.M., Balko, J.M., Estrada, M.V., Meszoely, I., Mayer, I., Abramson, V., Ye, F., et al. (2015). Kinome-wide functional screen identifies role of PLK1 in hormone-independent, ER-positive breast cancer. *Cancer Res.* 75, 405–414.
- Black, B.E., Foltz, D.R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V.L., and Cleveland, D.W. (2004). Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* 430, 578–582.
- Blagden, S.P., and Glover, D.M. (2003). Polar expeditions — provisioning the centrosome for mitosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 505–511.
- Blagosklonny, M.V. (1999). A node between proliferation, apoptosis, and growth arrest. *BioEssays* 21, 704–709.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.
- Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., and Hirth, P. (2012). Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 873–886.
- Boonstra, J. (2003). Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle. *J. Cell. Biochem.* 90, 244–252.
- Bornens, M., and Azimzadeh, J. (2007). Origin and Evolution of the Centrosome. In *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton*, (Springer, New York, NY), pp. 119–129.
- Brinkley, B.R. (2001). Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol.* 11, 18–21.
- Brown, J.R., Koretke, K.K., Birkeland, M.L., Sanseau, P., and Patrick, D.R. (2004). Evolutionary relationships of Aurora kinases: Implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evol. Biol.* 4, 39.
- Burkhardt, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* 8, 671–682.
- Cárcer, G. de, Manning, G., and Malumbres, M. (2011). From Plk1 to Plk5. *Cell Cycle* 10, 2255–2262.
- de Cárcer, G., Manning, G., and Malumbres, M. (2011). From Plk1 to Plk5. *Cell Cycle* 10, 2255–2262.
- Chan, C., and Botstein, D. (1993). Isolation and Characterization of Chromosome-Gain and Increase-in-Ploidy Mutants in Yeast. *Genetics* 135, 677–691.
- Cheeseman, I.M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E.M., Kang, J. seog, Yates, J.R., Chan, C.S.M., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2002). Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* 111, 163–172.
- Cheng, L., Bucciarelli, B., Liu, J., Zinn, K., Miller, S., Patton-Vogt, J., Allan, D., Shen, J., and Vance, C.P. (2011). White Lupin Cluster Root Acclimation to Phosphorus Deficiency and Root

Hair Development Involve Unique Glycerophosphodiester Phosphodiesterases1[W][OA]. *Plant Physiol.* 156, 1131–1148.

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. (2008). TGF- β signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res. MCR* 6, 1521–1533.

Cimini, D. (2008). Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1786, 32–40.

Cizmecioglu, O., Warnke, S., Arnold, M., Duensing, S., and Hoffmann, I. (2008). Plk2 regulated centriole duplication is dependent on its localization to the centrosome and a functional polo-box domain. *Cell Cycle* 7, 3548–3555.

Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* 25, 596–601.

Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., Kaminker, J., and Ferrara, N. (2009). PDGF-C Mediates the Angiogenic and Tumorigenic Properties of Fibroblasts Associated with Tumors Refractory to Anti-VEGF Treatment. *Cancer Cell* 15, 21–34.

Dai, J., Sullivan, B.A., and Higgins, J.M.G. (2006). Regulation of Mitotic Chromosome Cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev. Cell* 11, 741–750.

Dai, J., Kateneva, A.V., and Higgins, J.M.G. (2009). Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J. Cell Sci.* 122, 4168–4176.

Delgehyr, N., Sillibourne, J., and Bornens, M. (2005). Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. *J Cell Sci* 118, 1565–1575.

DeLuca, J.G., Gall, W.E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2006). Kinetochore Microtubule Dynamics and Attachment Stability Are Regulated by Hec1. *Cell* 127, 969–982.

Deshpande, A., Sicinski, P., and Hinds, P.W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909–2915.

Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S.S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* 161, 267–280.

Draetta, G.F. (1997). Cell cycle: Will the real Cdk-activating kinase please stand up. *Curr. Biol.* 7, R50–R52.

Dumont, S., and Mitchison, T.J. (2009). Compression regulates mitotic spindle length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr. Biol. CB* 19, 1086–1095.

Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouché, J.-P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., et al. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2–M transition. *J. Cell Sci.* 117, 2523–2531.

Elia, A.E.H., Rellos, P., Haire, L.F., Chao, J.W., Ivins, F.J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., and Yaffe, M.B. (2003a). The Molecular Basis for

Phosphodependent Substrate Targeting and Regulation of Plks by the Polo-Box Domain. *Cell* 115, 83–95.

Elia, A.E.H., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B. (2003b). Proteomic Screen Finds pSer/pThr-Binding Domain Localizing Plk1 to Mitotic Substrates. *Science* 299, 1228–1231.

Feldman, J.L., Geimer, S., and Marshall, W.F. (2007). The Mother Centriole Plays an Instructive Role in Defining Cell Geometry. *PLOS Biol.* 5, e149.

Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.

Fisher, D.L., and Nurse, P. (1996). A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J.* 15, 850–860.

Fleuren, E.D.G., Zhang, L., Wu, J., and Daly, R.J. (2016). The kinome “at large” in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 83–98.

Foley, E.A., Maldonado, M., and Kapoor, T.M. (2011). Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat. Cell Biol.* 13, 1265–1271.

Fry, A.M., O'Regan, L., Sabir, S.R., and Bayliss, R. (2012). Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *J. Cell Sci.* 125, 4423–4433.

Ganem, N.J., Godinho, S.A., and Pellman, D. (2009). A Mechanism Linking Extra Centrosomes to Chromosomal Instability. *Nature* 460, 278–282.

Gavet, O., and Pines, J. (2010). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev. Cell* 18, 533–543.

Ghenoiu, C., Wheelock, M.S., and Funabiki, H. (2013). Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Mol. Cell* 52.

Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M.J., Raff, J.W., Prigent, C., and Glover, D.M. (2002). Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J. Cell Biol.* 156, 437–451.

Giménez-Abián, J.F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Regulation of Sister Chromatid Cohesion between Chromosome Arms. *Curr. Biol.* 14, 1187–1193.

Giráldez, S., Galindo-Moreno, M., Limón-Mortés, M.C., Rivas, A.C., Herrero-Ruiz, J., Mora-Santos, M., Sáez, C., Japón, M.Á., Tortolero, M., and Romero, F. (2017). G1/S phase progression is regulated by PLK1 degradation through the CDK1/βTrCP axis. *FASEB J.* 31, 2925–2936.

Golsteyn, R.M., Mundt, K.E., Fry, A.M., and Nigg, E.A. (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J Cell Biol.* 1995 Jun;129(6):1617-28. PubMed PMID:7790358; PubMed Central PMCID: PMC2291169.

Gómez-Escoda, B., and Wu, P.-Y.J. (2017). Roles of CDK and DDK in Genome Duplication and Maintenance: Meiotic Singularities. *Genes* 8.

- Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E.A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K., and Inagaki, M. (2003). Aurora-B Regulates the Cleavage Furrow-specific Vimentin Phosphorylation in the Cytokinetic Process. *J. Biol. Chem.* 278, 8526–8530.
- Grill, S.W., and Hyman, A.A. (2005). Spindle Positioning by Cortical Pulling Forces. *Dev. Cell* 8, 461–465.
- Gruneberg, U., Neef, R., Li, X., Chan, E.H.Y., Chalamalasetty, R.B., Nigg, E.A., and Barr, F.A. (2006). KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *J. Cell Biol.* 172, 363–372.
- Guery, T., Roumier, C., Berthon, C., Renneville, A., Preudhomme, C., and Quesnel, B. (2015). B7-H3 protein expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Med.* 4, 1879–1883.
- Guo, Y., Kim, C., Ahmad, S., Zhang, J., and Mao, Y. (2012). CENP-E-dependent BubR1 autophosphorylation enhances chromosome alignment and the mitotic checkpoint. *J Cell Biol.* 2012 Jul 23;198(2):205-17. doi: 10.1083/jcb.201202152. Epub 2012 Jul 16. PubMed PMID: 22801780; PubMed Central PMCID: PMC3410423.
- Habedanck, R., Stierhof, Y.-D., Wilkinson, C.J., and Nigg, E.A. (2005). The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat. Cell Biol.* 7, 1140.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanks, S., Coleman, K., Reid, S., Plaja, A., Firth, H., FitzPatrick, D., Kidd, A., Méhes, K., Nash, R., Robin, N., et al. (2004). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in *BUB1B*. *Nat. Genet.* 2004 Nov;36(11):1159-61. Epub 2004 Oct 10. PubMed PMID: 15475955.
- Haren, L., Remy, M.-H., Bazin, I., Callebaut, I., Wright, M., and Merdes, A. (2006). NEDD1-dependent recruitment of the γ -tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly. *J. Cell Biol.* 172, 505–515.
- Hauf, S., Cole, R.W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C.L., and Peters, J.-M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* 161, 281–294.
- Higgins, J.M.G. (2010). Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior. *Chromosoma* 119, 137–147.
- Hirano, T. (2005). SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 507–514.
- Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.-H., and Peters, J.-M. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 438, 1176–1180.
- Hu, H.-M., Chuang, C.-K., Lee, M.-J., Tseng, T.-C., and Tang, T.K. (2000). Genomic Organization, Expression, and Chromosome Localization of a Third Aurora-Related Kinase Gene, Aie1. *DNA Cell Biol.* 19, 679–688.

- Hubbard, S.R. (1997). Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J.* **16**, 5572–5581.
- Hubbard, S.R., and Till, and J.H. (2000). Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 373–398.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225–236.
- Huse, M., and Kuriyan, J. (2002). The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* **109**, 275–282.
- Ivanov, D., and Nasmyth, K. (2005). A Topological Interaction between Cohesin Rings and a Circular Minichromosome. *Cell* **122**, 849–860.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., and Thun, M.J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA. Cancer J. Clin.* **57**, 43–66.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., et al. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* **321**, 1801–1806.
- Junttila, M.R., and Evan, G.I. (2009). p53 — a Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 821–829.
- Kazerounian, S., Yee, K.O., and Lawler, J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **65**, 700–712.
- Kimura, K., Rybenkov, V.V., Crisona, N.J., Hirano, T., and Cozzarelli, N.R. (1999). 13S Condensin Actively Reconfigures DNA by Introducing Global Positive Writhe: Implications for Chromosome Condensation. *Cell* **98**, 239–248.
- Kimura, M., Kotani, S., Hattori, T., Sumi, N., Yoshioka, T., Todokoro, K., and Okano, Y. (1997). Cell Cycle-dependent Expression and Spindle Pole Localization of a Novel Human Protein Kinase, Aik, Related to Aurora of *Drosophila* and Yeast Ipl1. *J. Biol. Chem.* **272**, 13766–13771.
- Knowlton, A.L., Lan, W., and Stukenberg, P.T. (2006). Aurora B Is Enriched at Merotelic Attachment Sites, Where It Regulates MCAK. *Curr. Biol.* **16**, 1705–1710.
- Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., and Agard, D.A. (2011). Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 709–721.
- La Terra, S., English, C.N., Hergert, P., McEwen, B.F., Sluder, G., and Khodjakov, A. (2005). The de novo centriole assembly pathway in HeLa cells. *J. Cell Biol.* **168**, 713–722.
- LaRonde-LeBlanc, N., and Wlodawer, A. (2004). Crystal Structure of *A. fulgidus* Rio2 Defines a New Family of Serine Protein Kinases. *Structure* **12**, 1585–1594.
- Levitzki, A. (2013). Tyrosine Kinase Inhibitors: Views of Selectivity, Sensitivity, and Clinical Performance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 161–185.
- Lin, J.-K., Chang, S.-C., Yang, Y.-C., and Li, A.F.-Y. (2003). Loss of heterozygosity and DNA aneuploidy in colorectal adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **10**, 1086–1094.
- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., and Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J. Cell Biol.* **185**, 193–202.

- Ling, H., Hanashiro, K., Luong, T.H., Benavides, L., and Fukasawa, K. (2015). Functional relationship among PLK2, PLK4 and ROCK2 to induce centrosome amplification. *Cell Cycle* **14**, 544–553.
- Lipp, J.J., Hirota, T., Poser, I., and Peters, J.-M. (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J. Cell Sci.* **120**, 1245–1255.
- Mac Gabhann, F., and Popel, A.S. (2008). Systems Biology of Vascular Endothelial Growth Factors. *Microcirc. N. Y. N* **15**, 715–738.
- Maderspacher, F. (2008). Theodor Boveri and the natural experiment. *Curr. Biol.* **18**, R279–R286.
- Mahoney, N.M., Goshima, G., Douglass, A.D., and Vale, R.D. (2006). Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Curr. Biol. CB* **16**, 564–569.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 630–641.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.-H., and Wolgemuth, D.J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1275–1276.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **298**, 1912–1934.
- Mao, Y., Abrieu, A., and Cleveland, D.W. (2003). Activating and Silencing the Mitotic Checkpoint through CENP-E-Dependent Activation/Inactivation of BubR1. *Cell* **114**, 87–98.
- Mao, Y., Desai, A., and Cleveland, D.W. (2005). Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling. *J. Cell Biol.* **170**, 873–880.
- Mardin, B.R., Agircan, F.G., Lange, C., and Schiebel, E. (2011). Plk1 Controls the Nek2A-PP1 γ Antagonism in Centrosome Disjunction. *Curr. Biol.* **21**, 1145–1151.
- Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., and Saya, H. (2003). Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic Events in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 51786–51795.
- Matsuura, S., Matsumoto, Y., Morishima, K., Izumi, H., Matsumoto, H., Ito, E., Tsutsui, K., Kobayashi, J., Tauchi, H., Kajiwar, Y., et al. (2006). Monoallelic BUB1B mutations and defective mitotic-spindle checkpoint in seven families with premature chromatid separation (PCS) syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* **140A**, 358–367.
- Matthew, E.M., Yen, T.J., Dicker, D.T., Dorsey, J.F., Yang, W., Navaraj, A., and El-Deiry, W.S. (2007). Replication Stress, Defective S-phase Checkpoint and Increased Death in Plk2-Deficient Human Cancer Cells. *Cell Cycle* **6**, 2571–2578.
- McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L., Morphew, M., Efremov, A.K., Zhudenzov, K., Volkov, V.A., Cheeseman, I.M., Desai, A., Mastronarde, D.N., and Ataullakhanov, F.I. (2008). Fibrils connect microtubule tips with kinetochores suggesting ways to couple tubulin dynamics to chromosome motion. *Cell* **135**, 322–333.
- McNally, F.J. (2013). Mechanisms of spindle positioning. *J. Cell Biol.* **200**, 131–140.

- Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tono-zuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., et al. (2003). Phosphorylation by Aurora B Converts MgcRacGAP to a RhoGAP during Cytokinesis. *Dev. Cell* 4, 549–560.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 312–317.
- Morris, N. (1976). Morris, N. R. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* 26, 237–254. *Genet. Res.* 26, 237–254.
- Murata-Hori, M., Fumoto, K., Fukuta, Y., Iwasaki, T., Kikuchi, A., Tatsuka, M., and Hosoya, H. (2000). Myosin II Regulatory Light Chain as a Novel Substrate for AIM-1, an Aurora/Ipllp-related Kinase from Rat. *J. Biochem. (Tokyo)* 128, 903–907.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, nrm2163.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2003). Identification of a Consensus Motif for Plk (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate*. *J. Biol. Chem.* 278, 25277–25280.
- Nam, H.-J., Naylor, R., and van Deursen, J.M. (2015). Centrosome dynamics as a source of chromosomal instability. *Trends Cell Biol.* 25, 65–73.
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E.A., Mayer, T.U., and Barr, F.A. (2003). Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J. Cell Biol.* 162, 863–876.
- Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 21–32.
- Nigg, E.A. (2006). Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int. J. Cancer* 119, 2717–2723.
- Nishiyama, T., Sykora, M.M., Huis in 't Veld, P.J., Mechtler, K., and Peters, J.-M. (2013). Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13404–13409.
- Nixon, F.M., Gutiérrez-Caballero, C., Hood, F.E., Booth, D.G., Prior, I.A., and Royle, S.J. (2015). The mesh is a network of microtubule connectors that stabilizes individual kinetochore fibers of the mitotic spindle. *eLife* 4.
- Panic, M., Hata, S., Neuner, A., and Schiebel, E. (2015). The Centrosomal Linker and Microtubules Provide Dual Levels of Spatial Coordination of Centrosomes. *PLoS Genet.* 11.
- Pardee, A.B. (1974). A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1286.
- Pardee, A.B. (1986). Biochemical and molecular events regulating cell proliferation. *J. Pathol.* 149, 1–2.
- Park, J.-E., Soung, N.-K., Yoshikazu, J., Kang, Y.H., Liao, C., Lee, K.H., Park, C.H., Nicklaus, M.C., and Lee, K.S. (2010). Polo-Box Domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 1957–1970.

Pearson, R.B., and Kemp, B.E. (1991). [3] Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: Tabulations. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 62–81.

Peters, J.-M. (2002). The Anaphase-Promoting Complex: Proteolysis in Mitosis and Beyond. *Mol. Cell* 9, 931–943.

Peters, J.-M., and Nishiyama, T. (2012). Sister Chromatid Cohesion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011130.

Piehl, M., Tulu, U.S., Wadsworth, P., and Cassimeris, L. (2004). Centrosome maturation: Measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1584–1588.

Pommier, Y., and Kohn, K.W. (2003). Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles thérapeutiques. *médecine/sciences* 19, 173–186.

Prosser, S.L., and Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 187–201.

Putkey, F.R., Cramer, T., Morphew, M.K., Silk, A.D., Johnson, R.S., McIntosh, J.R., and Cleveland, D.W. (2002). Unstable Kinetochore-Microtubule Capture and Chromosomal Instability Following Deletion of CENP-E. *Dev. Cell* 3, 351–365.

Rannou, Y., Salaun, P., Benaud, C., Khan, J., Dutertre, S., Giet, R., and Prigent, C. (2012). MNK1 kinase activity is required for abscission. *J Cell Sci* 125, 2844–2852.

Rapley, J., Nicolàs, M., Groen, A., Regué, L., Bertran, M.T., Caelles, C., Avruch, J., and Roig, J. (2008). The NIMA-family kinase Nek6 phosphorylates the kinesin Eg5 at a novel site necessary for mitotic spindle formation. *J. Cell Sci.* 121, 3912–3921.

Raynaud-Messina, B., and Merdes, A. (2007). Gamma-tubulin complexes and microtubule organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 24–30.

Robbins, E., and Gonatas, N.K. (1964). The ultrastructure of a mammalian cell during the mitotic cycle. *J. Cell Biol.* 21, 429.

Roig, J., Mikhailov, A., Belham, C., and Avruch, J. (2002). Nercc1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes Dev.* 16, 1640–1658.

Roig, J., Groen, A., Caldwell, J., and Avruch, J. (2005). Active Nercc1 protein kinase concentrates at centrosomes early in mitosis and is necessary for proper spindle assembly. *Mol. Biol. Cell* 16, 4827–4840.

Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., et al. (2001). Relation of Gene Expression Phenotype to Immunoglobulin Mutation Genotype in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Exp. Med.* 194, 1639–1648.

Roshak, A.K., Capper, E.A., Imburgia, C., Fornwald, J., Scott, G., and Marshall, L.A. (2000). The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell. Signal.* 12, 405–411.

Roskoski, R. (2016). Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* 103, 26–48.

- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 798–812.
- Rudner, A.D., and Murray, A.W. (2000). Phosphorylation by Cdc28 Activates the Cdc20-Dependent Activity of the Anaphase-Promoting Complex. *J. Cell Biol.* 149, 1377–1390.
- Salaün, P., Rannou, Y., and Prigent, C. (2008). Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards. *Adv. Exp. Med. Biol.* 617, 41–56.
- Salisbury, J.L., Suino, K.M., Busby, R., and Springett, M. (2002). Centrin-2 Is Required for Centriole Duplication in Mammalian Cells. *Curr. Biol.* 12, 1287–1292.
- Sang, M., Ando, K., Okoshi, R., Koida, N., Li, Y., Zhu, Y., Shimoizato, O., Geng, C., Shan, B., Nakagawara, A., et al. (2009). Plk3 inhibits pro-apoptotic activity of p73 through physical interaction and phosphorylation. *Genes Cells* 14, 775–788.
- Sardon, T., Peset, I., Petrova, B., and Vernos, I. (2008). Dissecting the role of Aurora A during spindle assembly. *EMBO J.* 27, 2567–2579.
- Sasai, K., Katayama, H., Stenoien, D.L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Nigg, E.A., et al. (2004). Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 59, 249–263.
- Saudemont, A., and Quesnel, B. (2004). In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood* 104, 2124–2133.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2000). Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. *Science* 289, 1938–1942.
- Sdelci, S., Schütz, M., Pinyol, R., Bertran, M.T., Regué, L., Caelles, C., Vernos, I., and Roig, J. (2012). Nek9 phosphorylation of NEDD1/GCP-WD contributes to Plk1 control of γ -tubulin recruitment to the mitotic centrosome. *Curr. Biol.* CB 22, 1516–1523.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.-Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008). Bora and Aurora A Cooperatively Activate Plk1 and Control the Entry into Mitosis. *Science* 320, 1655–1658.
- Seong, Y.-S., Kamijo, K., Lee, J.-S., Fernandez, E., Kuriyama, R., Miki, T., and Lee, K.S. (2002). A Spindle Checkpoint Arrest and a Cytokinesis Failure by the Dominant-negative Polo-box Domain of Plk1 in U-2 OS Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 32282–32293.
- Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 35036093.
- Shintomi, K., and Hirano, T. (2009). Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev.* 23, 2224–2236.
- Silk, A.D., Holland, A.J., and Cleveland, D.W. (2009). Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *J. Cell Biol.* 184, 677–690.
- Silkworth, W.T., Nardi, I.K., Scholl, L.M., and Cimini, D. (2009). Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. In *PLoS ONE*. 4:e6564. <http://Dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006564> Sillibourne, J.E, p.

Skibbens, R.V. (2000). Holding Your Own: Establishing Sister Chromatid Cohesion. *Genome Res.* 10, 1664–1671.

Smith, E., Hégarat, N., Vesely, C., Roseboom, I., Larch, C., Streicher, H., Straatman, K., Flynn, H., Skehel, M., Hirota, T., et al. (2011). Differential control of Eg5-dependent centrosome separation by Plk1 and Cdk1. *EMBO J.* 30, 2233–2245.

Snape, K., Hanks, S., Ruark, E., Barros-Núñez, P., Elliott, A., Murray, A., Lane, A.H., Shannon, N., Callier, P., Chitayat, D., et al. (2011). Mutations in CEP57 cause mosaic variegated aneuploidy syndrome. *Nat. Genet.* 43, 527–529.

Solomon, D.A., Kim, T., Diaz-Martinez, L.A., Fair, J., Elkahouloun, A.G., Harris, B.T., Toretsky, J.A., Rosenberg, S.A., Shukla, N., Ladanyi, M., et al. (2011). Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science* 333, 1039–1043.

Sotillo, R., Schwartzman, J.-M., Socci, N.D., and Benezra, R. (2010). Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumor relapse after oncogene withdrawal. *Nature* 464, 436–440.

Stewart, Z.A., Westfall, M.D., and Pietsenpol, J.A. (2003). Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 139–145.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B.H., and Peters, J.-M. (2000). Characterization of Vertebrate Cohesin Complexes and Their Regulation in Prophase. *J. Cell Biol.* 151, 749–762.

Takahashi, T., Sano, B., Nagata, T., Kato, H., Sugiyama, Y., Kunieda, K., Kimura, M., Okano, Y., and Saji, S. (2003). Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci.* 94, 148–152.

Tanenbaum, M.E., Macůrek, L., Galjart, N., and Medema, R.H. (2008). Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract Eg5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly. *EMBO J.* 27, 3235–3245.

Tanenbaum, M.E., Akhmanova, A., and Medema, R.H. (2011). Bi-directional transport of the nucleus by dynein and kinesin-1. *Commun. Integr. Biol.* 4, 21–25.

Timofeev, O., Cizmecioglu, O., Settele, F., Kempf, T., and Hoffmann, I. (2010). Cdc25 Phosphatases Are Required for Timely Assembly of CDK1-Cyclin B at the G2/M Transition. *J. Biol. Chem.* 285, 16978–16990.

Toso, A., Winter, J.R., Garrod, A.J., Amaro, A.C., Meraldi, P., and McAinsh, A.D. (2009). Kinetochore-generated pushing forces separate centrosomes during bipolar spindle assembly. *J. Cell Biol.* 184, 365–372.

Touré, A., Mzali, R., Liot, C., Seguin, L., Morin, L., Crouin, C., Chen-Yang, I., Tsay, Y.-G., Dorseuil, O., Gacon, G., et al. (2008). Phosphoregulation of MgcRacGAP in mitosis involves Aurora B and Cdk1 protein kinases and the PP2A phosphatase. *FEBS Lett.* 582, 1182–1188.

Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep.* 3, 341–348.

Tsai, M.-Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C., and Zheng, Y. (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* 5, 242–248.

- Tsukahara, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* 467, nature09390.
- Wang, F., Dai, J., Daum, J.R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P.T., Gorbsky, G.J., and Higgins, J.M.G. (2010). Histone H3 Thr-3 Phosphorylation by Haspin Positions Aurora B at Centromeres in Mitosis. *Science* 330, 231–235.
- Wang, G., Jiang, Q., and Zhang, C. (2014). The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitotic spindle. *J Cell Sci* 127, 4111–4122.
- Watanabe, N., Arai, H., Iwasaki, J., Shiina, M., Ogata, K., Hunter, T., and Osada, H. (2005). Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11663–11668.
- Waters, J.C., Chen, R.-H., Murray, A.W., and Salmon, E.D. (1998). Localization of Mad2 to Kinetochores Depends on Microtubule Attachment, Not Tension. *J. Cell Biol.* 141, 1181–1191.
- Welburn, J.P.I., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J.R., Lampson, M.A., Fukagawa, T., and Cheeseman, I.M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol. Cell* 38, 383–392.
- Wiese, C., and Zheng, Y. (2006). Microtubule nucleation: γ -tubulin and beyond. *J. Cell Sci.* 119, 4143–4153.
- William-Faltaos, S., Rouillard, D., Lechat, P., and Bastian, G. (2007). Cell cycle arrest by oxaliplatin on cancer cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21, 165–172.
- Woodcock, S.A., Rushton, H.J., Castañeda-Saucedo, E., Myant, K., White, G.R.M., Blyth, K., Sansom, O.J., and Malliri, A. (2010). Tiam1-Rac Signaling Counteracts Eg5 during Bipolar Spindle Assembly to Facilitate Chromosome Congression. *Curr. Biol.* 20, 669–675.
- Wu, P., Nielsen, T.E., and Clausen, M.H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 422–439.
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Two Histone Marks Establish the Inner Centromere and Chromosome Bi-Orientation. *Science* 330, 239–243.
- Yeung, S.-C.J., Gully, C., and Lee, M.-H. (2008). Aurora-B Kinase Inhibitors for Cancer Chemotherapy.
- Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21, 497–503.
- Zhang, X., Chen, Q., Feng, J., Hou, J., Yang, F., Liu, J., Jiang, Q., and Zhang, C. (2009). Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the γ TuRC to the centrosome. *J. Cell Sci.* 122, 2240–2251.
- Zhang, X., Ling, Y., Guo, Y., Bai, Y., Shi, X., Gong, F., Tan, P., Zhang, Y., Wei, C., He, X., et al. (2016). Mps1 kinase regulates tumor cell viability via its novel role in mitochondria. *Cell Death Dis.* 7, e2292.
- Zhao, W., Seki, A., and Fang, G. (2006). Cep55, a Microtubule-bundling Protein, Associates with Centralspindlin to Control the Midbody Integrity and Cell Abscission during Cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 17, 3881–3896.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578–583.

Zhou, L., Liang, C., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, B., Yan, H., Qi, F., Zhang, M., Yi, Q., Guan, Y., et al. (2017). The N-Terminal Non-Kinase-Domain-Mediated Binding of Haspin to Pds5B Protects Centromeric Cohesion in Mitosis. *Curr. Biol.* 27, 992–1004.

Zimmerman, W.C., Sillibourne, J., Rosa, J., and Doxsey, S.J. (2004). Mitosis-specific Anchoring of γ Tubulin Complexes by Pericentrin Controls Spindle Organization and Mitotic Entry. *Mol. Biol. Cell* 15, 3642–3657.

Abstract

Since its discovery in 1994, Haspin protein kinase has been of growing scientific interest due to its key role in mitosis. It is involved in spatio-temporal localization and activation of Aurora B kinase by creating a specific anchoring site (phosphorylation of Histone H3 on Thr3) on chromosomes and specifically at centromeres during early mitosis. Loss of Haspin activity is irretrievably accompanied by chromosome alignment errors, centromeric cohesion and mitotic spindle defects. Its essential mitotic functions make it a potential therapeutic target for cancer.

The objectives of this thesis were to better understand the functions of Haspin in mitosis, and at the same time, to characterize new specific inhibitors.

We have shown that centrosome and mitotic spindle integrity depends on Haspin kinase activity independently of Aurora B activity. In addition, we show that Haspin acts as a negative regulator microtubule nucleation both at centrosomes and on chromosomes. To better understand Haspin's role in microtubule nucleation we looked for new substrates using protein chips. We have identified several candidates including the Nima kinase nucleation effector, Nek9. We confirmed that Nek9 is an *in vitro* Haspin substrate. In addition, our results showed that Nek9 depletion partly saves the Haspin depletion phenotype, suggesting that Haspin antagonizes Nek9 nucleation function. All of our results demonstrate a new Haspin function in the regulation of microtubule nucleation signaling pathway.

At the same time, we have characterized a new series of small inhibitory molecules of Haspin, imidazopyridines derived from CHR-6494. Our hit compounds showed good Haspin inhibitory activity and increased selectivity. Unlike CHR-6494, they have the advantages of not causing cell cycle arrest in G2/M through CDK1 inhibition. They prove to be valuable tools for Haspin function studies and form a strong structural basis for the development of potential therapeutic drugs.

Résumé

Depuis sa découverte en 1994, la protéine kinase Haspine fait l'objet d'un intérêt scientifique croissant en raison de son rôle clé dans la mitose. Elle est impliquée dans la localisation et l'activation spatio-temporelle d'Aurora B en créant un site d'ancrage (phosphorylation de l'Histone H3 sur la Thr3) sur les chromosomes et notamment aux centromères en première partie de mitose. Une perte d'activité de l'Haspine s'accompagne irrémédiablement d'erreurs dans l'alignement des chromosomes, la cohésion centromérique et l'intégrité des fuseaux mitotiques. Ces fonctions en font une cible thérapeutique potentielle contre le cancer.

Les objectifs de cette thèse ont été de mieux comprendre les fonctions de cette protéine dans la cellule en mitose, et parallèlement, de caractériser de nouveaux inhibiteurs spécifiques de cette kinase.

Nous avons montré que l'intégrité des centrosomes et du fuseau mitotique dépend de l'activité kinase de l'Haspine de façon indépendante de l'activité d'Aurora B. De plus, nous montrons que l'Haspine agit comme un régulateur négatif de la nucléation des microtubules aux centrosomes ainsi que sur les chromosomes. Pour mieux comprendre le rôle de Haspine dans la nucléation des microtubules, nous avons cherché de nouveaux substrats à l'aide d'une puce protéique. Nous avons identifié plusieurs candidats parmi lesquels l'effecteur de nucléation, la kinase Nima Nek9. Nous avons confirmé que Nek9 est un substrat de l'Haspine *in vitro*. De plus, nos résultats ont montré que la déplétion de Nek9 sauve en partie le phénotype de déplétion de l'Haspine, ce qui suggère que l'Haspine a un rôle antagoniste de la fonction centrosomale de Nek9. L'ensemble de nos résultats démontre une nouvelle fonction de l'Haspine et son implication dans la régulation des voies de signalisation de la nucléation des microtubules.

En parallèle, nous avons caractérisé une nouvelle série de petites molécules inhibitrices de Haspine, des imidazopyridines dérivées du CHR-6494. Nos composés hits montrent une bonne activité inhibitrice de l'Haspine et une sélectivité accrue. Ils ont l'avantage de ne pas provoquer un arrêt du cycle cellulaire en G2/M comme le CHR-6494 et n'inhibent pas la CDK1. Ils s'avèrent être de précieux outils d'études des fonctions de l'Haspine et une base structurale pour la synthèse d'outils thérapeutiques potentiels.