

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 irremediably 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.