# Génotypage par séquençage de SNP de Pois

# développement d'une approche par séquençage HiSeq2000 d'ADN génomique

Gilles Boutet / Susete Alves Carvalho / Projet PEAPOL

30 septembre 2013

# Groupe Légumineuses UMR IGEPP

## Résistance Partielle Quantitative (RPQ)

1. Combinaisons de facteurs génétiques pour une RPQ efficace/durable

   1.1- Sources

   1.2- Diversité, efficacité, stabilité

   1.3- Structure moléculaire QTL/gènes

   1.4- Durabilité

2. Fonctions associées à la RPQ

   2.1- Composantes biologiques

   2.2- Gènes candidats régulés

   2.3- Voies métaboliques régulées

Ascochytose (*Mycosphaerella pinodes*)

Aphanomyces (*Aphanomyces euteiches*)

# Projet INRA-BIOGEMMA-SOFIPROTEOL
# PEAPOL 2011-2014

**Demande de Sofiprotéol**: développer rapidement un grand nombre de marqueurs SNP chez le pois, utiles à la sélection et accessibles à la communauté scientifique.

Co-coordinateurs : G. Boutet (INRA IGEPP) et N. Rivière (Biogemma)

**4 Partenaires :**

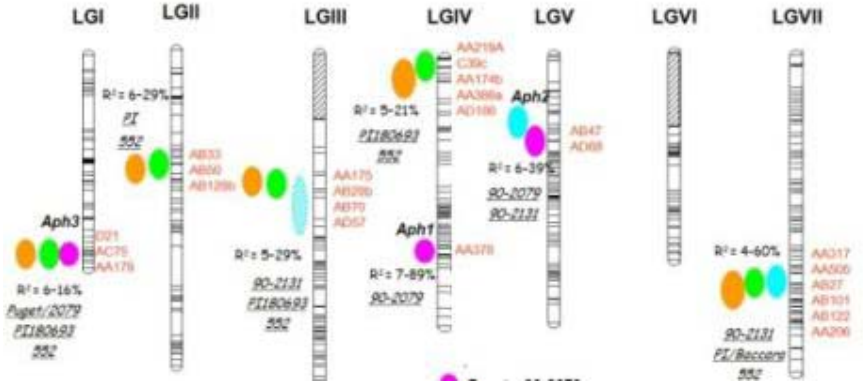
P1 : Biogemma
P2 : INRA UMR IGEPP Rennes
P3 : INRA Genotoul
P4 : INRIA-GenScale-Genouest

**Délivrables attendus pour le projet :**

- Approche séquençage cDNA normalisés (Biogemma) : **30 k SNP** issus de cDNA full lenght
- Approche séquençage gDNA enrichi en séquences géniques (INRA) : **15 k SNP ordonnés** sur le génome du pois
- Génotypage 10 OPA vera-code : **3k SNP cartographiés**

# Objectif Scientifiques

- Saturer la carte génétique du pois en marqueurs SNP
- Réduire la taille des intervalles de confiance des QTL
- Établir des ponts entre les cartes issues de différentes populations de RILs
- Suivre efficacement les allèles favorables aux QTL dans des populations de sélection assistée par marqueurs (SAM)




- Cloner certains QTL ciblés d'intérêt.
- Développer des projets de génétique d'association pour l'identification de nouveaux QTL
- Préciser la synténie entre le pois et l'espèce légumineuse modèle M. truncatula dans les régions génomiques comportant des QTL

# Approche cDNA normalisés (Biogemma)

## Délivrable attendu : 30 k SNPs issus de cDNA full lenght

### Développement rapide axé sur des technologies et méthodes validées chez BGA


- Développement rapide axé sur des technologies et méthodes validées chez BGA


- Matériel:
  - 8 génotypes représentant la diversité pois
  - 2 parents de pop de cartographie (Champagne, Térèse)
- Décomplexification du génome:
  - séquençage cDNA: séquences exoniques exprimées
  - Normalisation des banques: lissage des variations de niveau d'expression
- Séquençage « long read » 454
- Assemblage et détection des SNP avec le pipeline de bioinformatique BGA

# Bilan Approche cDNA normalisés (Biogemma)

- **68850 contigs** ont été assemblés, dont **50636** ont un **hit** sur le génome de **Medicago truncatula**
- **74747 SNP** ont été découverts, dont **35455 SNP robustes** caractérisés comme suit :
  - Répartis **sur 10369 contigs pois**, dont 10111 présentant un hit sur le génome de Medicago truncatula
  - **11803 SNP** polymorphes entre les lignées Champagne et Térèse
  - **26100 SNP** pour lesquels au moins **5 génotypes sur 8 séquencés**
  - **20504 SNP** apportés par **un seul génotype** (dont **8900 SNP apportés par Champagne**)
- **1920 SNP** (5 OPA Vera-code) choisis parmi les 35k développés ont été génotypés, et **1360 cartographiés**.

Duarte *et al.* Submitted

# Approche gDNA enrichi en séquences géniques (INRA)

## Délivrable attendu : 15 k SNP « génomiques » ordonnés sur le génome du pois

VERROUS :

POIS = **gros génome** (4.5 Gb) pour lequel il n'existe **pas de séquence de référence** et composé majoritairement de **séquences répétées**.

DEVELOPPEMENTS PREVUS POUR LE PROJET :

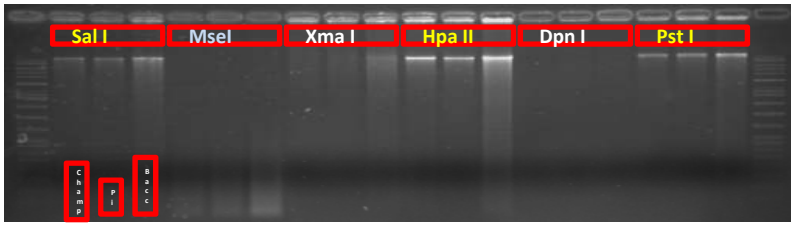
1. Approche de réduction de génome par methyl-filtration (INRA IGEPP / GeT-PlaGe)
2. Read2SNP (INRIA équipe Genscale Pierre Peterlongo / Raluca Uricaru)
3. Cartographie par séquençage d'une pop de 48 RILs de Pois

# Stratégie Réduction de génome par methyl-filtration

## Développement méthyl-Filtration sur ADN genomique de Pois

1. Réduction de génome par enzymes de restriction sensibles à la méthylation et sizing des fragments d'intérêt

Choix de 2 enzymes parmi 12 testées :
**HpaII (C/CGG)** et **PstI (CTGCA/G)**




2. Test de la stratégie méthyl filtration par séquençage sur 1 ligne de 454 GS FLX ; d'1 banque (1 des 2 parents) … (2011)

3. méthyl filtration puis séquençage (HiSeq2000; Illumina) de 60 banques de pois :
    a. 12 lignées pures de pois, dont les 2 parents d'1 pop de RILs, pour recherche de SNP (2012-2013)
    b. 48 RILs pour ordonnancement des SNP (bin mapping) (2013-2014)

# Test de la stratégie par séquençage d'1 banque sur 1 ligne de 454 GS FLX

- **Le process « methyl-filtration » sur gDNA CTAB a été globalement validée sur 454 pour les deux enzymes**

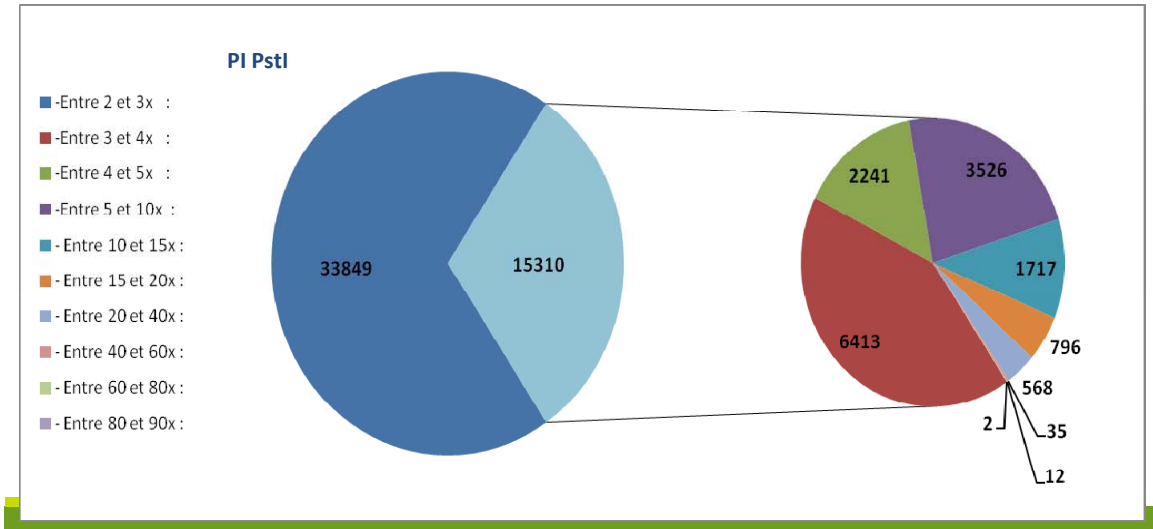
Malgré des points restant à préciser pour la suite sur projet:

- Séquençage concomitant des banques « PstI » et « HpaII » pour les 60 lignées ?
- Ou séquençage d'une banque (« PstI » ?) pour les 60 lignées, analyse … et séquençage de l'autre (« HpaII » ?) seulement si nécessaire ?
- Intérêt (?) d'une extraction de noyaux préalable pour HpaII ?
- Adaptation aux spécificités du process Hiseq2000 du protocole validé sur 454 = Verrous techniques à lever pour la suite sur projet

- **Feu vert pour tester la manip de séquençage sur Hiseq2000 Illumina sur 4 banques Baccara/PstI, Baccara/HpaII, PI/PstI, PI/HpaII**

# Séquençage Hiseq2000 4 banques/lanes : Problème de profondeur des contigs

- **Couverture des Contigs Trop faible pour chaque lignée** :
  - seulement 1500 à 3000 contigs ont une couverture > 10x
  - 15 000 contigs ont une couverture > 3x
  - 40 000 à 50 000 contigs ont une couverture > 2x
- Or, Il faudrait AU moins 20k contigs de couverture > 10x pour la recherche et validation de SNP ; et Au moins 20k contigs de couverture > 4x pour le bin-mapping




**Recherches de SNP Bacc/PI avec Read2SNP :**

faible nombre de SNP trouvés cohérent avec la faible profondeur des contigs :

Tests avec cov_min=5:

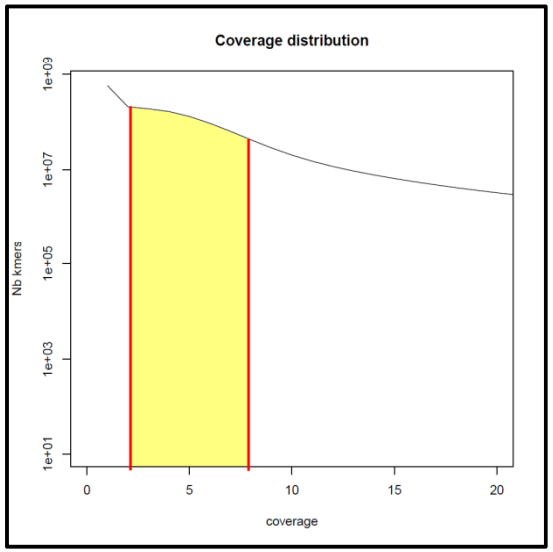
**Nb SNP read2SNP filtrés = 3919**

# Orientations Développements 02/2013

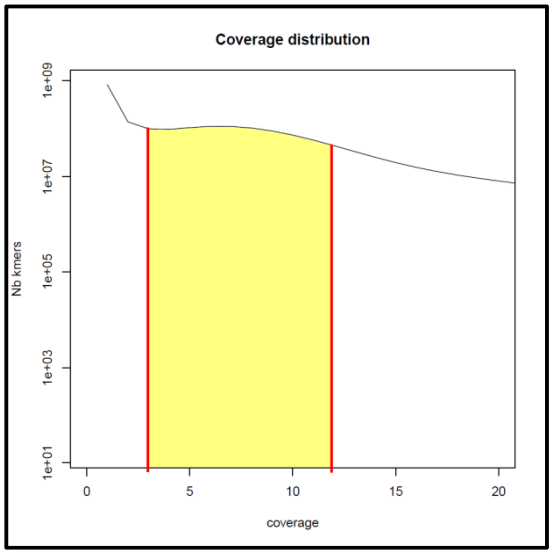
- Ne plus travailler qu'avec l'enzyme PstI
- Lancer en pilote les manips sur 4 lignées : Baccara, PI, Champagne et Terese
- Réduire la fenêtre de sizing pour obtenir une plage identique à celle des manips 454(plage 250- 2000 pb)
- Conserver l'étape de sonication après sizing : l'idéal aurait été de la supprimer mais les fragments sizés restent trop long pour être séquencés tels quels
- Augmenter la profondeur en passant 1 banque par lane (contre 4 précédemment) … tout en sachant qu'on n'aura les moyens de ne passer au mieux que 2 banques par lane pour la pop de 48 Rils
- Analyse de ces 4 banques avant de décider si/comment on passe à grande échelle sur les 48 Rils et/ou sur 4 à 8 lignées supplémentaires

# Résultats Couverture

Zoom des graphes 2 banques / lane et 1 banque / lane.

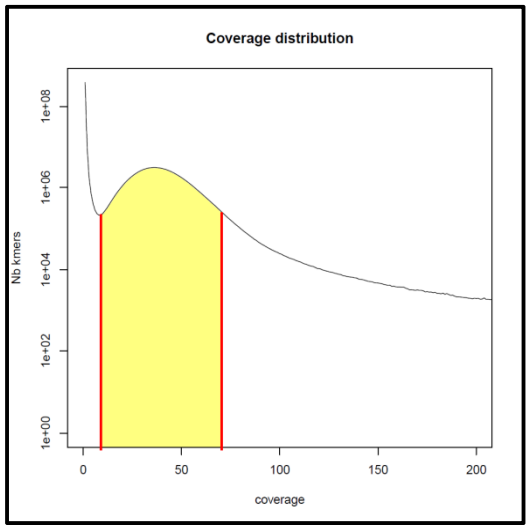



**2 banques / 1 lane :**
Couverture moyenne
**~ 5x**




**1 banque / 1 lane :**
Couverture moyenne
**~ 7,5x**

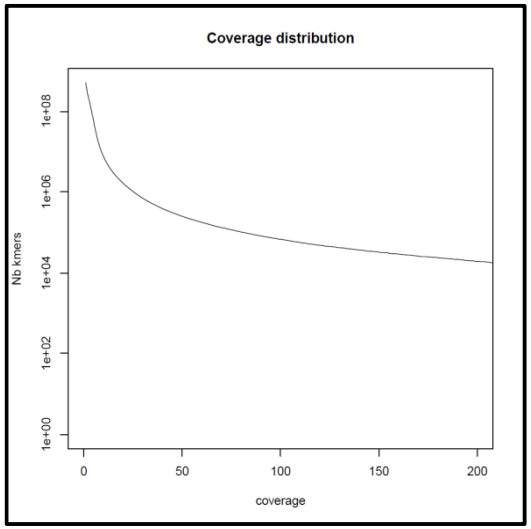
Couvertures des kmers calculer avec le logiciel DSK (kmer = 27)



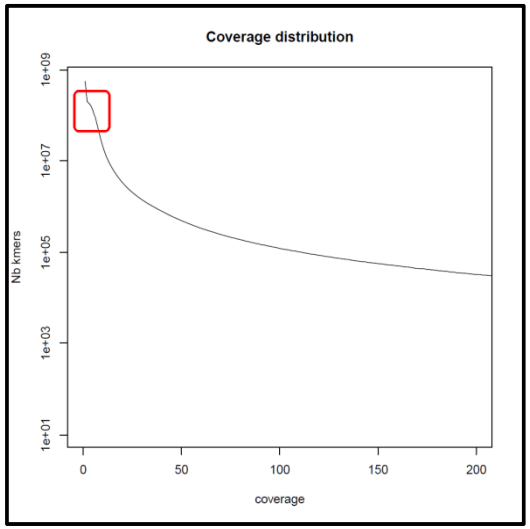

**Exemple de graphe que l'on peux obtenir**

- Axe Y : nombre de kmer couvert à une profondeur donnée
- Axe X : couverture (profondeur)

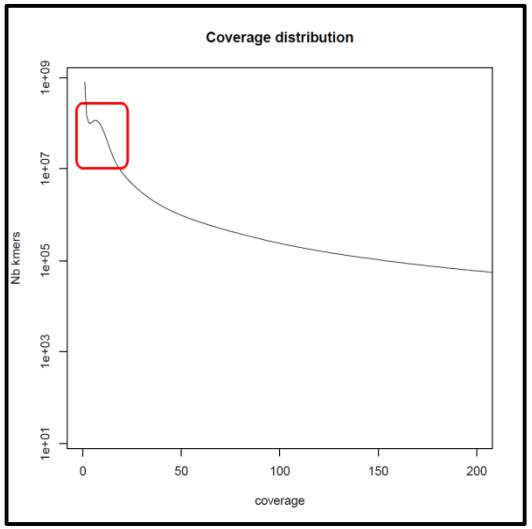
# Résultats Couverture




**4 banques / 1 lane :**
Aucun pic de couverture.
La couverture est vraiment trop faible.




**2 banques / 1 lane :**
Un petit pic de couverture.
La couverture reste néanmoins faible.




**1 banque / 1 lane :**
Pic de couverture.
Couverture correct en théorie
“whole genome”

# Read2SNP

**Available :**

sequenced reads

1 to *n* sets (replicates, strains, individuals, …)

**Non available:**

reference genome (close or good)

**Need:**

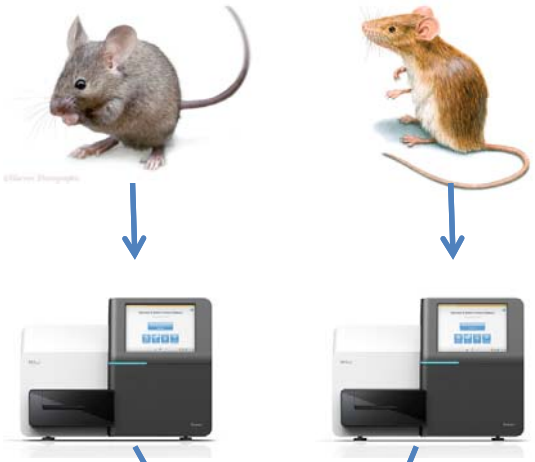
SNPs with their coverage/quality in each set

(No physical location needed)

http://colibread.inria.fr/read2snps/

Colib'read

# Read2SNP Overview



Read2Snps

```
>SNP_higher_path_99994|low|left_contig_length_52|right_contig_length_70|C1_14|C2_0|Q1_64|Q2_0|rank_1.00000
AGTCCTTTAAATATATAAAAATTAACAAAACGGGAGAAAAGAAATAATGGAAAAGGGCTTG
>SNP_lower_path_99994|low|left_contig_length_52|right_contig_length_70|C1_0|C2_27|Q1_0|Q2_64|rank_1.00000
AGTCCTTTAAATATATAAAAATTAACAAAATGGGAGAAAAGAAATAATGGAAAAGGGCTTG
>SNP_higher_path_999949|high|left_contig_length_351|right_contig_length_54|C1_11|C2_0|Q1_63|Q2_0|rank_1.00000
ACCAGAAGACCAAGGCCAAGGGTTCACTAAATTGATTTCTCCTGAGCCTTTTATCTGTGAC
>SNP_lower_path_999949|high|left_contig_length_351|right_contig_length_54|C1_0|C2_38|Q1_0|Q2_62|rank_1.00000
ACCAGAAGACCAAGGCCAAGGGTTCACTAAGTTGATTTCTCCTGAGCCTTTTATCTGTGAC
>SNP_higher_path_999916|high|left_contig_length_424|right_contig_length_7|C1_27|C2_0|Q1_57|Q2_0|rank_1.00000
GGAAATTTGTTCTTGCCTAATGGACTATAGCCCATTTATTACTTTTTCTTCAGATACACCA
>SNP_lower_path_999916|high|left_contig_length_424|right_contig_length_7|C1_0|C2_30|Q1_0|Q2_64|rank_1.00000
GGAAATTTGTTCTTGCCTAATGGACTATAGTCCATTTATTACTTTTTCTTCAGATACACCA
>SNP_higher_path_999871|high|left_contig_length_9|right_contig_length_131|C1_27|C2_0|Q1_60|Q2_0|rank_1.00000
CTTGAGACTCGGGTTCCCCAACCGTTCAGAAGCAACGCCCGATACTCCCATAGGAGGTCAA
>SNP_lower_path_999871|high|left_contig_length_9|right_contig_length_131|C1_0|C2_53|Q1_0|Q2_58|rank_1.00000
CTTGAGACTCGGGTTCCCCAACCGTTCAGAGGCAACGCCCGATACTCCCATAGGAGGTCAA
>SNP_higher_path_99978|high|left_contig_length_1025|right_contig_length_397|C1_16|C2_0|Q1_59|Q2_0|rank_1.00000
AAAAGACAAAGGATACTTTAGAAGTTTCACCTCTAAAGGGAACATATGTATTGCATCTCTT
>SNP_lower_path_99978|high|left_contig_length_1025|right_contig_length_397|C1_0|C2_26|Q1_0|Q2_60|rank_1.00000
AAAAGACAAAGGATACTTTAGAAGTTTCACTTCTAAAGGGAACATATGTATTGCATCTCTT
>SNP_higher_path_999759|low|left_contig_length_21|right_contig_length_10|C1_0|C2_20|Q1_0|Q2_67|rank_1.00000
AATATAAGTTAGGATATTAAAATTCTGCATAAGATACAGGAATTAAAAAAAATTATTCTTA
>SNP_lower_path_999759|low|left_contig_length_21|right_contig_length_10|C1_12|C2_0|Q1_66|Q2_0|rank_1.00000
AATATAAGTTAGGATATTAAAATTCTGCATTAGATACAGGAATTAAAAAAAATTATTCTTA
>SNP_higher_path_999758|low|left_contig_length_10|right_contig_length_25|C1_0|C2_37|Q1_0|Q2_64|rank_1.00000
AAGGAAAAGAGGAGAAAAGAAAAGAAAGCTAGAAATAGTTGTACCTCAAGACCTCAAGACC
>SNP_lower_path_999758|low|left_contig_length_10|right_contig_length_25|C1_16|C2_0|Q1_61|Q2_0|rank_1.00000
AAGGAAAAGAGGAGAAAAGAAAAGAAAGCTGGAAATAGTTGTACCTCAAGACCTCAAGACC
```

**Parameters**:

- *k* size of the used *k-mers*. Generated paths are of length 2k-1
- *c* minimal coverage

# Read2SNP Output

```
>SNP_higher_path_99994|low|left_contig_length_52|right_contig_length_70|C1_14|C2_0|Q1_64|Q2_0|rank_1.00000
AGTCCTTTAAATATATAAAAATTAACAAAACGGGAGAAAAGAAATAATGGAAAAGGGCTTG
>SNP_lower_path_99994|low|left_contig_length_52|right_contig_length_70|C1_0|C2_27|Q1_0|Q2_64|rank_1.00000
AGTCCTTTAAATATATAAAAATTAACAAAATGGGAGAAAAGAAATAATGGAAAAGGGCTTG
>SNP_higher_path_999949|high|left_contig_length_351|right_contig_length_54|C1_11|C2_0|Q1_63|Q2_0|rank_1.00000
ACCAGAAGACCAAGGCCAAGGGTTCACTAAATTGATTTCTCCTGAGCCTTTTATCTGTGAC
>SNP_lower_path_999949|high|left_contig_length_351|right_contig_length_54|C1_0|C2_38|Q1_0|Q2_62|rank_1.00000
ACCAGAAGACCAAGGCCAAGGGTTCACTAAGTTGATTTCTCCTGAGCCTTTTATCTGTGAC
>SNP_higher_path_999916|high|left_contig_length_424|right_contig_length_7|C1_27|C2_0|Q1_57|Q2_0|rank_1.00000
GGAAATTTGTTCTTGCCTAATGGACTATAGCCCATTTATTACTTTTTCTTCAGATACACCA
>SNP_lower_path_999916|high|left_contig_length_424|right_contig_length_7|C1_0|C2_30|Q1_0|Q2_64|rank_1.00000
GGAAATTTGTTCTTGCCTAATGGACTATAGTCCATTTATTACTTTTTCTTCAGATACACCA
>SNP_higher_path_999871|high|left_contig_length_9|right_contig_length_131|C1_27|C2_0|Q1_60|Q2_0|rank_1.00000
CTTGAGACTCGGGTTCCCCAACCGTTCAGAAGCAACGCCCGATACTCCCATAGGAGGTCAA
>SNP_lower_path_999871|high|left_contig_length_9|right_contig_length_131|C1_0|C2_53|Q1_0|Q2_58|rank_1.00000
CTTGAGACTCGGGTTCCCCAACCGTTCAGAGGCAACGCCCGATACTCCCATAGGAGGTCAA
>SNP_higher_path_99978|high|left_contig_length_1025|right_contig_length_397|C1_16|C2_0|Q1_59|Q2_0|rank_1.00000
AAAAGACAAAGGATACTTTAGAAGTTTCACCTCTAAAGGGAACATATGTATTGCATCTCTT
>SNP_lower_path_99978|high|left_contig_length_1025|right_contig_length_397|C1_0|C2_26|Q1_0|Q2_60|rank_1.00000
AAAAGACAAAGGATACTTTAGAAGTTTCACTTCTAAAGGGAACATATGTATTGCATCTCTT
>SNP_higher_path_999759|low|left_contig_length_21|right_contig_length_10|C1_0|C2_20|Q1_0|Q2_67|rank_1.00000
AATATAAGTTAGGATATTAAAATTCTGCATAAGATACAGGAATTAAAAAAAATTATTCTTA
>SNP_lower_path_999759|low|left_contig_length_21|right_contig_length_10|C1_12|C2_0|Q1_66|Q2_0|rank_1.00000
AATATAAGTTAGGATATTAAAATTCTGCATTAGATACAGGAATTAAAAAAAATTATTCTTA
>SNP_higher_path_999758|low|left_contig_length_10|right_contig_length_25|C1_0|C2_37|Q1_0|Q2_64|rank_1.00000
AAGCAAAAGACGAGAAAAGAAAAGAAAGCTAGAAATAGTTGTACCTCAAGACCTCAAGACC
```

# Read2SNP Output

```
>SNP_higher_path_999949|high|left_contig_length_351|right_contig_length_54|C1_11|C2_0|Q1_63|Q2_0|rank_1.00000
ACCAGAAGACCAAGGCCAAGGGTTCACTAAATTGATTTCTCCTGAGCCTTTTATCTGTGAC
>SNP_lower_path_999949|high|left_contig_length_351|right_contig_length_54|C1_0|C2_38|Q1_0|Q2_62|rank_1.00000
ACCAGAAGACCAAGGCCAAGGGTTCACTAAGTTGATTTCTCCTGAGCCTTTTATCTGTGAC
```

- Complexity: high/low
- Length left and right extensions (not shown here)
- C1: coverage of the path in the first read set
- C2: …
- Q1: phred quality of the polymorphic base
- Q2: …
- Rank:
  - 1 = SNP discriminative between read sets
  - 0 = SNP non discriminative between read sets

# Filtres « post Read2SNPs »

**Paramètres Read2SNP :**

- Kmer27
- Couverture minimale pour 1 lignée c3

**Résultats « Bruts » read2SNP :**

- 4 banques/lanes : 874 056 SNPs
- 2 banques/lanes : 2 129 420 SNPs
- 1 banque/lane : ? (analyse en cours)

**… nécessité de filtrer !!!**

Filtre1/ Le SNP est au minimum couvert à **5x** pour au moins l'une des 4 lignées.

Filtre2/ Suppression des snps hétérozygote (j'autorise **1 erreur par tranche de 10x**) :

| | Bacc | Champ | Pl | Ter |
|---|---|---|---|---|
| A | 14 | 15 | 10 | 14 |
| T | 10 | 12 | 15 | 11 |

| | Bacc | Champ | Pl | Ter |
|---|---|---|---|---|
| A | 0 | 54 | 14 | 1 |
| T | 15 | 2 | 0 | 32 |

# Filtres « post Read2SNPs »

**Paramètres Read2SNP :**

- Kmer27
- Couverture minimale pour 1 lignée c3

**Résultats « Bruts » read2SNP :**

- 4 banques/lanes : 874 056 SNPs
- 2 banques/lanes : 2 129 420 SNPs
- 1 banque/lane : ? (analyse en cours)

… necessité de filtrer !!!

Filtre1/ Le SNP est au minimum couvert à **5x** pour au moins l'une des 4 lignées.

Filtre2/ Suppression des snps hétérozygote (j'autorise **1 erreur par tranche de 10x**) :

| | Bacc | Champ | Pl | Ter |
|---|---|---|---|---|
| A | 14 | 15 | 10 | 14 |
| T | 10 | 12 | 15 | 11 |

| | Bacc | Champ | Pl | Ter |
|---|---|---|---|---|
| A | 0 | 54 | 14 | 1 |
| T | 15 | 2 | 0 | 32 |

# Filtres « post Read2SNPs »

**Paramètres Read2SNP :**

- Kmer27
- Couverture minimale pour 1 lignée c3

**Résultats « Bruts » read2SNP :**

- 4 banques/lanes : 874 056 SNPs
- 2 banques/lanes : 2 129 420 SNPs
- 1 banque/lane : ? (analyse en cours)

… necessité de filtrer !!!

Filtre3/ couverture allèle minoritaire : Ok si max1 ≤ (max2/2) ou max2 ≤ (max1/2).

| | Bacc | Champ | PI | Ter |
|---|---|---|---|---|
| A | 1 | 4 | 1 | 8 |
| T | 34 | 48 | 0 | 1 |

| | Bacc | Champ | PI | Ter |
|---|---|---|---|---|
| A | 1 | 2 | 21 | 31 |
| T | 32 | 44 | 2 | 1 |

# Filtres « post Read2SNPs »

**Paramètres Read2SNP :**

- Kmer27
- Couverture minimale pour 1 lignée c3

**Résultats « Bruts » read2SNP :**

- 4 banques/lanes : 874 056 SNPs
- 2 banques/lanes : 2 129 420 SNPs
- 1 banque/lane : ? (analyse en cours)

… necessité de filtrer !!!

Filtre3/ couverture allèle minoritaire : Ok si max1 ≤ (max2/2) ou max2 ≤ (max1/2).

| | Bacc | Champ | PI | Ter |
|---|---|---|---|---|
| A | 1 | 4 | 1 | 8 |
| T | 34 | 48 | 0 | 1 |

| | Bacc | Champ | PI | Ter |
|---|---|---|---|---|
| A | 1 | 2 | 21 | 31 |
| T | 32 | 44 | 2 | 1 |

# Résultats SNP Read2SNPs après filtrage

| | 4 banques / lane | | | 2 banques / lane | | | 1 banque / lane | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | pour chaque SNP, données de séquence disponible pour chacune des 4 lignées | | | | | | | | |
| | Total SNPs | Designable "≥ 50" | Designable "≥ 100" | Total SNPs | Designable "≥ 50" | Designable "≥ 100" | Total SNPs | Designable "≥ 50" | Designable "≥ 100" |
| Total SNP Polymorphes "génotypage 4 lignées" | 6861 | 5341 | 3083 | **43512** | **29549** | **13829** | | | |
| SNP Polymorphes Baccara-Pi | 4545 | 3548 | 2047 | **30013** | **20399** | **9398** | | | |
| SNP Polymorphes Baccara-Champagne | 5130 | 3981 | 2272 | **33380** | **22646** | **10554** | | | |
| SNP Polymorphes Baccara-Terese | 1337 | 1038 | 625 | **8520** | **5753** | **2747** | | | |
| SNP Polymorphes Champagne-Pi | 2805 | 2195 | 1283 | **16261** | **11085** | **5304** | | | |
| SNP Polymorphes Champagne-Terese | 5363 | 4163 | 2367 | **34010** | **23071** | **10729** | | | |
| SNP Polymorphes Pi-Terese | 4764 | 3712 | 2124 | **30699** | **20824** | **9631** | | | |

**43k SNP** (29k « designables ») dont **30k SNP** (20k « designables ») polymorphes entre les parents de la pop de RILs à cartographier par séquençage

…Avec un effort de séquençage à 2 banques par lane

# Conclusion - Perspectives

1. Malgré les efforts sur le sizing des banques, la **« filtration » parait peu efficace**, avec une profondeur moyenne plus proche de celle d'un séquençage « whole genome » que d'un séquençage ciblé.

2. Les premières analyses (toujours en cours) nous indiquent des **banques simili « whole genome »** avec malgré tout un **enrichissement 2 à 5x de la portion « methyl-filtrée » qui devrait représenter 1 à 10% du génome**.

3. Dans ces conditions, un **effort de séquençage de 24 lanes Hiseq2000** apparait **nécessaire** (et suffisant) **pour la cartographie par séquençage de la population de 48 RILs** et ansi répondre aux objectifs initiaux du projet (développement et bin mapping environ 15K SNP genomiques).

**Dans l'état actuel, la technique ne semble donc pas complètement au point et n'est probablement pas la plus élégante ni la moins onéreuse, mais elle permet de répondre aux objectifs du projet.**

# MERCI

## INRA UMR 1349 IGEPP :

- **Susete Alves Carvalho** (Genscale / Genouest) – analyses bioinfo
- **Raluca Uricaru** (équipe GenScale INRIA) – développement read2SNP
- **Alain Baranger**

## INRA GeT-PlaGe :

- **Emeline Lhuillier** – développement Methyl-filtration / Banques Hiseq2000
- **Jérôme Lluch** – développement 454
- **Olivier Bouchez**

## INRIA-IRISA :

- **Olivier Collin** (plate-forme Genouest)
- **Delphine Naquin** (plate-forme Genouest) – analyses bioinfo
- **Pierre Peterlongo** (équipe Genscale)

## INRA CNRGV:

- **Arnaud Bellec** – tests préliminaires Methyl-filtration

## BIOGEMMA Auvergne :

- **Jorge Duarte**
- **Nathalie Rivière**

Sofiprotéol, l'engagement durable