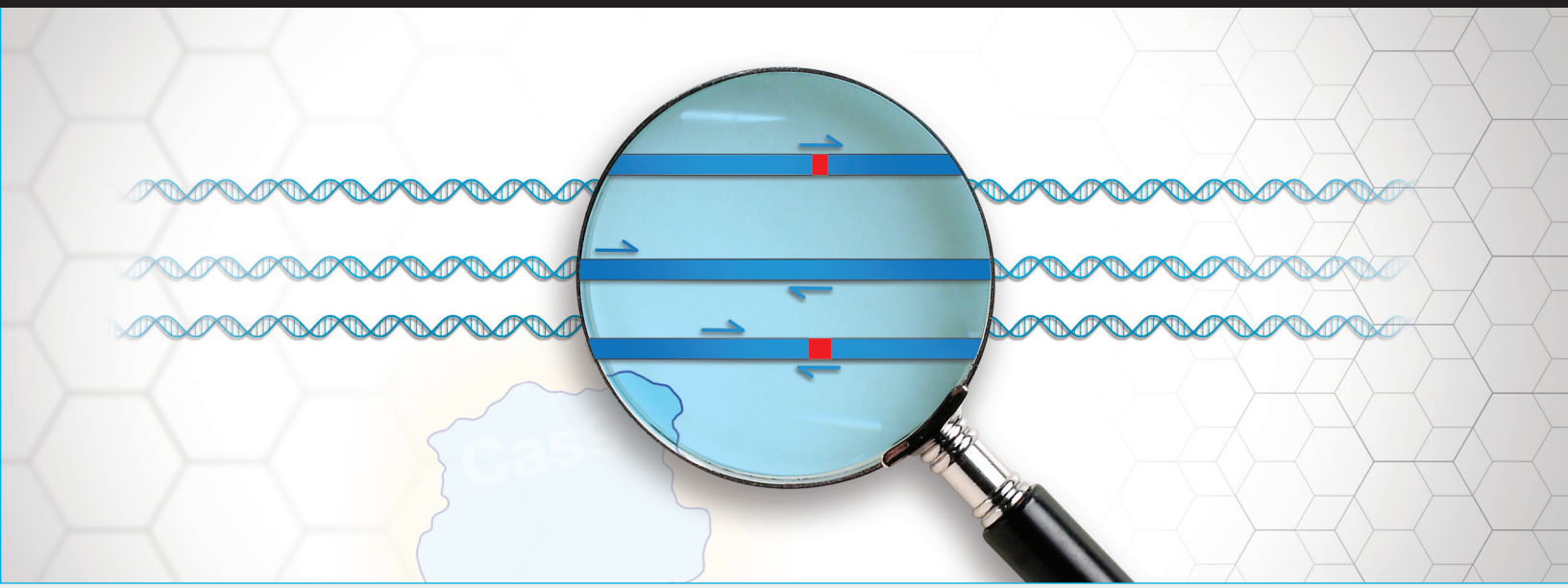
BIO-RAD Explorer



Out of the Blue Genotyping Extension

N° de référence 12012607EDU

Guide de l'étudiant

Remarque : La reproduction de toute partie du présent document est autorisée exclusivement à des fins non commerciales d'enseignement. L'usage commercial du contenu protégé par le droit d'auteur, incluant l'utilisation dans des matériaux éducatifs pour laquelle un paiement est reçu, nécessite l'autorisation expresse de la part de Bio-Rad™ Laboratories, Inc. Contactez-nous à l'adresse explorer@bio-rad.com pour de plus amples informations.

Pour l'assistance technique, contactez votre service Bio-Rad local ou le **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723) option 2 pour les États-Unis.

Ce produit n'est pas destiné à l'auto-médication.

BIO-RAD

Cette page est délibérément laissée vierge.

Partie 1

Explications des résultats de l'activité Travaux de laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR

Dans l'activité Travaux de laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR, vous avez introduit des éléments du système CRISPR/Cas9 dans des bactéries. Vous avez observé les colonies bactériennes qui se sont formées dans les boîtes de culture et utilisé ces observations pour démontrer la présence ou l'absence d'édition du gène.

Récupérez vos boîtes et/ou les résultats obtenus dans l'activité Travaux de laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR.

1. Formulez une affirmation en expliquant pourquoi les étapes réalisées dans le cadre de cette expérience ont abouti aux résultats décrits. Avancez des preuves expérimentales pour justifier l'affirmation. Pensez à prendre en compte tous les réactifs, boîtes et additifs, tels que X-gal.

2. Rédigez une affirmation de rechange :
   a. Trouvez un autre groupe de la classe dont l'affirmation diffère significativement de celle avancée MAIS qui concorde avec les observations faites.
   b. S'il n'y en a aucune, utilisez les connaissances disponibles en matière d'expression génétique chez les bactéries et de biologie cellulaire pour proposer une autre affirmation correspondant aux résultats.
   c. Expliquez en détail cette nouvelle affirmation et veillez à montrer en quoi elle concorde avec les observations faites, même si celles-ci n'apportent pas la preuve indéniable de l'affirmation.

3. Quelle(s) information(s) complémentaire(s) pourraient contribuer à déterminer laquelle des affirmations proposées est la plus probable? Expliquez en quoi cette ou ces information(s) complémentaire(s) pourraient aider à faire un choix.

4. Les affirmations actuelles se basent sur la couleur des colonies bactériennes, ce qui constitue un moyen indirect de mesurer l'édition du gène. Un moyen indirect implique de mesurer ou d'observer un résultat comme une manière de mesurer autre chose. La couleur des colonies bactériennes fournit des informations incomplètes sur l'état du gène *lacZ*. À la lumière de cette information, pourquoi pourrait-il être particulièrement avantageux d'utiliser une mesure complémentaire de plus pour étayer l'affirmation?

Partie 2
Extraction d'ADN de colonies bactériennes et PCR

Après une expérience d'édition du génome, il est important de vérifier que l'ADN a été modifié conformément à vos attentes. Même si l'enzyme Cas9 coupe l'ADN au bon endroit, il est possible que les mécanismes de réparation insèrent une séquence d'ADN inattendue. Des techniques, comme la PCR qui se basent essentiellement sur les séquences d'ADN, peuvent être utilisées pour vérifier le résultat.

PCR multiplex

La PCR, ou réaction en chaîne par polymérase en français, amplifie une séquence particulière de nucléotides (amplicon) à l'aide généralement d'une unique paire d'amorces. La PCR multiplex vise à amplifier simultanément plusieurs amplicons au cours d'une seule réaction en utilisant une paire d'amorces unique pour chaque amplicon (Fig. 1). La paire d'amorces cible une séquence particulière d'ADN, tout comme pour la PCR standard. Seule l'absence d'une séquence recherchée dans la PCR ou la perturbation des sites de liaison des amorces empêchera l'amplification de la séquence recherchée. Si un amplicon est détecté dans un échantillon, généralement au moyen d'une électrophorèse au gel d'agarose, la séquence d'ADN complémentaire était alors présente dans cet échantillon.

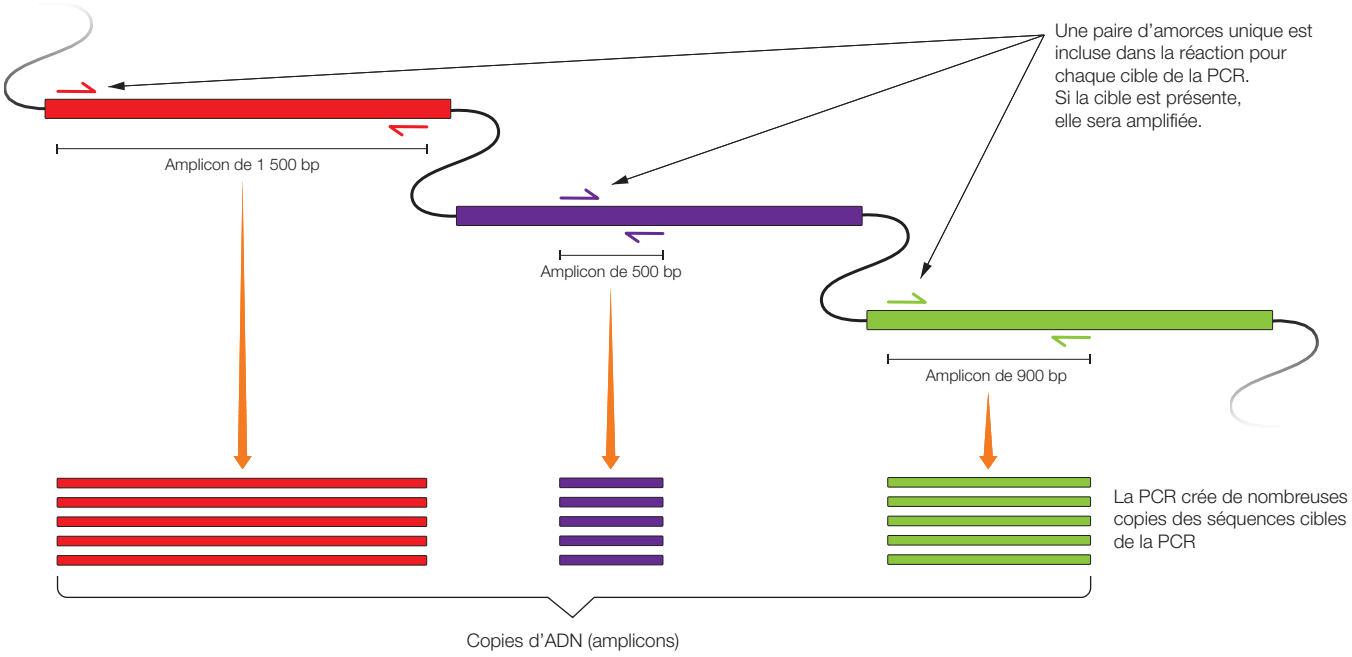


Fig. 1 Plusieurs amplicons produits au cours d'une réaction PCR multiplex. Dans cet exemple, les trois paires d'amorces amplifient trois amplicons différents d'une taille de 1 500, 500 et 900 bp.

Sans prendre soin de bien planifier l'expérience, les multiples paires d'amorces utilisées sur un échantillon PCR multiplex risquent d'interférer les unes avec les autres. Pour que l'expérience réussisse, il faudra choisir soigneusement les amplicons cibles, définir l'utilisation des amorces et les paramètres de cycle. Le travail supplémentaire effectué à ce stade permettra d'analyser plus d'une cible dans un même échantillon. Au cours de cette activité, vous utiliserez la PCR multiplex pour analyser plusieurs cibles d'ADN issues de colonies bactériennes choisies.

Utilisation de la PCR multiplex pour détecter l'édition du génome

L'activité d'édition du gène *lacZ* par CRISPR a produit un lot de boîtes comportant des colonies bactériennes bleues et/ou blanches. La couleur des colonies est une expression phénotypique visible indiquant si le gène lacZ est fonctionnel ou non. Dans l'expérience précédente, vous avez utilisé ces observations pour tirer des conclusions sur l'édition du gène. La PCR multiplex peut être utilisée pour confirmer ces conclusions au niveau de l'ADN. Après une extraction d'ADN de chaque colonie, vous utiliserez la PCR multiplex pour détecter la présence d'un insert de la matrice d'ADN donneur. La PCR multiplex comprend trois paires d'amorces (Fig. 2) :

- La première paire d'amorces est conçue pour détecter le gène *lacZ* non modifié. Une amorce de la paire se lie directement au site de coupure recherché par la protéine Cas9. Si le site de coupure recherché a été modifié, l'amorce ne pourra pas s'y lier. Si le site de coupure recherché par la protéine Cas9 n'a PAS été modifié, cette amorce produira un amplicon d'une taille d'environ 1 100 bp.
- La deuxième paire d'amorces est conçue pour détecter le gène *lacZ* modifié. Une amorce de la paire se lie directement à l'insert de la matrice d'ADN donneur. Si le site de coupure visé a été réparé correctement avec la matrice d'ADN donneur introduit dans la bactérie, cette amorce produira un amplicon d'une taille d'environ 650 bp.
- Une troisième paire d'amorces fera office de contrôle et amplifiera une région sans rapport située bien après le gène *lacZ* afin de vérifier que l'ADN chromosomique est bien présent dans l'échantillon. Si l'extraction de l'ADN chromosomique et la PCR réussissent, avec ou sans édition du gène *lacZ*, cette paire d'amorces produira un amplicon d'environ 350 bp.

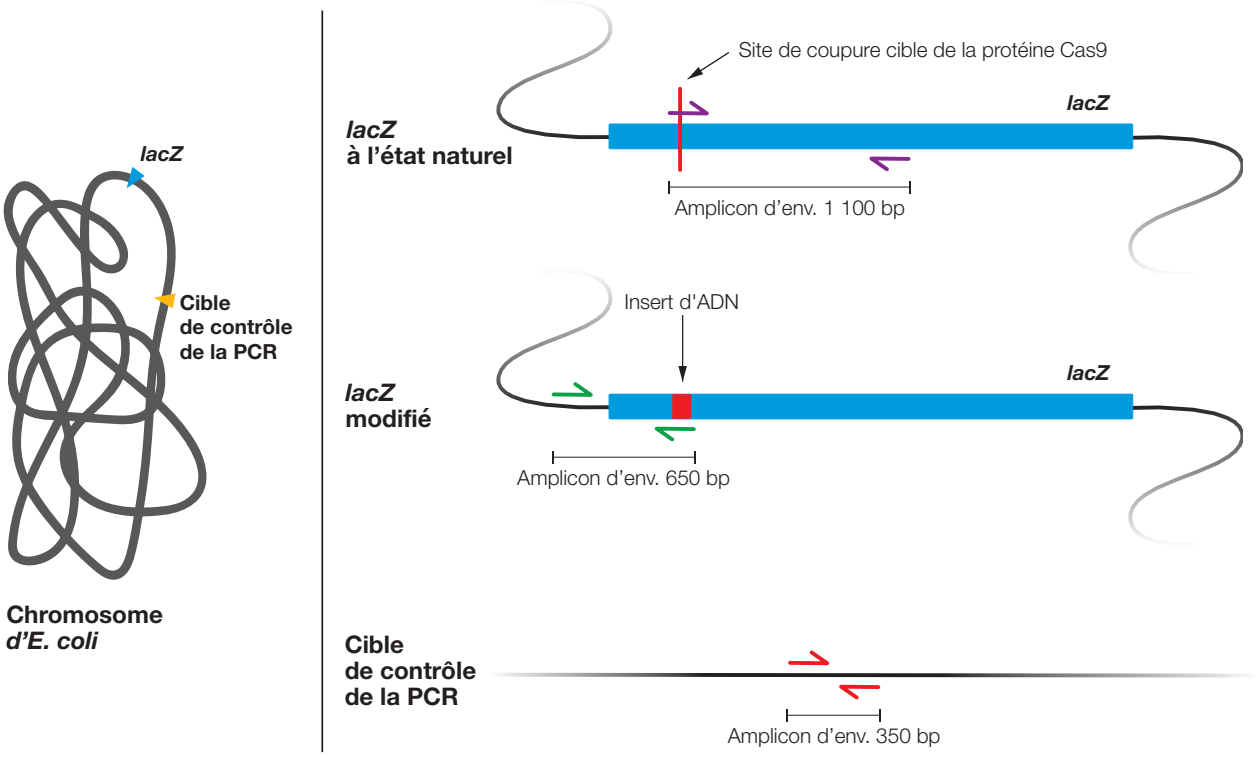


Fig. 2 Cibles de la PCR multiplex

Questions préalables aux travaux de laboratoire

Tableau 1. Résultats attendus pour la PCR multiplex

	Colonie bactérienne		Amplicons		
Boîte d'origine	**Aspect de la colonie**	**État du gène *lacZ***	**1 100 bp**	**650 bp**	**350 bp**
Boîte IX/ARA (boîte d'amorce (starter))					
Boîte C					
Boîte D					

Utilisez votre analyse et les réponses obtenues lors de l'activité Travaux de laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR pour répondre aux questions suivantes.

A. Dans le tableau 1, complétez les colonnes « Aspect des colonies » et « État du gène* lacZ *» en y inscrivant les conclusions sur le gène* lacZ *issues des colonies bactériennes de la boîte d'amorce (starter)* IX/ARA*, de la boîte* C *et de la boîte* D *de l'activité Travaux de laboratoire d'édition du gène* lacZ *par CRISPR. Si des colonies d'une même boîte présentent des aspects différents, les noter toutes dans la réponse.

B. Dans le tableau 1, cochez la ou les case(s) correspondant aux amplicons que l'on peut s'attendre de retrouver dans les échantillons PCR de chaque boîte utilisée.

C. À l'aide de la figure 2, expliquez pourquoi il est peu probable qu'à la fois un amplicon de 1 100 bp et un amplicon de 650 bp soient produits au cours d'une seule réaction dans le cadre de cette expérience de PCR multiplex.

D. Si seul un amplicon de 350 bp est produit dans un échantillon donné, quelle(s) conclusion(s) peut-on tirer au sujet du gène* lacZ *dans l'échantillon d'ADN analysé?

E. S'il n'y a pas d'amplicon de 350 bp pour un échantillon donné, quelle pourrait en être l'explication? Quelle(s) information(s) complémentaire(s) pourrai(en)t en confirmer l'explication?

Protocole

Poste de travail de l'étudiant

Matériels	Quantité
Boîte d'amorce (starter) **IX/ARA** de l'activité Édition du gène *lacZ* par CRISPR	1
Boîte de culture bactérienne **C** de l'activité Édition du gène *lacZ* par CRISPR	1
Boîte de culture bactérienne **D** de l'activité Édition du gène *lacZ* par CRISPR	1
Matrice InstaGene (**IG**)	1,3 ml
Mélange de base plus amorces (Master mix plus primers, Master mix plus primers (**MMP**)	80 µl
ADN de contrôle positif pour PCR (**+**), contient toutes les cibles de la PCR	15 µl
ADN de contrôle négatif pour PCR (**–**), eau distillée	15 µl
Tube PCR, 0,2 ml	7
Tube conique 1,5 ml, bouchon fileté à joint torique	5
Micropipette et pointes à volume réglable de 2 – 20 µl	1
Micropipette et pointes à volume réglable de 100 – 1 000 µl	1
(Recommandé) Porte-tubes PCR	1
Portoir pour microtubes	1
(Recommandé) Agitateur vortex	1
Marqueur indélébile	1

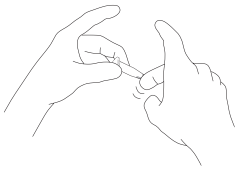
Poste de travail de base

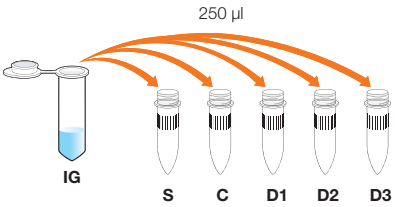
Matériels	Quantité
Thermocycleur avec au moins 56 puits	1
Bain sec ou bain-marie à 56 °C	1 – 2
Bain sec ou bain-marie à 95 °C	1 – 2
Centrifugeuse à microtubes	1 – 2
(Recommandé) Adaptateur de tube PCR pour centrifugeuse	1 – 2
Portoir flottant pour tube (pour bain-marie)	8

Extraction d'ADN des bactéries

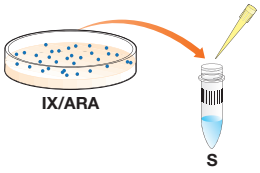
1. *Étiqueter cinq tubes à bouchon fileté **S** (pour la boîte d'amorce (starter)), **C**, **D1**, **D2**, et **D3**. Parapher chacun des tubes.*

2. *Tapoter pour mélanger la matrice InstaGene (**IG**) et obtenir une suspension homogène des billes, puis ajouter 250 µl dans chaque tube.*

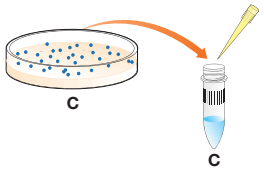




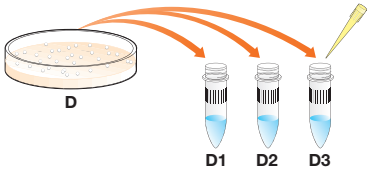
3. *Avec la pointe de la pipette, prélever une colonie <u>isolée</u> bleue de la boîte **IX/ARA**. Remuer la pointe de la pipette dans le tube **S** jusqu'à ce qu'il ne subsiste plus de bactéries sur la pointe.*



4. *Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour prélever une colonie isolée bleue de la boîte **C**. Remuer la pointe de la pipette dans le tube **C** jusqu'à ce qu'il ne subsiste plus de bactéries sur la pointe.*

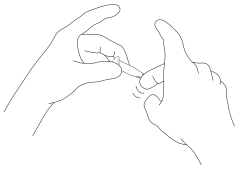


5. *Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour prélever une colonie isolée blanche de la boîte **D**. Remuer la pointe de la pipette dans le tube **D1** jusqu'à ce qu'il ne subsiste plus de bactéries sur la pointe.*

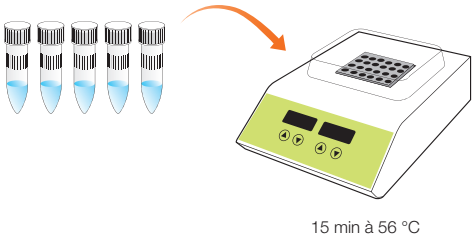


6. *Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque opération et répéter l'étape 5 sur les tubes **D2** et **D3** en prélevant à chaque fois des nouvelles colonies isolées.*

7. *Prendre soin que les bouchons soient bien fermés et tapoter ou faire tourbillonner les tubes pendant 10 s pour les mélanger.*

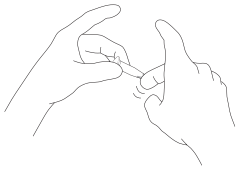


8. ***Incuber les tubes à sec ou au bain-marie pendant 15 min à 56 °C.***

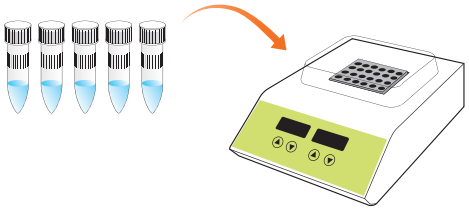


15 min à 56 °C

9. ***Laisser le tube refroidir un peu, puis les tapoter ou les faire tourbillonner pendant 10 s pour les mélanger.***

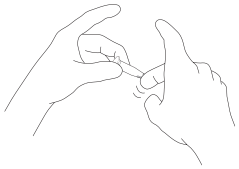


10. ***Incuber les tubes à sec ou au bain-marie pendant 8 min à 95 °C.***



8 min à 95 °C

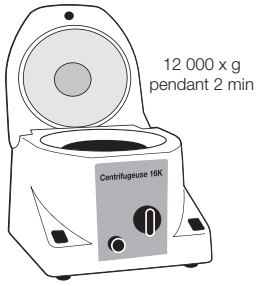
11. ***Laisser le tube refroidir un peu, puis les tapoter ou les faire tourbillonner pendant 10 s pour les mélanger.***



STOP

ARRÊTER. Demander à l'enseignant s'il est nécessaire de procéder à l'analyse maintenant ou le lendemain. Conserver les échantillons au réfrigérateur à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse.

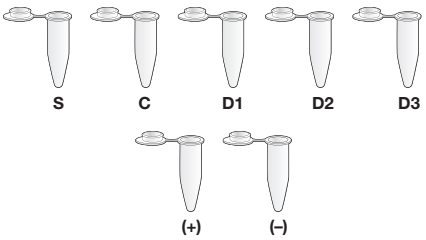
12. ***Centrifuger les tubes à 6 000 x g pendant 5 min ou à 12 000 x g pendant 2 min.***



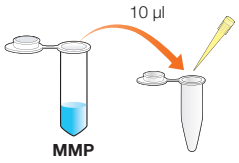
12 000 x g
pendant 2 min

Préparation et amplification des échantillons PCR

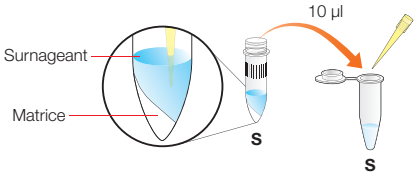
13. *Étiqueter sept tubes PCR en y reportant les mentions **S, C, D1, D2, D3**, (+), et (–), sans oublier de les parapher.*



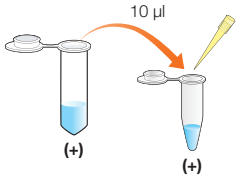
14. *Ajouter 10 µl du mélange de base additionné des amorces (**MMP**) dans chaque tube.*



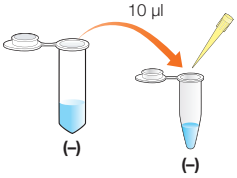
15. *Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque opération et ajouter 10 µl de surnageant de chacun des cinq tubes à bouchon fileté dans les tubes PCR correspondants. **NE PAS transférer des billes de matrice InstaGene, car elles interrompraient la PCR.***



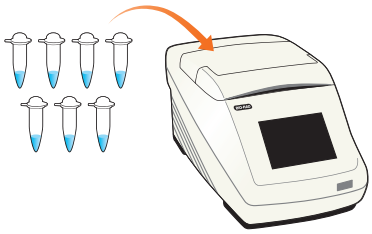
16. *Avec une nouvelle pointe de pipette, ajouter 10 µl d'ADN de contrôle positif (+) pour PCR dans le tube PCR (+).*



17. *Avec une nouvelle pointe de pipette, ajouter 10 µl d'ADN de contrôle négatif (–) pour PCR dans le tube PCR (–).*



18. *Obturer les tubes et les placer dans le thermocycleur.*



19. *Lorsque les échantillons de tous les étudiants sont dans le thermocycleur, lancer le programme suivant :*

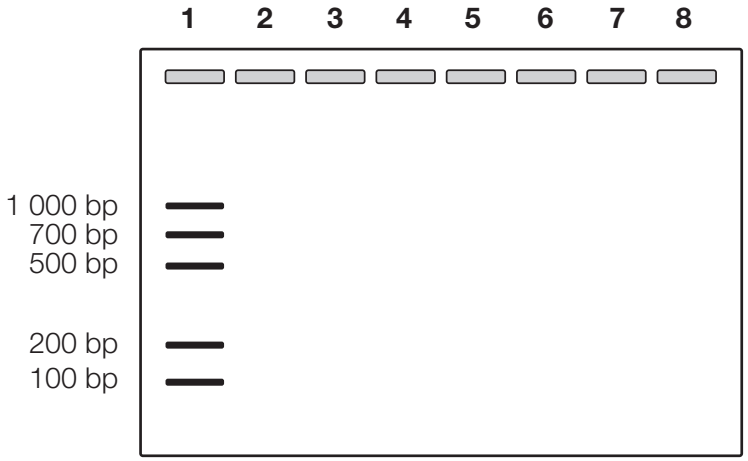
Étape	***Temp., °C***	***Durée***	***Cycles***
Dénaturation initiale	*94*	*5 min*	*1x*
Dénaturation	*94*	*30 s*	*35x*
Hybridation	*62*	*30 s*	
Élongation	*74*	*1 min*	
Élongation finale	*74*	*5 min*	*1x*
Pause	*12*	*–*	*1x*

Partie 3
Électrophorèse sur gel et révélation

Après avoir réalisé la PCR, vous allez utiliser l'électrophorèse sur gel d'agarose pour séparer et révéler les produits de la PCR, ou les amplicons. Étant donné que chaque paire d'amorces produit un amplicon de différentes tailles, ces derniers peuvent être séparés par électrophorèse.

Questions préalables aux travaux de laboratoire

A. Basez-vous sur les réponses reportées au tableau 1 et présentez schématiquement les résultats attendus de l'électrophorèse dans l'illustration ci-dessous.



Bande	Échantillon
1	Étalon de masse moléculaire (**MWR**)
2	Échantillon PCR **S**
3	Échantillon PCR **C**
4	Échantillon PCR **D1**
5	Échantillon PCR **D2**
6	Échantillon PCR **D3**
7	Contrôle positif pour PCR (**+**)
8	Contrôle négatif pour PCR (**–**)

B. De quelle manière les résultats obtenus à l'issue de l'électrophorèse pourraient-ils confirmer la réussite de la PCR?

C. De quelle manière les résultats obtenus à l'issue de l'électrophorèse pourraient-ils confirmer que l'extraction d'ADN génomique de vos échantillons de bactéries a réussie?

D. Identifiez et résumez l'objectif visé par chaque contrôle expérimental.

Protocole

Poste de travail de l'étudiant

Matériels	Quantité
Échantillons PCR préparés dans la partie 2 (**S**, **C**, **D1**, **D2**, **D3**, (**+**), (**–**))	7
Étalon de masse moléculaire (**MWR**)	15 µl
Colorant (**LD**)	40 µl
Gel d'agarose à 1 % avec 8 puits	1
Tampon d'électrophorèse 0.25x TAE	300 ml
Colorant pour ADN Fast Blast (100x) Stain, pour l'utilisation	50 ml
d'une chambre d'électrophorèse horizontale sur gel	1
Alimentation électrique	1
Micropipette et pointes à volume réglable de 2 – 20 µl	1
Plateau de coloration du gel (option)	1

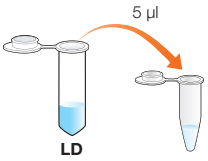
Poste de travail de base

Matériels	Quantité
Microcentrifugeuse	4 – 8
Transilluminateur UV (pour l'utilisation des colorants UView 6x Loading Dye and Stain)	1

Chargement des échantillons PCR et réalisation de l'électrophorèse

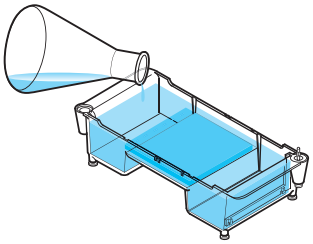
1. ***Centrifuger les échantillons PCR par impulsions pour déposer les composants au fond des tubes.*** →

2. ***Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque opération et ajouter 5 µl de colorant (LD) dans chaque échantillon. Pipetter doucement pour mélanger.*** →

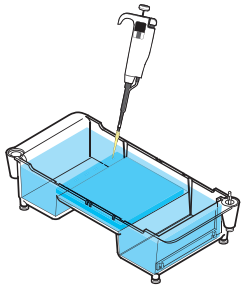


3. ***Placer du gel d'agarose TAE à 1 % dans la chambre d'électrophorèse. Faire en sorte que le gel soit orienté de manière à ce que les puits soient le plus près possible de l'électrode noire (–), soit la cathode.***

4. ***Remplir la chambre d'électrophorèse avec une quantité suffisante de tampon d'électrophorèse TAE pour couvrir le gel d'environ 2 mm.*** →

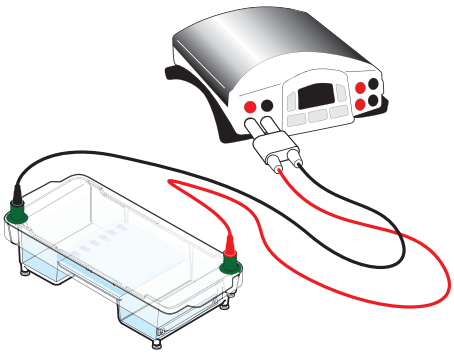


5. *Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque échantillon et charger les échantillons dans les puits en suivant le tableau ci-dessous.*



Bande	Échantillon	Volume, µl
1	Étalon de masse moléculaire (**MWR**)	15
2	Contrôle PCR positif (**+**)	15
3	Échantillon PCR (**S**)	15
4	Échantillon PCR (**C**)	15
5	Échantillon PCR (**D1**)	15
6	Échantillon PCR (**D2**)	15
7	Échantillon PCR (**D3**)	15
8	Contrôle PCR négatif (**–**)	15

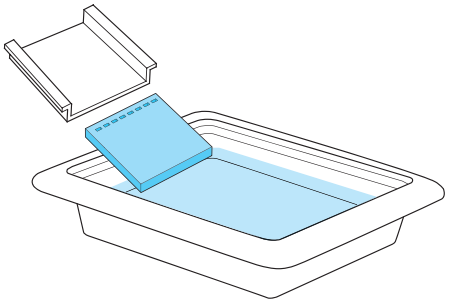
6. *Replacer le couvercle sur la chambre d'électrophorèse et raccorder les câbles à l'alimentation électrique, le rouge sur le rouge et le noir sur le noir.*



7. *Mettre sous tension et analyser le gel. Demander à l'enseignant les paramètres d'analyse.*

Révélation des bandes d'ADN

8. *Retirer le gel de la chambre avec précaution et le transférer dans un plateau de coloration.*



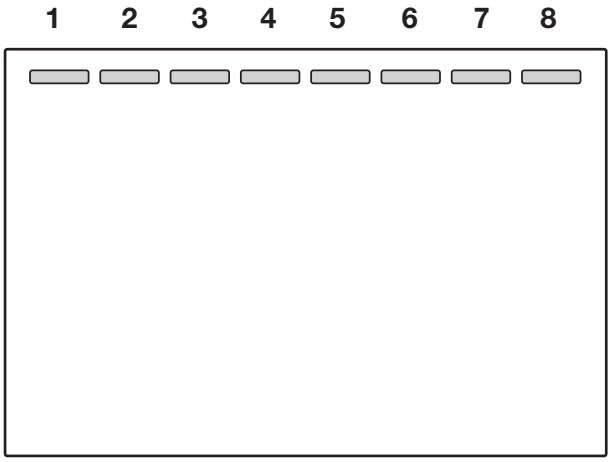
9. *Colorer et/ou observer le gel en suivant les instructions de l'enseignant.*

Partie 4

Analyse des données et argumentation

Questions postérieures aux travaux de laboratoire

A. Notez les résultats de l'électrophorèse. Étiquetez les bandes de l'étalon de masse moléculaire. Voir p. 9 pour connaître la taille des bandes.



Bande	Échantillon
1	Étalon de masse moléculaire (**MWR**)
2	Échantillon PCR **S**
3	Échantillon PCR **C**
4	Échantillon PCR **D1**
5	Échantillon PCR **D2**
6	Échantillon PCR **D3**
7	Contrôle positif pour PCR (**+**)
8	Contrôle négatif pour PCR (**–**)

B. Exposez les résultats des contrôles de votre expérience et décrivez ce que vous pouvez en conclure.

C. Dans le tableau 2 ci-dessous, cochez les amplicons que vous observez dans chaque échantillon PCR. Sur la base des résultats obtenus, remplissez la colonne « État du gène* lacZ *» et reportez-y vos conclusions sur le gène* lacZ *pour chaque échantillon. Relevez tous les résultats qui diffèrent des résultats prévus mentionnés au tableau 1.

Tableau 2. Tableau récapitulatif des résultats de la PCR

	Amplicon			
Échantillon PCR	**1 100 bp**	**650 bp**	**350 bp**	**État du gène *lacZ***

C. Les résultats de la PCR multiplex réfutent-ils l'une des affirmations (initiale ou alternative) que vous avez avancées dans la partie 1? Expliquez pourquoi.

D. Sur la base des preuves obtenues, formulez une nouvelle affirmation ou un ensemble d'affirmations sur le rôle de la technologie CRISPR dans l'édition du gène* lacZ *chez les bactéries cultivées dans les boîtes C et D de l'expérience. Incluez les preuves obtenues lors des vos expériences de transformation bactérienne et de PCR multiplex.

Glossaire

Amplicon — Une section d'ADN produite par amplification, souvent au moyen d'une PCR. Le produit de la PCR peut être qualifié d'amplicon.

Paire de bases (base pair, bp) — Appariement par liaisons hydrogène de nucléotides complémentaires.

Cas9 — Également appelée « CRISPR-associated protein 9 », cette endonucléase est capable de couper le brin d'ADN à double brin à un endroit spécifique d'une grande séquence de reconnaissance ou à un site recherché. Impliquée dans la défense naturelle de certains procaryotes contre les virus à ADN, cette protéine est aussi largement utilisée dans les applications de génie génétique pour couper l'ADN à des endroits spécifiés par un ARN guide (ARNg).

CRISPR — « Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats » en anglais ou courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées en français; il s'agit de séquences du génome de certains procaryotes qui conservent la mémoire d'infections virales. Avec les protéines associées (Cas), les bactéries utilisent ces séquences pour reconnaître et inactiver les virus concernés lors d'une nouvelle infection. Les scientifiques ont adapté ce système pour l'utiliser en génie génétique.

Chromosome — Une molécule d'ADN contenant l'ensemble ou une partie du patrimoine génétique d'un organisme.

Matrice d'ADN donneur — Une séquence d'ADN nécessaire pour la réparation par recombinaison homologue dans les applications d'édition des gènes par CRISP; il peut inclure une séquence souhaitée, flanquée à ces deux extrémités de combinaisons homologues qui correspondent à la séquence en amont et en aval de la coupure.

Édition du génome — Manipulation de matériel génétique dans des cellules vivantes en ajoutant, supprimant ou remplaçant des séquences d'ADN, généralement dans le but de modifier le phénotype.

Matrice InstaGene — Billes microscopiques qui lient les cations bivalents d'une solution; la liaison ou la séquestration des cations bivalents les rend indisponibles pour les enzymes susceptibles de dégrader la matrice d'ADN.

lacZ — Segment de l'opéron lac chez la bactérie *E. coli*, ce gène encode l'enzyme β-galactosidase. Pendant des décennies, les biologistes moléculaires ont utilisé le gène *lacZ* comme cible pour l'insertion de séquences d'ADN, car la couleur de la colonie bactérienne indique la réussite ou non de l'édition du gène.

Mélange de base — La solution de réactifs de base utilisée pour la PCR; elle contient tous les composants nécessaires (dNTPs (des nucléotides quelconques), amorces, tampon, sels, polymérase, cofacteur de polymérase).

PCR multiplex — Amplification simultanée de plusieurs cibles par réaction en chaîne par polymérase. Plusieurs paires d'amorces sont utilisées pendant la réaction, une pour chaque cible.

Réaction en chaîne par polymérase (PCR) — Processus d'amplification ou de synthèse d'ADN *in vitro* à l'aide d'amorces et de cycles de variation de température.

Amorce — Une courte séquence de nucléotides (généralement d'une taille de 16 – 24 bases) qui reconnaît une séquence spécifique de nucléotides sur la séquence d'ADN recherchée; les amorces utilisées pour la réaction en chaîne par polymérase sont généralement fabriquées en laboratoire.

X-gal — 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, un composé de galactose lié à un noyau indole substitué. Hydrolisé par la β-galactosidase, il produit un pigment bleu insoluble, signe de la présence de β-galactosidase active.

Mentions légales

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc.

Toutes les marques déposées mentionnées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.

© 2022 Bio-Rad Laboratories, Inc.

Ce produit n'est pas destiné à l'auto-médication.

BIO-RAD

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Website *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *00 800 00 24 67 23* ***Belgium*** *00 800 00 24 67 23* ***Brazil*** *4003 0399*
Canada *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *00 800 00 24 67 23* ***Denmark*** *00 800 00 24 67 23* ***Finland*** *00 800 00 24 67 23*
France *00 800 00 24 67 23* ***Germany*** *00 800 00 24 67 23* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *00 800 00 24 67 23* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *0 3 9636050*
Italy *00 800 00 24 67 23* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 2 3473 4460* ***Luxembourg*** *00 800 00 24 67 23* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
The Netherlands *00 800 00 24 67 23* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *00 800 00 24 67 23* ***Poland*** *00 800 00 24 67 23* ***Portugal*** *00 800 00 24 67 23*
Russian Federation *00 800 00 24 67 23* ***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *00 800 00 24 67 23* ***Spain*** *00 800 00 24 67 23* ***Sweden*** *00 800 00 24 67 23*
Switzerland *00 800 00 24 67 23* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 651 8311* ***United Arab Emirates*** *36 1 459 6150* ***United Kingdom*** *00 800 00 24 67 23*

10000122388 Ver C FR *22-0528 0822 Sig 0122*