



Sommaire

II Actes non législatifs

ACCORDS INTERNATIONAUX

- ★ **Décision (UE) 2018/145 du Conseil du 9 octobre 2017 concernant la conclusion, au nom de l'Union, de l'accord multilatéral entre la Communauté européenne et ses États membres, la République d'Albanie, l'ancienne République yougoslave de Macédoine, la Bosnie-Herzégovine, la République de Bulgarie, la République de Croatie, la République d'Islande, la République du Monténégro, le Royaume de Norvège, la Roumanie, la République de Serbie et la Mission d'administration intérimaire des Nations unies au Kosovo * sur la création d'un espace aérien commun européen (EACE) 1**
- ★ **Décision (UE) 2018/146 du Conseil du 22 janvier 2018 relative à la conclusion, au nom de l'Union, de l'accord euro-méditerranéen relatif aux services aériens entre la Communauté européenne et ses États membres, d'une part, et le Royaume du Maroc, d'autre part 4**

RÈGLEMENTS

- ★ **Règlement (UE) 2018/147 du Conseil du 29 janvier 2018 modifiant le règlement (UE) n° 1370/2013 en ce qui concerne la limitation quantitative applicable à l'achat de lait écrémé en poudre 6**
- ★ **Règlement délégué (UE) 2018/148 de la Commission du 27 septembre 2017 modifiant les annexes II, III et IV du règlement (UE) n° 978/2012 du Parlement européen et du Conseil appliquant un schéma de préférences tarifaires généralisées 8**
- ★ **Règlement délégué (UE) 2018/149 de la Commission du 15 novembre 2017 modifiant le règlement délégué (UE) 2016/1238 en ce qui concerne les exigences relatives à la composition et les caractéristiques de qualité du lait et des produits laitiers admissibles à l'intervention publique et au bénéfice de l'aide au stockage privé 11**

* Cette désignation est sans préjudice des positions sur le statut et est conforme à la résolution 1244 (1999) du Conseil de sécurité des Nations unies, ainsi qu'à l'avis de la Cour internationale de justice sur la déclaration d'indépendance du Kosovo.

- ★ Règlement d'exécution (UE) 2018/150 de la Commission du 30 janvier 2018 modifiant le règlement d'exécution (UE) 2016/1240 en ce qui concerne les méthodes à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers admissibles à l'intervention publique et au bénéfice de l'aide au stockage privé 14
- ★ Règlement d'exécution (UE) 2018/151 de la Commission du 30 janvier 2018 portant modalités d'application de la directive (UE) 2016/1148 du Parlement européen et du Conseil précisant les éléments à prendre en considération par les fournisseurs de service numérique pour gérer les risques qui menacent la sécurité des réseaux et des systèmes d'information ainsi que les paramètres permettant de déterminer si un incident a un impact significatif 48

DÉCISIONS

- ★ Décision (UE) 2018/152 du Conseil du 29 janvier 2018 portant nomination d'un suppléant du Comité des régions, proposé par la République fédérale d'Allemagne 52

Rectificatifs

- ★ Rectificatif au règlement (UE) 2017/1084 de la Commission du 14 juin 2017 modifiant le règlement (UE) n° 651/2014 en ce qui concerne les aides aux infrastructures portuaires et aéroportuaires, les seuils de notification applicables aux aides en faveur de la culture et de la conservation du patrimoine et aux aides en faveur des infrastructures sportives et des infrastructures récréatives multifonctionnelles, ainsi que les régimes d'aides au fonctionnement à finalité régionale en faveur des régions ultrapériphériques, et modifiant le règlement (UE) n° 702/2014 en ce qui concerne le calcul des coûts admissibles (JO L 156 du 20.6.2017) 53

II

(Actes non législatifs)

ACCORDS INTERNATIONAUX

DÉCISION (UE) 2018/145 DU CONSEIL

du 9 octobre 2017

concernant la conclusion, au nom de l'Union, de l'accord multilatéral entre la Communauté européenne et ses États membres, la République d'Albanie, l'ancienne République yougoslave de Macédoine, la Bosnie-Herzégovine, la République de Bulgarie, la République de Croatie, la République d'Islande, la République du Monténégro, le Royaume de Norvège, la Roumanie, la République de Serbie et la Mission d'administration intérimaire des Nations unies au Kosovo * sur la création d'un espace aérien commun européen (EACE)

LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne, et notamment son article 100, paragraphe 2, en liaison avec l'article 218, paragraphe 6, point a),

vu la proposition de la Commission européenne,

vu l'approbation du Parlement européen ⁽¹⁾,

considérant ce qui suit:

- (1) La Commission a négocié, au nom de la Communauté européenne et des États membres, un accord multilatéral entre la Communauté européenne et ses États membres, la République d'Albanie, l'ancienne République yougoslave de Macédoine, la Bosnie-Herzégovine, la République de Bulgarie, la République de Croatie, la République d'Islande, la République du Monténégro, le Royaume de Norvège, la Roumanie, la République de Serbie et la Mission d'administration intérimaire des Nations unies au Kosovo sur la création d'un espace aérien commun européen (EACE) (ci-après dénommé «l'accord»).
- (2) L'accord a été signé au nom de la Communauté le 9 juin 2006, sous réserve de sa conclusion à une date ultérieure, conformément à la décision 2006/682/CE du Conseil et des représentants des États membres de l'Union européenne réunis au sein du Conseil ⁽²⁾.
- (3) L'accord a été ratifié par tous les États membres.
- (4) À la suite de leur adhésion respective à l'Union, la République de Bulgarie, la Roumanie et la République de Croatie sont devenues des États membres et ont dès lors automatiquement cessé d'être des parties associées en vertu de l'accord conformément à l'article 31, paragraphe 2, de l'accord. Il convient que ce point soit rappelé dans une notification à formuler au moment du dépôt de l'instrument d'approbation de l'accord.

* Cette désignation est sans préjudice des positions sur le statut et est conforme à la résolution 1244 (1999) du Conseil de sécurité des Nations unies, ainsi qu'à l'avis de la Cour internationale de justice sur la déclaration d'indépendance du Kosovo.

⁽¹⁾ JO C 81E du 15.3.2011, p. 5.

⁽²⁾ Décision 2006/682/CE du Conseil et des représentants des États membres de l'Union européenne réunis au sein du Conseil du 9 juin 2006 concernant la signature et l'application provisoire de l'accord multilatéral entre la Communauté européenne et ses États membres, la République d'Albanie, l'ancienne République yougoslave de Macédoine, la Bosnie-Herzégovine, la République de Bulgarie, la République de Croatie, la République d'Islande, la République du Monténégro, le Royaume de Norvège, la Roumanie, la République de Serbie et la Mission d'administration intérimaire des Nations unies au Kosovo sur la création d'un espace aérien commun européen (EACE) (JO L 285 du 16.10.2006, p. 1).

- (5) En ce qui concerne les modifications de l'annexe I de l'accord ne portant que sur l'inclusion d'actes législatifs de l'Union dans ladite annexe, devant être adoptées par le comité mixte institué en vertu de l'article 18 de l'accord, le pouvoir d'approuver ces modifications au nom de l'Union devrait être conféré à la Commission, après consultation d'un comité spécial nommé par le Conseil.
- (6) Dans tous les autres cas, la position à prendre, au nom de l'Union, au sein du comité mixte en ce qui concerne les questions relevant de la compétence de l'Union devrait être établie au cas par cas, conformément aux dispositions pertinentes du traité sur le fonctionnement de l'Union européenne (TFUE).
- (7) Étant donné que l'Union et ses États membres sont conjointement parties à l'accord, une coopération étroite entre eux est essentielle. Afin que cette coopération étroite et l'unité de la représentation extérieure au sein du comité mixte soient assurées, et sans préjudice des traités, et notamment de l'article 16, paragraphe 1, du traité sur l'Union européenne et de l'article 218, paragraphe 9, du TFUE, il convient que, en ce qui concerne les questions relevant de la compétence tant de l'Union que des États membres, les positions à prendre au sein du comité mixte, au nom de l'Union et des États membres, fassent l'objet d'une coordination préalablement à toute réunion du comité mixte portant sur ces questions.
- (8) L'article 2 de la décision 2006/682/CE contient des dispositions sur l'établissement des positions à prendre au sein du comité mixte durant l'application provisoire de l'accord. Compte tenu de l'arrêt rendu par la Cour de justice le 28 avril 2015 dans l'affaire C-28/12, Commission/Conseil ⁽¹⁾, ces dispositions devraient cesser de s'appliquer à la date d'entrée en vigueur de la présente décision.
- (9) Il y a lieu d'approuver l'accord,

A ADOPTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

1. L'accord multilatéral entre la Communauté européenne et ses États membres, la République d'Albanie, l'ancienne République yougoslave de Macédoine, la Bosnie-Herzégovine, la République de Bulgarie, la République de Croatie, la République d'Islande, la République du Monténégro, le Royaume de Norvège, la Roumanie, la République de Serbie et la Mission d'administration intérimaire des Nations unies au Kosovo sur la création d'un espace aérien commun européen (EACE) est approuvé au nom de l'Union ⁽²⁾.
2. Le président du Conseil désigne la ou les personnes habilitées à procéder, au nom de l'Union, au dépôt de l'instrument d'approbation, prévu à l'article 29, paragraphe 2, de l'accord ⁽³⁾, et à la notification suivante:
 - «1. À la suite de l'entrée en vigueur du traité de Lisbonne, le 1^{er} décembre 2009, l'Union européenne se substitue et succède à la Communauté européenne et, à compter de cette date, exerce tous les droits et assume toutes les obligations de la Communauté européenne. Par conséquent, les références à "la Communauté européenne" dans le texte de l'accord s'entendent, le cas échéant, comme faites à "l'Union européenne".
 2. À la suite de leur adhésion à l'Union européenne, la République de Bulgarie, la Roumanie et la République de Croatie sont devenues des États membres de l'Union européenne et ont dès lors cessé d'être des parties associées en vertu de l'accord conformément à l'article 31, paragraphe 2, de l'accord.»

Article 2

La position à prendre par l'Union en ce qui concerne les décisions prises par le comité mixte en vertu de l'article 17 de l'accord et qui ne portent que sur l'inclusion d'actes législatifs de l'Union à l'annexe I de l'accord, sous réserve des adaptations techniques nécessaires, est arrêtée par la Commission, après consultation d'un comité spécial nommé par le Conseil.

Article 3

L'article 2 de la décision 2006/682/CE cesse de s'appliquer à la date d'entrée en vigueur de la présente décision.

⁽¹⁾ ECLI:EU:C:2015:282.

⁽²⁾ L'accord a été publié au *Journal officiel de l'Union européenne* (JO L 285 du 16.10.2006, p. 3), avec la décision relative à sa signature et à son application provisoire.

⁽³⁾ La date d'entrée en vigueur de l'accord sera publiée au *Journal officiel de l'Union européenne* par les soins du secrétariat général du Conseil.

Article 4

La présente décision entre en vigueur le jour de son adoption.

Fait à Luxembourg, le 9 octobre 2017.

Par le Conseil

Le président

S. KIISLER

DÉCISION (UE) 2018/146 DU CONSEIL**du 22 janvier 2018****relative à la conclusion, au nom de l'Union, de l'accord euro-méditerranéen relatif aux services aériens entre la Communauté européenne et ses États membres, d'une part, et le Royaume du Maroc, d'autre part**

LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne, et notamment son article 100, paragraphe 2, en liaison avec l'article 218, paragraphe 6, point a),

vu la proposition de la Commission européenne,

vu l'approbation du Parlement européen ⁽¹⁾,

considérant ce qui suit:

- (1) La Commission a négocié au nom de l'Union et des États membres un accord euro-méditerranéen relatif aux services aériens avec le Royaume du Maroc (ci-après dénommé «l'accord») conformément à la décision du Conseil autorisant la Commission à ouvrir des négociations.
- (2) L'accord a été signé le 12 décembre 2006 conformément à la décision 2006/959/CE du Conseil et des représentants des gouvernements des États membres de l'Union européenne, réunis au sein du Conseil ⁽²⁾. L'accord a été ratifié par tous les États membres, à l'exception de la Bulgarie, de la Roumanie et de la Croatie. Il est prévu que ces trois États membres adhéreront à l'accord, conformément à l'article 6, paragraphe 2, de leurs actes d'adhésion respectifs.
- (3) En ce qui concerne les modifications de certaines annexes de l'accord devant être adoptées par le comité mixte institué en vertu de l'article 22 de l'accord, le pouvoir d'approuver ces modifications au nom de l'Union devrait être conféré à la Commission, après consultation du comité spécial nommé par le Conseil.
- (4) Dans tous les autres cas, les positions à prendre, au nom de l'Union, au sein du comité mixte en ce qui concerne les questions relevant de la compétence de l'Union devraient être établies au cas par cas, conformément aux dispositions applicables du traité sur le fonctionnement de l'Union européenne (TFUE).
- (5) Étant donné que l'Union et les États membres sont conjointement parties à l'accord, une coopération étroite entre eux est essentielle. Afin que cette coopération étroite et l'unité de la représentation extérieure au sein du comité mixte soient assurées, et sans préjudice des traités, et notamment de l'article 16, paragraphe 1, du traité sur l'Union européenne et de l'article 218, paragraphe 9, du TFUE, il convient que, en ce qui concerne les questions relevant de la compétence tant de l'Union que des États membres, les positions à prendre au sein du comité mixte, au nom de l'Union et des États membres, fassent l'objet d'une coordination préalablement à toute réunion du comité mixte portant sur ces questions.
- (6) Les articles 2 à 5 de la décision 2006/959/CE contiennent des dispositions sur la prise de décisions par le Conseil concernant diverses questions figurant dans l'accord, notamment l'établissement des positions à prendre au sein du comité mixte, et sur les obligations d'information des États membres, durant l'application provisoire de l'accord. Ces dispositions ne sont plus nécessaires ou un terme devrait être mis à leur application compte tenu de l'arrêt rendu par la Cour de justice le 28 avril 2015 dans l'affaire C-28/12, Commission/Conseil ⁽³⁾. Il convient donc que toutes ces dispositions cessent de s'appliquer à la date d'entrée en vigueur de la présente décision.
- (7) Il y a lieu d'approuver l'accord,

⁽¹⁾ JO C 81E du 15.3.2011, p. 5.

⁽²⁾ Décision 2006/959/CE du Conseil et des représentants des gouvernements des États membres de l'Union européenne, réunis au sein du Conseil, du 4 décembre 2006 relative à la signature et à l'application provisoire de l'accord euro-méditerranéen relatif aux services aériens entre la Communauté européenne et ses États membres, d'une part, et le Royaume du Maroc, d'autre part (JO L 386 du 29.12.2006, p. 55).

⁽³⁾ ECLI:EU:C:2015:282.

A ADOPTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

1. L'accord euro-méditerranéen relatif aux services aériens entre la Communauté européenne et ses États membres, d'une part, et le Royaume du Maroc, d'autre part, est approuvé au nom de l'Union ⁽¹⁾.
2. Le président du Conseil est autorisé à désigner la ou les personnes habilitées à remettre au Royaume du Maroc les notes diplomatiques prévues à l'article 30 de l'accord ⁽²⁾ et à procéder à la notification suivante:

«À la suite de l'entrée en vigueur du traité de Lisbonne le 1^{er} décembre 2009, l'Union européenne se substitue et succède à la Communauté européenne et, à compter de cette date, exerce tous les droits et assume toutes les obligations de la Communauté européenne. Par conséquent, les références à "la Communauté européenne" dans le texte de l'accord s'entendent, le cas échéant, comme faites à "l'Union européenne".»

Article 2

Les positions à prendre par l'Union au sein du comité mixte institué en vertu de l'article 22 de l'accord en ce qui concerne la modification des annexes de l'accord, à l'exception de l'annexe I (Services agréés et routes spécifiées) et de l'annexe IV (Dispositions transitoires), sont arrêtées par la Commission après consultation d'un comité spécial nommé par le Conseil.

Article 3

Les articles 2 à 5 de la décision 2006/959/CE cessent de s'appliquer à la date d'entrée en vigueur de la présente décision,

Article 4

La présente décision entre en vigueur le jour de son adoption.

Fait à Bruxelles, le 22 janvier 2018.

Par le Conseil

Le président

F. MOGHERINI

⁽¹⁾ L'accord a été publié au *Journal officiel de l'Union européenne* (JO L 386 du 29.12.2006, p. 57), avec la décision relative à sa signature et à son application provisoire.

⁽²⁾ La date d'entrée en vigueur de l'accord sera publiée au *Journal officiel de l'Union européenne* par les soins du secrétariat général du Conseil.

RÈGLEMENTS

RÈGLEMENT (UE) 2018/147 DU CONSEIL

du 29 janvier 2018

modifiant le règlement (UE) n° 1370/2013 en ce qui concerne la limitation quantitative applicable à l'achat de lait écrémé en poudre

LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne, et notamment son article 43, paragraphe 3,

vu la proposition de la Commission européenne,

considérant ce qui suit:

- (1) Fin juillet 2017, les stocks d'intervention publique dans le secteur du lait écrémé en poudre dans l'Union auraient atteint 357 359 tonnes. En outre, 22 710 tonnes supplémentaires ont été offertes pour l'achat à prix fixe jusqu'à la clôture de la période d'intervention le 30 septembre 2017.
- (2) Le secteur du lait et des produits laitiers connaît actuellement un décalage sans précédent entre les prix des matières grasses et ceux des protéines, du fait du niveau particulièrement élevé de la demande de beurre.
- (3) Les livraisons de lait dans l'Union devraient s'accroître en 2018, ce qui se traduira par une augmentation de la production de beurre et de lait écrémé en poudre.
- (4) Il est probable qu'en 2018, les prix du lait cru payés aux agriculteurs se maintiennent à un niveau qui rend la production laitière rémunératrice en raison de la forte demande actuelle de beurre et de fromage, malgré les prix relativement faibles des protéines du lait.
- (5) Ces facteurs de marché créent pour l'année 2018 une situation exceptionnelle qu'il convient de prendre spécifiquement en considération eu égard au fonctionnement du mécanisme d'intervention publique pour les produits laitiers.
- (6) L'article 3 du règlement (UE) n° 1370/2013 du Conseil ⁽¹⁾ établit une limitation quantitative pour l'achat de lait écrémé en poudre au prix fixe visé à l'article 2 dudit règlement. Dès que cette limite est atteinte, les achats se font par adjudication afin de déterminer le prix d'achat maximal.
- (7) Afin d'éviter que du lait écrémé en poudre ne soit acheté à prix fixe dans une situation dans laquelle cela serait contraire aux objectifs du filet de sécurité, toute intervention publique pour le lait écrémé en poudre devrait s'effectuer par adjudication. À cette fin, il convient que la limitation quantitative applicable à l'achat à prix fixe de lait écrémé en poudre soit fixée à zéro pour l'année 2018.
- (8) Il convient, dès lors, de modifier le règlement (UE) n° 1370/2013 en conséquence.
- (9) Pour que la mesure temporaire prévue par le présent règlement ait un effet immédiat sur le marché et que les opérateurs du marché puissent être informés en temps utile avant le début de la prochaine campagne d'intervention, il convient que le présent règlement entre en vigueur le jour suivant celui de sa publication,

⁽¹⁾ Règlement (UE) n° 1370/2013 du Conseil du 16 décembre 2013 établissant les mesures relatives à la fixation de certaines aides et restitutions liées à l'organisation commune des marchés des produits agricoles (JO L 346 du 20.12.2013, p. 12).

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

À l'article 3, paragraphe 1, du règlement (UE) n° 1370/2013, l'alinéa suivant est ajouté:

«Par dérogation au premier alinéa, en 2018, la limitation quantitative applicable à l'achat de lait écrémé en poudre à prix fixe est de zéro tonne.».

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 29 janvier 2018.

Par le Conseil
Le président
R. PORODZANOV

RÈGLEMENT DÉLÉGUÉ (UE) 2018/148 DE LA COMMISSION**du 27 septembre 2017****modifiant les annexes II, III et IV du règlement (UE) n° 978/2012 du Parlement européen et du Conseil appliquant un schéma de préférences tarifaires généralisées**

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (UE) n° 978/2012 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2012 appliquant un schéma de préférences tarifaires généralisées et abrogeant le règlement (CE) n° 732/2008 du Conseil ⁽¹⁾, et notamment son article 5, paragraphe 3, son article 10, paragraphe 5, et son article 17, paragraphe 2,

considérant ce qui suit:

- (1) L'article 4 du règlement (UE) n° 978/2012 établit les critères d'octroi des préférences tarifaires au titre du régime général du schéma de préférences généralisées (ci-après le «SPG»).
- (2) Les points a) et b) de l'article 4, paragraphe 1, du règlement (UE) n° 978/2012 disposent respectivement qu'un pays classé comme pays à revenu élevé ou à revenu moyen supérieur par la Banque mondiale pendant trois années consécutives, ou bénéficiant d'un régime d'accès préférentiel au marché qui lui offre les mêmes préférences tarifaires que le SPG, voire des conditions plus favorables, pour la quasi-totalité des échanges ne peut bénéficier du SPG.
- (3) La liste des pays bénéficiaires du régime général du SPG visé à l'article 1^{er}, paragraphe 2, point a), du règlement (UE) n° 978/2012 figure à l'annexe II dudit règlement. L'article 5, paragraphe 2, du règlement (UE) n° 978/2012 prévoit que l'annexe II doit être réexaminée au plus tard le 1^{er} janvier de chaque année. Le réexamen devrait tenir compte des changements intervenus dans les conditions économiques, commerciales ou de développement des pays bénéficiaires en ce qui concerne les critères énoncés à l'article 4.
- (4) Conformément à l'article 5, paragraphe 2, du règlement (UE) n° 978/2012, il convient de laisser au pays bénéficiaire du SPG et aux opérateurs économiques suffisamment de temps pour s'adapter dans de bonnes conditions au changement de statut du pays au regard du SPG. Par conséquent, le régime du SPG est maintenu pendant un an après la date d'entrée en vigueur d'une modification du statut d'un pays tel que visé à l'article 4, paragraphe 1, point a), et pendant deux ans à partir de la date d'application d'un régime d'accès préférentiel au marché tel que visé à l'article 4, paragraphe 1, point b).
- (5) Le Paraguay a été classé par la Banque mondiale comme pays à revenu moyen supérieur en 2015, 2016 et 2017. En conséquence, ce pays n'a plus droit au statut de bénéficiaire du SPG au titre de l'article 4, paragraphe 1, point a), du règlement (UE) n° 978/2012 et il convient de le retirer de la liste des pays bénéficiaires du SPG figurant à l'annexe II dudit règlement, avec effet au 1^{er} janvier 2019.
- (6) Des régimes d'accès préférentiel au marché ont commencé à être appliqués à la Côte d'Ivoire le 3 septembre 2016, au Swaziland le 10 octobre 2016 et au Ghana le 15 décembre 2016. En conséquence, conformément à l'article 4, paragraphe 1, point b), il convient aussi de retirer ces pays de l'annexe II du règlement (UE) n° 978/2012, avec effet au 1^{er} janvier 2019.
- (7) L'article 9, paragraphe 1, du règlement (UE) n° 978/2012 établit des critères d'admissibilité spécifiques pour l'octroi, aux pays bénéficiaires du SPG, de préférences tarifaires au titre du régime spécial d'encouragement en faveur du développement durable et de la bonne gouvernance (ci-après le «SPG+»). La liste des pays bénéficiaires du SPG+ figure à l'annexe III du règlement (UE) n° 978/2012.
- (8) En cessant d'être bénéficiaire du SPG à partir du 1^{er} janvier 2019, le Paraguay cesse également de bénéficier du SPG+ en vertu de l'article 9, paragraphe 1, du règlement (UE) n° 978/2012. Il convient par conséquent de retirer ce pays de l'annexe III dudit règlement, avec effet au 1^{er} janvier 2019.

⁽¹⁾ JO L 303 du 31.10.2012, p. 1.

- (9) L'article 17, paragraphe 1, du règlement (UE) n° 978/2012 prévoit qu'un pays qui est défini par les Nations unies comme étant un pays moins avancé doit bénéficier des préférences tarifaires prévues au titre du régime spécial en faveur des pays les moins avancés [Tout sauf les armes (TSA)]. La liste des pays bénéficiaires de l'initiative TSA figure à l'annexe IV dudit règlement.
- (10) Les Nations unies ont retiré la Guinée équatoriale de la catégorie des pays les moins avancés le 4 juin 2017. En conséquence, ce pays n'est plus admissible au bénéfice de l'initiative TSA au titre de l'article 17, paragraphe 1, du règlement (UE) n° 978/2012 et ne devrait plus être mentionné à l'annexe IV dudit règlement. En vertu de l'article 17, paragraphe 2, du règlement (UE) n° 978/2012, le retrait de la Guinée équatoriale de la liste des pays bénéficiaires de l'initiative TSA doit intervenir après une période de transition de trois ans à partir de la date d'entrée en vigueur du présent règlement, autrement dit au 1^{er} janvier 2021.
- (11) En outre, la Guinée équatoriale a été classée par la Banque mondiale comme pays à revenu élevé en 2015 et pays à revenu moyen supérieur en 2016 et 2017. En conséquence, ce pays n'a plus droit au statut de bénéficiaire du SPG au titre de l'article 4, paragraphe 1, point a), du règlement (UE) n° 978/2012 et il convient aussi de le retirer de la liste des pays bénéficiaires du SPG figurant à l'annexe II dudit règlement, avec effet au 1^{er} janvier 2021,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Modifications du règlement (UE) n° 978/2012

Le règlement (UE) n° 978/2012 est modifié comme suit:

- 1) À l'annexe II, les codes alphabétiques suivants et les pays correspondants sont respectivement supprimés des colonnes A et B:

CI Côte d'Ivoire

GH Ghana

PY Paraguay

SZ Swaziland

- 2) À l'annexe III, le code alphabétique suivant et le pays correspondant sont respectivement supprimés des colonnes A et B:

PY Paraguay

- 3) Aux annexes II et IV, le code alphabétique suivant et le pays correspondant sont respectivement supprimés des colonnes A et B:

GQ Guinée équatoriale

Article 2

Entrée en vigueur et application

Le présent règlement entre en vigueur le 1^{er} janvier 2018.

L'article 1^{er}, paragraphes 1 et 2, est applicable à partir du 1^{er} janvier 2019.

L'article 1^{er}, paragraphe 3, est applicable à partir du 1^{er} janvier 2021.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 27 septembre 2017.

Par la Commission
Le président
Jean-Claude JUNCKER

RÈGLEMENT DÉLÉGUÉ (UE) 2018/149 DE LA COMMISSION**du 15 novembre 2017****modifiant le règlement délégué (UE) 2016/1238 en ce qui concerne les exigences relatives à la composition et les caractéristiques de qualité du lait et des produits laitiers admissibles à l'intervention publique et au bénéfice de l'aide au stockage privé**

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (UE) n° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil du 17 décembre 2013 portant organisation commune des marchés des produits agricoles et abrogeant les règlements (CEE) n° 922/72, (CEE) n° 234/79, (CE) n° 1037/2001 et (CE) n° 1234/2007 du Conseil ⁽¹⁾, et notamment son article 19, paragraphe 1, point a),

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement délégué (UE) 2016/1238 de la Commission ⁽²⁾ fixe les exigences relatives à la composition et les caractéristiques de qualité du lait et des produits laitiers admissibles à l'intervention publique et au bénéfice de l'aide au stockage privé.
- (2) En raison des améliorations techniques dans les méthodes utilisées pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers et en vue d'harmoniser les règles de l'Union en vigueur en ce qui concerne les exigences en matière d'hygiène, il est nécessaire de réexaminer et d'actualiser les paramètres des exigences relatives à la composition et des caractéristiques de qualité de certains produits laitiers admissibles à l'intervention publique et au bénéfice de l'aide au stockage privé.
- (3) Il y a donc lieu de modifier en conséquence les annexes IV et V du règlement délégué (UE) 2016/1238,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Les annexes du règlement délégué (UE) 2016/1238 sont modifiées comme suit:

- a) La partie II de l'annexe IV est remplacée par le texte figurant à l'annexe I du présent règlement.
- b) La partie II de l'annexe V est remplacée par le texte figurant à l'annexe II du présent règlement.

*Article 2*Le présent règlement entre en vigueur le septième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 15 novembre 2017.

Par la Commission
Le président
Jean-Claude JUNCKER

⁽¹⁾ JO L 347 du 20.12.2013, p. 671.

⁽²⁾ Règlement délégué (UE) 2016/1238 de la Commission du 18 mai 2016 complétant le règlement (UE) n° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne l'intervention publique et l'aide au stockage privé (JO L 206 du 30.7.2016, p. 15).

ANNEXE I

«PARTIE II

Exigences de composition et caractéristiques de qualité

Le beurre est une émulsion solide, principalement du type eau dans l'huile, qui présente les caractéristiques de composition et de qualité suivantes:

Paramètres	Teneur et caractéristiques de qualité
Matières grasses	Minimum 82 %
Eau	Maximum 16 %
Matière sèche non grasse	Maximum 2 %
Acides gras	1,2 mmole/100 g de matières grasses au maximum
Indice de peroxyde	0,3 meq d'oxygène/1 000 g de matières grasses au maximum
Matières grasses non lactiques	Non détectables par l'analyse des triglycérides
Caractéristiques sensorielles	Au moins 4 points sur 5 pour l'aspect, le goût et la consistance»

ANNEXE II

«PARTIE II

Exigences de composition et caractéristiques de qualité

Paramètres	Teneur et caractéristiques de qualité
Protéines	Minimum 34,0 % sur l'extrait sec non gras
Matières grasses	Maximum 1,00 %
Eau	Maximum 3,5 %
Acidité titrable en millilitres de solution d'hydroxyde de sodium décinormale	Maximum 19,5 ml
Lactates	Maximum 150 mg/100 g
Test de la phosphatase	Négative, c'est-à-dire activité phosphatasique ne dépassant pas 350 mU par litre de lait reconstitué
Indice de solubilité	Maximum 0,5 ml (24 °C)
Particules brûlées	Maximum 15,0 mg, à savoir au moins disque B
Micro-organismes	Maximum 40 000 UFC par g
Babeurre ⁽¹⁾	Néant ⁽²⁾
Lactosérum présure ⁽³⁾	Néant
Lactosérum acide ⁽³⁾	Néant ⁽⁴⁾ ou maximum 150 mg/100 g ⁽⁵⁾
Goût et odeur	Propre
Apparence	Couleur blanche ou légèrement jaunâtre, absence d'impuretés et de parcelles colorées

⁽¹⁾ On entend par "babeurre": le sous-produit de la fabrication du beurre, obtenu après barattage ou butyrication de la crème et séparation de la phase grasse solide.

⁽²⁾ L'absence de babeurre est établie soit par un contrôle sur place de l'atelier de production, effectué au moins une fois par semaine sans notification préalable, soit par l'analyse de laboratoire du produit fini indiquant maximum 69,31 mg de phosphatidyléthanola mine dipalmitoyl (PEDP) par 100 g.

⁽³⁾ On entend par "lactosérum": le sous-produit de la fabrication du fromage ou de la caséine par l'action des acides, de la présure et/ou des procédés chimico-physiques.

⁽⁴⁾ Lorsque des contrôles sur place sont effectués.

⁽⁵⁾ Lorsque la norme ISO 8069 est appliquée.»

RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2018/150 DE LA COMMISSION**du 30 janvier 2018****modifiant le règlement d'exécution (UE) 2016/1240 en ce qui concerne les méthodes à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers admissibles à l'intervention publique et au bénéfice de l'aide au stockage privé**

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (UE) n° 1306/2013 du Parlement européen et du Conseil du 17 décembre 2013 relatif au financement, à la gestion et au suivi de la politique agricole commune et abrogeant les règlements (CEE) n° 352/78, (CE) n° 165/94, (CE) n° 2799/98, (CE) n° 814/2000, (CE) n° 1290/2005 et (CE) n° 485/2008 du Conseil ⁽¹⁾, et notamment son article 62, paragraphe 2, point i),

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement délégué (UE) 2016/1238 de la Commission ⁽²⁾ et le règlement d'exécution (UE) 2016/1240 de la Commission ⁽³⁾ prévoient les règles concernant l'intervention publique et l'aide au stockage privé. Le règlement (CE) n° 273/2008 de la Commission ⁽⁴⁾ définit les méthodes à appliquer pour déterminer si le lait et les produits laitiers satisfont aux conditions d'admissibilité fixées dans ces règlements en ce qui concerne l'intervention publique et l'aide au stockage privé.
- (2) À la lumière du progrès technique dans les méthodes utilisées pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers, il convient d'apporter des modifications substantielles à la réglementation en vigueur afin de simplifier et de prévoir une mise à jour des références aux normes ISO. Par souci de clarté et d'efficacité, et compte tenu de l'ampleur et du caractère technique des modifications à apporter aux dispositions du règlement (CE) n° 273/2008, il convient d'intégrer les dispositions concernées dudit règlement dans le règlement d'exécution (UE) 2016/1240.
- (3) Afin d'assurer un respect uniforme des nouvelles normes et méthodes dans l'ensemble des États membres, il importe que les laboratoires disposent d'un laps de temps suffisant pour examiner les procédures et appliquer les méthodes actualisées.
- (4) Il convient, dès lors, de modifier le règlement d'exécution (UE) 2016/1240 en conséquence.
- (5) Par souci de sécurité juridique, il convient d'abroger le règlement (CE) n° 273/2008.
- (6) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de l'organisation commune des marchés agricoles,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Le règlement d'exécution (UE) 2016/1240 est modifié comme suit:

- 1) l'article 4 est modifié comme suit:
 - a) le paragraphe 1 est modifié comme suit:
 - i) le point d) est remplacé par le texte suivant:

«d) pour le beurre: à l'annexe IV, parties I et I bis, du présent règlement.»;
 - ii) le point e) est remplacé par le texte suivant:

«e) pour le lait écrémé en poudre: à l'annexe V, parties I et I bis, du présent règlement.»;

⁽¹⁾ JO L 347 du 20.12.2013, p. 549.

⁽²⁾ Règlement délégué (UE) 2016/1238 de la Commission du 18 mai 2016 complétant le règlement (UE) n° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne l'intervention publique et l'aide au stockage privé (JO L 206 du 30.7.2016, p. 15).

⁽³⁾ Règlement d'exécution (UE) 2016/1240 de la Commission du 18 mai 2016 portant modalités d'application du règlement (UE) n° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne l'intervention publique et l'aide au stockage privé (JO L 206 du 30.7.2016, p. 71).

⁽⁴⁾ Règlement (CE) n° 273/2008 de la Commission du 5 mars 2008 portant modalités d'application du règlement (CE) n° 1255/1999 du Conseil en ce qui concerne les méthodes à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers (JO L 88 du 29.3.2008, p. 1).

b) le paragraphe 2 est remplacé par le texte suivant:

«2. Les méthodes à utiliser pour déterminer la qualité des céréales, du beurre et du lait écrémé en poudre destinés à l'intervention publique visées respectivement aux annexes I, IV et V sont celles établies par les dernières versions des normes européennes ou internationales pertinentes, selon le cas, qui sont en vigueur depuis au moins 6 mois avant le premier jour de la période d'intervention publique établie à l'article 12 du règlement (UE) n° 1308/2013.»;

2) l'article 60 bis suivant est inséré:

«Article 60 bis

Dispositions spécifiques concernant les contrôles relatifs à l'intervention publique et à l'aide au stockage privé pour le lait et les produits laitiers

1. L'admissibilité du beurre, du lait écrémé en poudre et du fromage au bénéfice de l'aide au stockage privé est établie conformément aux méthodes énoncées respectivement aux annexes VI, VII et VIII.

Ces méthodes sont établies par référence aux dernières versions des normes européennes ou internationales pertinentes, selon le cas, qui sont en vigueur depuis au moins 6 mois avant le premier jour de la période d'intervention publique établie à l'article 12 du règlement (UE) n° 1308/2013.

2. Les résultats des contrôles effectués en appliquant les méthodes exposées dans le présent règlement sont évalués conformément à l'annexe IX.»;

3) les annexes sont modifiées conformément à l'annexe du présent règlement.

Article 2

Le règlement (CE) n° 273/2008 est abrogé.

Article 3

Le présent règlement entre en vigueur le septième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 30 janvier 2018.

Par la Commission
Le président
Jean-Claude JUNCKER

ANNEXE

Les annexes du règlement d'exécution (UE) 2016/1240 sont modifiées comme suit:

1) L'annexe IV est modifiée comme suit:

a) à la partie I, point 2, le deuxième alinéa est remplacé par le texte suivant:

«Chaque échantillon doit être évalué individuellement. Aucun rééchantillonnage ni aucune réévaluation ne sont autorisés.»;

b) la partie I bis suivante est insérée:

«PARTIE I BIS

Méthodes d'analyse du beurre non salé destiné à l'intervention publique

Paramètre	Méthode
Matières grasses ⁽¹⁾	ISO 17189 ou ISO 3727 partie 3
Eau	ISO 3727 partie 1
Matières sèches non grasses	ISO 3727 partie 2
Acides gras	ISO 1740
Indice de peroxyde	ISO 3976
Matières grasses non lactiques	ISO 17678
Caractéristiques sensorielles	ISO 22935, parties 2 et 3, et grille d'évaluation ci-après.

(1) La méthode à appliquer est agréée par l'organisme payeur.

Grille d'évaluation

Apparence		Consistance		Odeur et goût	
Points	Commentaires	Points	Commentaires	Points	Commentaires
5	<i>Très bonne</i> Type idéal Qualité la plus élevée (taux d'humidité uniforme)	5	<i>Très bonne</i> Type idéal Qualité la plus élevée (parfaite tartinabilité)	5	<i>Très bons</i> Type idéal Qualité la plus élevée (odeur pur beurre très fin)
4	<i>Bonne</i> (pas de défauts apparents)	4	<i>Bonne</i> (pas de défauts apparents)	4	<i>Bons</i> (pas de défauts apparents)
1, 2 ou 3	Tout défaut	1, 2 ou 3	Tout défaut	1, 2 ou 3	Tout défaut»

2) À l'annexe V, la partie I bis suivante est insérée:

«PARTIE I BIS

Méthodes d'analyse du lait écrémé en poudre destiné à l'intervention publique

Paramètre	Méthode
Protéines	ISO 8968 partie 1
Matières grasses	ISO 1736
Eau	ISO 5537
Acidité	ISO 6091
Lactates	ISO 8069
Test de la phosphatase	ISO 11816 partie 1
Indice d'insolubilité	ISO 8156
Particules brûlées ⁽¹⁾	ADPI
Micro-organismes	ISO 4833 partie 1
Babeurre	Appendice I
Lactosérum présure ⁽²⁾	Appendices II et III
Lactosérum acide ⁽³⁾	ISO 8069 ou inspections sur place
Contrôles organoleptiques ⁽⁴⁾	ISO 22935 parties 2 et 3.

⁽¹⁾ Des analyses des particules brûlées peuvent être menées de manière systématique. Toutefois, ces analyses doivent toujours être menées si aucun contrôle organoleptique n'est effectué.

⁽²⁾ La méthode à appliquer est agréée par l'organisme payeur (une ou les deux méthodes).

⁽³⁾ La méthode à appliquer est agréée par l'organisme payeur.

⁽⁴⁾ Les contrôles organoleptiques sont effectués lorsque cela est jugé nécessaire à la suite d'une analyse de risque approuvée par l'organisme payeur.

Appendice I

LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE: DOSAGE DE LA PHOSPHATIDYLSÉRINE ET DE LA PHOSPHATIDYLÉTHANOLAMINE**Méthode: CLHP en phase inverse**

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrit une procédure de dosage de la phosphatidylsérine (PS) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) dans le lait écrémé en poudre (LEP) et permet de mettre en évidence les solides du babeurre présents dans le LEP.

2. DÉFINITION

Teneur en PS + PE: la fraction massique de la substance déterminée selon la présente procédure. Le résultat est exprimé en mg de phosphatidyléthanolamine dipalmitoyl (PEDP) pour 100 grammes de poudre.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Extraction au méthanol des aminophospholipides de la poudre de lait reconstitué. Dosage de la PS et de la PE sous forme de dérivés de o-phthaldialdéhyde (OPA) par CLHP en phase inverse (PI) et détection par fluorescence. Dosage de la PS et de la PE dans l'échantillon d'essai par rapport à un échantillon étalon contenant une quantité connue de PEDP.

4. RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau doit être distillée ou avoir un degré de pureté au moins équivalent sauf spécification contraire.

4.1. **Matériel de référence: PEDP, d'une pureté minimale de 99 %**

Note: le matériel de référence doit être stocké à - 18 °C.

4.2. **Réactifs pour la préparation de l'échantillon étalon et de l'échantillon d'essai**

4.2.1. Méthanol de qualité CLHP

4.2.2. Chloroforme de qualité CLHP

4.2.3. Monohydrochlorure de tryptamine

4.3. **Réactifs pour dérivatisation de l'o-phthaldialdéhyde**

4.3.1. Hydroxyde de sodium, solution aqueuse à 12 M

4.3.2. Acide borique, solution aqueuse à 0,4 M ajustée à un pH de 10,0 à l'aide d'hydroxyde de sodium (4.3.1)

4.3.3. 2-mercaptoéthanol

4.3.4. o-phthaldialdéhyde (OPA)

4.4. **Solvants d'élution pour CLHP**

4.4.1. Préparer les solvants d'élution à l'aide de réactifs de qualité CLHP.

4.4.2. Eau de qualité CLHP

4.4.3. Méthanol d'une pureté fluorimétrique testée

4.4.4. Tétrahydrofurane

4.4.5. Phosphate de sodium dihydrogéné

4.4.6. Acétate de sodium

4.4.7. Acide acétique

5. INSTRUMENTS

5.1. **Balance analytique pesant au mg près et d'une lisibilité de 0,1 mg**5.2. **Béchers d'une capacité de 25 et 100 ml**5.3. **Pipettes permettant de délivrer des quantités de 1 et 10 ml**5.4. **Agitateur magnétique**5.5. **Pipettes graduées pouvant délivrer des quantités de 0,2, 0,5 et 5 ml**5.6. **Ballons jaugés d'une capacité de 10, 50 et 100 ml**5.7. **Seringues d'une capacité de 20 et 100 µl**5.8. **Bain ultrasonique**5.9. **Centrifugeuse pouvant fonctionner à 27 000 × g**5.10. **Fioles de verre, d'une capacité d'environ 5 ml**5.11. **Tube gradué d'une capacité de 25 ml**5.12. **pH-mètre d'une précision de 0,1 unité de pH**5.13. **Équipement de CLHP**5.13.1. *Système de pompage réglable, capable de fonctionner à un débit de 1,0 ml/min sous 200 bars*5.13.2. *Autoéchantillonneur avec possibilité de dérivation*5.13.3. *Dispositif de chauffage de colonne capable de maintenir la colonne à 30 °C ± 1 °C*5.13.4. *Détecteur de fluorescence réglé à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm et à une longueur d'onde d'émission de 440 nm*5.13.5. *Intégrateur ou logiciel de traitement de données capable de mesurer une aire de pic*5.13.6. *Colonne LiChrospher® — 100 (250 × 4,6 mm) ou une colonne équivalente garnie d'octadécylsilane (C 18) d'une granulométrie de 5 µm*

6. ÉCHANTILLONNAGE

L'échantillonnage doit être effectué conformément à la norme ISO 707.

7. MODE OPÉRATOIRE

7.1. **Préparation de la solution étalon interne**7.1.1. *Peser 30,0 ± 0,1 mg de monohydrochlorure de tryptamine (4.2.3) dans une fiole jaugée de 100 ml (5.6) et porter jusqu'à la marque avec du méthanol (4.2.1).*7.1.2. *À l'aide d'une pipette, verser 1 ml (5.3) de cette solution dans une fiole jaugée de 10 ml (5.6) et porter jusqu'à la marque avec du méthanol (4.2.1) pour obtenir une concentration de tryptamine de 0,15 mM.*7.2. **Préparation de la solution d'échantillon d'essai**7.2.1. *Peser 1,000 ± 0,001 g de l'échantillon de LEP dans un bécher de 25 ml (5.2). Ajouter 10 ml d'eau distillée à 40 °C ± 1 °C à l'aide d'une pipette (5.3) et remuer à l'aide d'un agitateur magnétique (5.4) pendant 30 minutes pour dissoudre tout amas.*7.2.2. *À l'aide d'une pipette, verser 0,2 ml (5.5) de lait reconstitué dans une fiole jaugée de 10 ml (5.6), ajouter 100 µl de la solution de tryptamine à 0,15 mM (7.1) à l'aide d'une seringue (5.7) et porter jusqu'au trait avec du méthanol (4.2.1). Mélanger soigneusement par retournement et soniquer (5.8) pendant 15 minutes.*7.2.3. *Centrifuger (5.9) à 27 000 × g pendant 10 minutes et recueillir la phase surnageante dans une fiole de verre (5.10).*

Note: stocker la solution de l'échantillon d'essai à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse CLHP.

7.3. Préparation de la solution étalon externe

- 7.3.1. Peser 55,4 mg de PEDP (4.1) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.6) et ajouter environ 25 ml de chloroforme (4.2.2) à l'aide d'un tube gradué (5.11). Chauffer le ballon à bouchon rodé pour le porter à 50 °C ± 1 °C et mélanger soigneusement jusqu'à dissolution du PEDP. Refroidir le ballon à 20 °C, porter jusqu'au trait avec du méthanol (4.2.1) et mélanger par retournement.
- 7.3.2. À l'aide d'une pipette, transvaser 1 ml (5.3) de la solution dans une fiole jaugée de 100 ml (5.6) et porter jusqu'au trait avec du méthanol (4.2.1). À l'aide d'une pipette, transvaser 1 ml (5.3) de la solution dans une fiole jaugée de 10 ml (5.6), ajouter 100 µl (5.7) de la solution de tryptamine à 0,15 mM (7.1) et porter jusqu'au trait avec du méthanol (4.2.1). Mélanger par retournement.

Note: stocker la solution de l'échantillon de référence à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse CLHP.

7.4. Préparation du réactif de dérivation

Peser 25,0 ± 0,1 mg d'OPA (4.3.4) dans une fiole jaugée de 10 ml (5.6), ajouter 0,5 ml (5.5) de méthanol (4.2.1) et mélanger soigneusement pour dissoudre l'OPA. Porter jusqu'à la marque avec une solution d'acide borique (4.3.2) et ajouter 20 µl de 2-mercaptoéthanol (4.3.3) à l'aide d'une seringue (5.7).

Note: conserver le réactif de dérivation à 4 °C dans une fiole de verre sombre; celui-ci reste stable pendant une semaine.

7.5. Dosage par CLHP**7.5.1. Solvants d'éluion (4.4)**

Solvant A: solution de phosphate de sodium dihydrogéné à 0,3 mM et d'acétate de sodium à 3 mM (ajustée à un pH de 6,5 ± 0,1 à l'aide d'acide acétique), méthanol et tétrahydrofurane dans la proportion de 558:440:2 (v/v/v)

Solvant B: méthanol

7.5.2. Degré d'éluion préconisé

Temps (min.)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Débit (ml/min)
Initial	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Note: le degré d'éluion peut obliger à une légère modification en vue d'obtenir la résolution indiquée au schéma 1.

Température de la colonne: 30 °C.

7.5.3. *Volume d'injection: 50 µl de réactif de dérivation et 50 µl de la solution échantillon*

7.5.4. *Équilibrage de la colonne*

En commençant l'expérience sur une base quotidienne, rincer la colonne à l'aide d'un solvant B à 100 % pendant 15 minutes puis la régler selon la formule A:B = 40:60 et équilibrer à 1 ml/min pendant 15 minutes. Effectuer un passage à blanc par injection de méthanol (4.2.1).

Note: avant un stockage de longue durée, rincer la colonne à l'aide d'une solution de méthanol et de chloroforme dans la proportion de 80:20 (v/v) pendant 30 minutes.

7.5.5. *Dosage de la PS et de la PE dans l'échantillon d'essai*

7.5.6. *Effectuer la série d'analyses chromatographiques sans modifier le temps de passage à passage afin d'obtenir des temps de rétention constants. Injecter la solution étalon externe (7.3) toutes les 5 à 10 injections de solution d'échantillon d'essai afin d'évaluer le coefficient de réponse.*

Note: nettoyer la colonne par rinçage à l'aide de solvant B à 100 % (7.5.1) pendant au moins 30 minutes tous les 20 à 25 passages.

7.6. **Mode d'intégration**

7.6.1. *Pic de PEDP*

Éluer le PEDP sous forme d'un seul pic. Déterminer l'aire du pic par intégration de vallée à vallée.

7.6.2. *Pic de tryptamine*

Éluer la tryptamine sous forme d'un pic unique (figure 1). Déterminer l'aire du pic par intégration de vallée à vallée.

7.6.3. *Groupes de pics de PS et de PE*

Dans les conditions décrites (figure 1), la PS est éluee sous forme de 2 pics en partie non résolus précédés d'un pic mineur. La PE est éluee sous forme de 3 pics principaux en partie non résolus. Déterminer l'aire totale de chaque grappe de pics en fixant la ligne de base comme indiqué sur la figure 1.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les teneurs en PS et PE de l'échantillon d'essai sont calculées comme suit:

$$C = 55,36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$$

où:

C = teneur en PS ou PE (mg/100 g de poudre) dans l'échantillon d'essai

A₁ = aire du pic de PEDP de la solution d'échantillon étalon (7.3)

A₂ = aire du pic de PS ou de PE de la solution d'échantillon d'essai (7.2)

T₁ = aire du pic de la tryptamine de la solution d'échantillon étalon (7.3)

T₂ = aire du pic de la tryptamine de la solution d'échantillon d'essai (7.2).

9. PRÉCISION DE LA MÉTHODE

Note: les valeurs relatives à la répétabilité ont été calculées conformément à la norme internationale FIL (*).

9.1. **Répétabilité**

L'écart type relatif de répétabilité, qui exprime la variabilité des résultats d'analyse indépendants obtenus, dans un court intervalle de temps, par le même opérateur utilisant le même appareillage dans les mêmes conditions sur le même échantillon d'essai ne devrait pas dépasser 2 % en valeur relative. Si deux dosages sont effectués dans ces conditions, la différence relative entre les deux résultats ne devrait pas dépasser 6 % de la moyenne arithmétique des résultats.

9.2. Reproductibilité

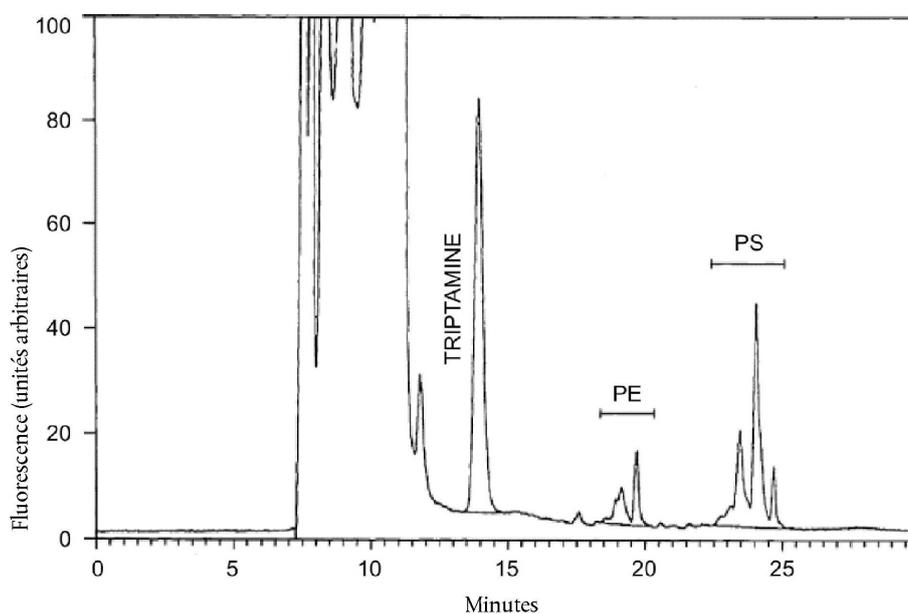
Si deux résultats sont obtenus par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents et utilisant des appareillages différents dans des conditions différentes pour l'analyse du même échantillon d'essai, la différence relative entre les deux résultats ne devrait pas dépasser 11 % de la moyenne arithmétique des résultats.

10. RÉFÉRENCES

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Detection of buttermilk solids in skim milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids." *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 39,395 (1988).

Figure 1

Modèle de CLHP des dérivés d'OPA de la phosphatidylsérine (PS) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) dans un échantillon de lait écrémé en poudre reconstitué extrait au méthanol. Le mode d'intégration des pics de PS, PE et de la tryptamine (étalon interne) est indiqué.



Appendice II

DÉTECTION DU LACTOSÉRUM PRÉSURE DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUVRE DESTINÉ AU STOCKAGE PUBLIC, AU MOYEN DU DOSAGE DES CASÉINOMACROPEPTIDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode permet de mettre en évidence la présence de lactosérum présure dans le lait écrémé en poudre destiné au stockage public, par dosage des caséinomacropéptides.

2. RÉFÉRENCE

Norme Internationale ISO 707 - Lait et produits laitiers - Lignes directrices relatives aux méthodes d'échantillonnage.

3. DÉFINITION

La teneur en lactosérum présure sec est définie comme le pourcentage (en masse) déterminé par la teneur en caséinomacropéptides obtenue par la procédure décrite.

4. PRINCIPE

- Reconstitution du lait écrémé en poudre, élimination des matières grasses et des protéines à l'acide trichloracétique, suivies d'une centrifugation ou d'une filtration.
- Détermination de la quantité de caséinomacropéptides (CMP) présents dans le surnageant par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).
- Évaluation du résultat obtenu par rapport à des échantillons étalons constitués de lait écrémé en poudre exempts ou additionnés d'un pourcentage connu de lactosérum en poudre.

5. RÉACTIFS

Tous les réactifs sont de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée est de l'eau distillée ou de l'eau ayant une pureté au moins équivalente.

5.1. **Solution d'acide trichloracétique**

Dissoudre 240 g d'acide trichloracétique (CCl_3COOH) dans de l'eau et compléter à 1 000 ml. La solution doit être transparente et incolore.

5.2. **Solution éluante, pH 6,0**

Dissoudre 1,74 g de phosphate dipotassique (K_2HPO_4), 12,37 g de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) et 21,41 g de sulfate de sodium (Na_2SO_4) dans 700 ml d'eau environ. Ajuster, si nécessaire, à un pH de 6,0 à l'aide d'une solution d'acide phosphorique ou d'hydroxyde de potassium.

Compléter jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau et homogénéiser.

Note: la composition de l'éluant peut être adaptée en fonction du certificat de conformité aux normes ou des recommandations du fabricant du matériau de garnissage de la colonne.

Filtrer la solution éluante, avant l'utilisation, sur une membrane filtrante de 0,45 micromètre (μm) de diamètre de pore.

5.3. **Solution de lavage**

Mélanger un volume d'acétonitrile (CH_3CN) à 9 volumes d'eau. Filtrer le mélange, avant utilisation, sur une membrane filtrante de 0,45 μm de diamètre de pore.

Note: toute autre solution de lavage ayant un effet bactéricide et n'altérant pas l'efficacité de résolution des colonnes peut être utilisée.

5.4. **Échantillons étalons**

5.4.1. *Lait écrémé en poudre répondant aux exigences du présent règlement, soit [0]*

5.4.2. *Le même lait écrémé en poudre adulteré à 5 % (m/m) par du lactosérum en poudre de type présuré de composition standard, soit [5]*

6. INSTRUMENTS
- 6.1. **Balance analytique**
- 6.2. **Centrifugeuse (facultative) pouvant atteindre une force centrifuge de 2 200 g et munie de tubes à centrifuger bouchés d'une capacité d'environ 50 ml**
- 6.3. **Agitateur mécanique**
- 6.4. **Agitateur magnétique**
- 6.5. **Entonnoirs en verre, d'environ 7 cm de diamètre**
- 6.6. **Papiers filtres, filtration moyenne, d'environ 12,5 cm de diamètre**
- 6.7. **Dispositif de filtration en verre muni de membrane filtrante de 0,45 micromètre de diamètre de pore**
- 6.8. **Pipettes graduées, permettant de délivrer 10 ml (ISO 648, classe A ou ISO/R 835) ou système pouvant délivrer 10,0 ml en deux minutes**
- 6.9. **Système pouvant délivrer 20,0 ml d'eau à 50 °C environ**
- 6.10. **Bain-marie thermostaté réglé à 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **Équipement CLHP comprenant:**
 - 6.11.1. Pompe
 - 6.11.2. Injecteur, manuel ou automatique, d'une capacité de 15 à 30 µl
 - 6.11.3. Deux colonnes en série TSK 2 000-SW (longueur 30 cm, diamètre intérieur 0,75 cm) ou colonnes équivalentes (ex. une TSK 2 000-SWxl et une Agilent Technologies Zorbax GF 250) et une précolonne (3 cm × 0,3 cm) garnie de I 125 ou d'un matériau d'efficacité équivalente
 - 6.11.4. Four à colonne thermostaté réglé à 35 ± 1 °C
 - 6.11.5. Détecteur UV à longueur d'onde variable, permettant d'effectuer des mesures à 205 nm à une sensibilité de 0,008 Å
 - 6.11.6. Intégrateur pouvant intégrer de vallée à vallée

Note: il est possible de travailler avec des colonnes maintenues à température ambiante mais leur pouvoir de résolution est légèrement plus faible. Dans ce cas, les variations de température au cours d'une même série d'analyses doivent être inférieures à ± 5 °C.

7. ÉCHANTILLONNAGE
 - 7.1. Le prélèvement des échantillons est effectué selon la procédure prévue par la norme internationale ISO 707. Les États membres peuvent toutefois utiliser une autre méthode d'échantillonnage pour autant que cette dernière soit conforme aux principes de la norme précitée
 - 7.2. Conserver l'échantillon dans des conditions telles qu'aucune détérioration ou modification de composition ne puisse intervenir
8. MODE OPÉRATOIRE
 - 8.1. **Préparation de l'échantillon d'essai**

Transvaser le lait en poudre dans un récipient d'une capacité équivalant environ au double du volume de la poudre, muni d'un couvercle étanche à l'air. Fermer le récipient immédiatement. Bien mélanger le lait en poudre par retournements successifs du récipient.
 - 8.2. **Prise d'essai**

Peser 2,000 ± 0,001 g d'échantillon d'essai dans un tube à centrifuger (point 6.2) ou dans un ballon à bouchon rodé (50 ml).
 - 8.3. **Élimination des matières grasses et des protéines**
 - 8.3.1. Ajouter 20,0 ml d'eau chaude (50 °C) à la prise d'essai. Dissoudre la poudre en agitant pendant 5 minutes à l'aide de l'agitateur mécanique (6.3). Placer le tube dans le bain-marie (6. 10) et ramener la température du tube à 25 °C.

8.3.2. Ajouter, en deux minutes, 10,0 ml de la solution d'acide trichloracétique (5.1) à 25 °C environ, tout en agitant vigoureusement à l'aide de l'agitateur magnétique (6.4). Placer le tube dans le bain-marie (6.10) et l'y maintenir 60 minutes.

8.3.3. Centrifuger (6.2) à 2 200 g pendant 10 minutes ou filtrer sur papier (6.6). Rejeter les 5 premiers millilitres de filtrat.

8.4. Détermination chromatographique

8.4.1. Injecter de 15 à 30 µl, mesurés exactement, de surnageant ou de filtrat (8.3.3) dans l'appareil CLHP (6.11) sous un débit de 1,0 ml de solution éluante (5.2) par minute.

Note 1: en fonction du diamètre intérieur des colonnes utilisées ou des instructions du fabricant de la colonne, un autre débit peut être utilisé.

Note 2: lors de chaque interruption, rincer les colonnes à l'eau. Ne jamais y laisser la solution éluante (5.2).

Avant toute interruption supérieure à 24 heures, rincer les colonnes à l'eau puis les laver avec la solution (5.3) pendant au moins 3 heures sous un débit de 0,2 ml par minute.

8.4.2. Les résultats de l'analyse chromatographique de l'échantillon d'essai [E] sont obtenus sous la forme d'un chromatogramme où chaque pic est identifié par son temps de rétention RT, soit:

Pic II:	deuxième pic du chromatogramme dont le RT est de 12,5 minutes environ.
Pic III:	troisième pic du chromatogramme, correspondant aux CMP, dont le RT est de 15,5.

La qualité des colonnes peut influencer considérablement sur le temps de rétention des différents pics.

L'intégrateur (6.11.6) calcule automatiquement l'aire A de chaque pic, soit:

A _{II} :	aire du pic II,
A _{III} :	aire du pic III,

Afin de détecter les anomalies éventuelles dues soit à un mauvais fonctionnement de l'appareillage ou des colonnes, soit à l'origine et à la nature de l'échantillon analysé, il est nécessaire d'observer l'aspect de chaque chromatogramme avant toute interprétation quantitative.

En cas de doute, répéter l'analyse.

8.5. Étalonnage

8.5.1. Appliquer aux échantillons étalons (5.4) le mode opératoire exact décrit aux points 8.2 à 8.4.2

Utiliser des solutions fraîchement préparées car les CMP se dégradent en milieu trichloracétique à 8 %. En effet, leur teneur diminue approximativement de 0,2 % par heure à 30 °C.

8.5.2. Avant de procéder à toute détermination chromatographique des échantillons, conditionner les colonnes par injections répétées de la solution (8.5.1) de l'échantillon étalon (5.4.2) jusqu'à ce que l'aire et le temps de rétention du pic correspondant aux CMP soient constants

8.5.3. Déterminer les coefficients de réponse R en injectant le même volume de filtrat (8.5.1) que celui utilisé pour les échantillons

9. EXPRESSION DES RÉSULTATS

9.1. Mode de calcul et formules

9.1.1. Calcul des coefficients de réponse R:

Pic II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$
---------	----------------------------

où:

R_{II} = le coefficient de réponse des pics II,

A_{II} [0] = l'aire des pics II de l'échantillon étalon [0] obtenue au point 8.5.3.

Pic III:	$R_{III} = W/(A_{III}[5] - A_{III}[0])$
----------	---

où:

- R_{III} = le coefficient de réponse du pic III,
 $A_{III}[0]$ and $A_{III}[5]$ = les aires du pic III obtenues au point 8.5.3 respectivement dans les échantillons étalons [0] et [5],
 W = la quantité de lactosérum contenue dans l'échantillon étalon [5], soit 5.

9.1.2. Calcul de l'aire relative des pics de l'échantillon [E]

$$S_{II}[E] = R_{II} \times A_{II}[E]$$

$$S_{III}[E] = R_{III} \times A_{III}[E]$$

$$S_{IV}[E] = R_{IV} \times A_{IV}[E]$$

où:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = respectivement les aires relatives des pics II, III et IV dans l'échantillon [E],
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = respectivement les aires des pics II et III dans l'échantillon [E] obtenues au point 8.4.2,
 R_{II} , R_{III} = le coefficient de réponse calculé au point 9.1.1.

9.1.3. Calcul du temps de rétention relatif du pic III de l'échantillon [E]:

$$RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$$

où:

- $RRT_{III}[E]$ = le temps de rétention relatif du pic III dans l'échantillon [E],
 $RT_{III}[E]$ = le temps de rétention du pic III dans l'échantillon [E] obtenu au point 8.4.2,
 $RT_{III}[5]$ = le temps de rétention du pic III de l'échantillon témoin [5] obtenu au point 8.5.3.

9.1.4. Les expériences ont révélé qu'il existe une relation linéaire entre le temps de rétention relatif du pic III, soit $RRT_{III}[E]$, et le pourcentage de lactosérum en poudre ajouté pour atteindre 10 %

- $RRT_{III}[E]$ est < 1,000 quand la teneur en lactosérum est > 5 %,
- $RRT_{III}[E]$ est \geq 1,000 quand la teneur en lactosérum est \leq 5 %.

Une marge d'erreur de $\pm 0,002$ est appliquée aux valeurs de RRT_{III} .

Normalement, la valeur de $RRT_{III}[0]$ s'écarte très peu de 1,034. Selon l'état des colonnes, cette valeur peut se rapprocher de 1,000 mais elle doit toujours lui être supérieure.

9.2. Calcul du pourcentage de lactosérum présure en poudre dans l'échantillon

$$W = S_{III}[E] - [1, 3 + (S_{III}[0] - 0, 9)]$$

où:

- W = le pourcentage m/m de lactosérum présure présent dans l'échantillon [E];
 $S_{III}[E]$ = l'aire relative du pic III de l'échantillon d'essai [E] obtenue au point 9.1.2;
1,3 = représente l'aire moyenne relative du pic III exprimée en grammes de lactosérum présure pour 100 g déterminée dans du lait écrémé en poudre non adultéré d'origines diverses (chiffre obtenu expérimentalement);
 $S_{III}[0]$ = représente l'aire relative du pic III qui est égale à $R_{III} \times A_{III}[0]$ (valeurs obtenues respectivement aux points 9.1.1 et 8.5.3);
 $(S_{III}[0] - 0,9)$ = représente la correction à apporter à l'aire relative de 1,3 quand $S_{III}[0]$ est différent de 0,9. Expérimentalement, l'aire moyenne relative du pic III de l'échantillon témoin [0] est de 0,9.

9.3. Précision de la procédure

9.3.1. Reproductibilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou dans un court intervalle de temps par le même analyste utilisant le même appareillage sur le même matériel d'essai ne doit pas dépasser 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproductibilité

La différence entre deux résultats individuels et indépendants obtenus dans deux laboratoires différents sur du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 0,4 % m/m.

9.4. Interprétation

9.4.1. Conclure à l'absence de lactosérum si l'aire relative du pic III, $S_{III} [E]$, exprimée en grammes de lactosérum présure pour 100 grammes de produit, est $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$,

où:

2,0	= la valeur maximale autorisée pour l'aire relative du pic III compte tenu de l'aire moyenne relative du pic III, à savoir 1,3, de la marge d'erreur due aux variations de la composition du lait écrémé en poudre et de la reproductibilité de la méthode (9.3.2)
$(S_{III} [0] - 0,9)$	= la correction à apporter quand la surface $S_{III} [0]$ est différente de 0,9 (voir point 9.2)

9.4.2. Si l'aire relative du pic III, $S_{III} [E]$ est $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ et l'aire relative du pic II, $S_{II} [E] \leq 160$, déterminer la teneur en lactosérum présure comme indiqué au point 9.2.

9.4.3. Si l'aire relative du pic III, $S_{III} [E]$ est $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ et l'aire relative du pic II, $S_{II} [E] \leq 160$, déterminer la teneur en matières protéiques totales (P %); examiner ensuite les graphiques 1 et 2.

9.4.3.1. Les données obtenues après analyse d'échantillons de laits écrémés en poudre non adulterés, à teneur en matières protéiques totales élevée, sont regroupées dans les graphiques 1 et 2.

La droite figurant en trait plein représente la droite de régression linéaire dont les coefficients sont calculés par la méthode des moindres carrés.

La droite figurant en trait discontinu fixe la limite supérieure de l'aire relative du pic III, avec une probabilité de ne pas être dépassée dans 90 % des cas.

Les équations des droites en trait discontinu des graphiques 1 et 2 sont respectivement égales à:

$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7$	(graphique 1)
$S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93$	(graphique 2)

où, respectivement:

S_{III} = l'aire relative du pic III calculée soit d'après la teneur en matières protéiques totales, soit d'après l'aire relative du pic $S_{II} [E]$;

P% = la teneur en matières protéiques totales exprimée en pourcentage pondéral,

$S_{II} [E]$ = l'aire relative de l'échantillon calculée au point 9.1.2.

Ces équations sont équivalentes au chiffre 1,3 mentionné au point 9.2.

L'écart (T_1 et T_2) entre la surface relative $S_{III} [E]$ trouvée et la surface relative S_{III} est donné par les relations suivantes: $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P\% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$; $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

9.4.3.2. Si T_1 et/ou T_2 sont inférieurs ou égaux à zéro, la présence de lactosérum présure ne peut être établie.

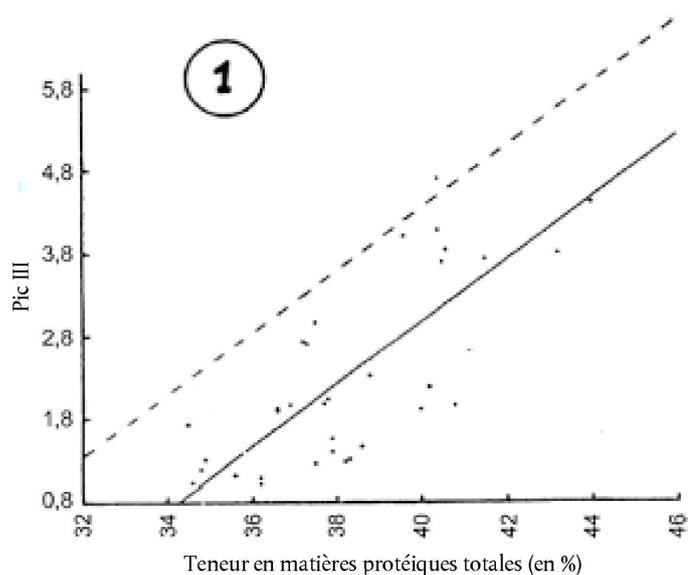
Si T_1 et/ou T_2 sont supérieurs à zéro, l'échantillon contient du lactosérum présure.

La teneur en lactosérum présure est calculée selon la formule suivante: $W = T_2 + 0,91$

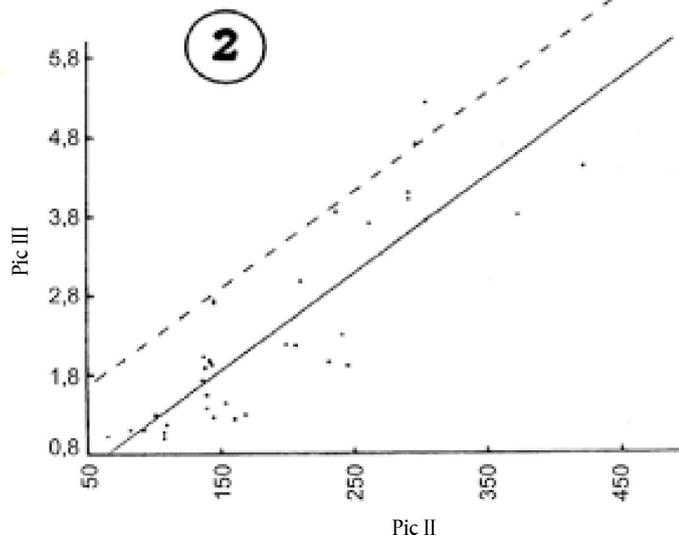
où:

0,91 représente l'écart sur l'axe vertical entre la droite en trait plein et la droite en trait discontinu.

Lait écrémé en poudre



Lait écrémé en poudre



Appendice III

DÉTERMINATION DU LACTOSÉRUM PRÉSURE SEC DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE

1. OBJECTIF: DÉTECTION D'ADDITION DE LACTOSÉRUM PRÉSURE SEC DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE

2. RÉFÉRENCES: NORME INTERNATIONALE ISO 707

3. DÉFINITION

La teneur en lactosérum présure sec est définie comme le pourcentage en masse déterminé par la teneur en caséinomacropéptides par la procédure décrite.

4. PRINCIPE

Les échantillons sont analysés pour détecter les caséinomacropéptides A par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (méthode CLHP). L'évaluation du résultat est obtenue par référence aux échantillons étalons constitués de lait écrémé en poudre avec et sans addition de lactosérum en poudre. Des résultats supérieurs à 1 % (m/m) indiquent la présence de lactosérum présure sec.

5. RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée est de l'eau distillée ou de l'eau ayant une pureté au moins équivalente. L'acétonitrile doit être de qualité spectroscopique ou de qualité CLHP.

5.1. **Solution d'acide trichloracétique**

Dissoudre 240 g d'acide trichloracétique (CCl_3COOH) dans de l'eau et compléter jusqu'à 1 000 ml. La solution doit être transparente et incolore.

5.2. **Éluants A et B**

Éluent A: introduire, dans une fiole jaugée de 1 000 ml, 150 ml d'acétonitrile (CH_3CN), 20 ml d'isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$), et 1,00 ml d'acide trifluoracétique (TFA, CF_3COOH). Compléter jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau.

Éluent B: introduire, dans une fiole jaugée de 1 000 ml, 550 ml d'acétonitrile, 20 ml d'isopropanol et 1,00 ml de TFA. Compléter jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau. Filtrer la solution éluante, avant l'utilisation, sur une membrane filtrante de 0,45 micromètre (μm) de diamètre de pore.

5.3. **Conservation de la colonne**

Après les analyses, la colonne est rincée avec l'éluent B (à l'aide d'un gradient) puis rincée avec de l'acétonitrile (à l'aide d'un gradient pendant 30 minutes). La colonne est conservée dans l'acétonitrile.

5.4. **Échantillons étalons**

5.4.1. *Lait écrémé en poudre répondant aux exigences pour le stockage public, soit [0].*

5.4.2. *Le même lait écrémé en poudre adultéré à 5 % (m/m) par du lactosérum en poudre de type présuré de composition standard, soit [5].*

5.4.3. *Le même lait écrémé en poudre adultéré à 50 % (m/m) par du lactosérum en poudre de type présuré de composition standard, soit [50].*

6. INSTRUMENTS

6.1. **Balance analytique**

6.2. **Centrifugeuse (facultative) pouvant atteindre une force centrifuge de 2 200 g et munie de tubes à centrifuger bouchés d'une capacité d'environ 50 ml**

6.3. **Agitateur mécanique**

6.4. **Agitateur magnétique**

6.5. **Entonnoirs en verre, d'environ 7 cm de diamètre**

- 6.6. **Papiers filtres, filtration moyenne, d'environ 12,5 cm de diamètre**
- 6.7. **Dispositif de filtration en verre muni de membrane filtrante de 0,45 micromètre de diamètre de pore**
- 6.8. **Pipettes graduées, permettant de délivrer 10 ml (ISO 648, classe A ou ISO/R 835) ou un système pouvant délivrer 10,0 ml en deux minutes**
- 6.9. **Système pouvant délivrer 20,0 ml d'eau à 50 °C environ**
- 6.10. **Bain-marie thermostaté réglé à $25 \pm 0,5$ °C**
- 6.11. **Équipement CLHP comprenant:**
 - 6.11.1. *Pompe à gradient binaire*
 - 6.11.2. *Injecteur, manuel ou automatique, de 100 microlitres (μ l) de capacité*
 - 6.11.3. *Une colonne Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (longueur: 25 cm, diamètre intérieur: 0,46 cm) ou une colonne en phase inverse équivalente, à base de silice, à larges pores*
 - 6.11.4. *Four à colonne thermostaté réglé à 35 ± 1 °C*
 - 6.11.5. *Détecteur UV à longueur d'onde variable, permettant d'effectuer des mesures à 210 nm (si nécessaire, une longueur d'onde supérieure pouvant atteindre 220 nm peut être utilisée) à une sensibilité de 0,02 Å*
 - 6.11.6. *Intégrateur pouvant intégrer la ligne de base commune ou intégrer de vallée à vallée*

Note: il est possible de travailler avec des colonnes maintenues à température ambiante à condition que cette température ambiante ne fluctue pas plus de 1 °C; sinon, on constate des variations assez grandes dans le temps de rétention des CMP_A .

7. ÉCHANTILLONNAGE

- 7.1. **Le prélèvement des échantillons est effectué selon la procédure prévue par la norme internationale ISO 707. Les États membres peuvent toutefois utiliser une autre méthode d'échantillonnage pour autant que cette dernière soit conforme aux principes de la norme précitée.**
- 7.2. **Conserver l'échantillon dans des conditions telles qu'aucune détérioration ou modification de composition ne puisse intervenir**

8. MODE OPÉRATOIRE

8.1. Préparation de l'échantillon d'essai

Transvaser le lait en poudre dans un récipient d'une capacité équivalant environ au double du volume de la poudre, muni d'un couvercle étanche à l'air. Fermer le récipient immédiatement. Bien mélanger le lait en poudre par retournements successifs du récipient.

8.2. Prise d'essai

Peser $2,00 \pm 0,001$ g d'échantillon d'essai dans un tube à centrifuger (point 6.2) ou dans un ballon à bouchon rodé (50 ml).

Note: en cas de mélanges, peser une quantité d'échantillon d'essai permettant d'aboutir à une prise d'échantillon dégraissée correspondant à 2,00 g.

8.3. Élimination des matières grasses et des protéines

- 8.3.1. *Ajouter 20,0 ml d'eau chaude (50 °C) à la prise d'essai. Dissoudre la poudre en agitant pendant cinq minutes à l'aide de l'agitateur mécanique (point 6.3). Placer le tube dans le bain-marie (6. 10) et ramener la température du tube à 25 °C.*
- 8.3.2. *Ajouter, en deux minutes, 10,0 ml de la solution d'acide trichloracétique à 25 °C (5.1), tout en agitant vigoureusement à l'aide de l'agitateur magnétique (6.4). Placer le tube dans le bain-marie (6.10) et l'y maintenir 60 minutes.*
- 8.3.3. *Centrifuger (6.2) à 2 200 g pendant dix minutes, ou filtrer sur papier (6.6), rejeter les cinq premiers millilitres de filtrat.*

8.4. Détermination chromatographique

- 8.4.1. La méthode CLHP en phase inverse exclut la possibilité de résultats faux positifs dus à la présence de babeurre acide en poudre.
- 8.4.2. Avant de mettre en œuvre l'analyse CLHP en phase inverse, il faut optimiser les conditions de gradient. Un temps de rétention de 26 minutes \pm 2 minutes pour les CMP_A est idéal pour les systèmes à gradient ayant un volume mort d'environ 6 ml (volume du point où les solvants se retrouvent au volume de la boucle de l'injecteur compris). Dans le cas de systèmes à gradient ayant un volume mort inférieur (par exemple 2 ml), on devrait appliquer comme temps de rétention optimal une durée de 22 minutes.

Préparer les échantillons étalons (5.4) sans et avec 50 % de lactosérum présure.

Injecter 100 μ l de surnageant ou de filtrat (8.3.3) dans l'appareil CLHP en utilisant les conditions du gradient de référence indiquées au tableau 1.

Tableau 1

Conditions du gradient de référence pour l'optimisation de la chromatographie

Temps (min.)	Débit (ml/min.)	% A	% B	Courbe
Début	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	linéaire
32	1,0	10	90	linéaire
37	1,0	10	90	linéaire
42	1,0	90	10	linéaire

La comparaison des deux chromatogrammes doit faire apparaître le pic de CMP_A .

À l'aide de la formule ci-dessous, la composition du solvant initial à utiliser pour le gradient normal (voir le point 8.4.3) peut être calculée comme $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26) / 6) * 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26) / 6) * 1,11$

où:

RT_{CMP_A} : temps de rétention des CMP_A dans le gradient de référence

10: le % B initial du gradient de référence

2,5: % B au point central moins % B au début dans le gradient normal

13,5: temps à mi-parcours du gradient de référence

26: temps de rétention nécessaire pour les CMP_A

6: rapport des pentes du gradient de référence et du gradient normal

30: % B initial moins % B à 27 minutes dans le gradient de référence

27: temps de parcours du gradient de référence.

8.4.3. Injection des échantillons d'essai:

Injecter 100 μ l, mesurés exactement, de surnageant ou de filtrat (8.3.3) dans l'appareil CLHP sous un débit de 1,0 ml de solution éluante (5.2) par minute.

La composition de l'éluant au début de l'analyse découle du point 8.4.2. Elle est normalement proche de A:B = 76:24 (point 5.2). Immédiatement après l'injection, on démarre le gradient linéaire pour arriver après 27 minutes à un pourcentage B supérieur de 5 %. Puis, on démarre le gradient linéaire qui amène la composition de l'éluant B à 90 % en cinq minutes. Cette composition est maintenue pendant cinq minutes. Puis, toujours à l'aide d'un gradient linéaire, revenir à la composition initiale en 5 minutes. Selon le volume interne du système de pompage, l'injection suivante peut être faite 15 minutes après avoir atteint les conditions initiales.

Note 1: le temps de rétention des CMP_A doit être de 26 minutes \pm 2 minutes, ce qui peut être obtenu en modifiant les conditions initiales et les conditions finales du premier gradient. Cependant, la différence dans le % B entre les conditions initiales et les conditions finales du premier gradient doit rester de 5 % B.

Note 2: les éluants doivent être dégazés suffisamment et doivent également être conservés dégazés. Cette exigence est indispensable au bon fonctionnement du système de pompage du gradient. L'écart type concernant le temps de rétention du pic de CMP_A doit être inférieur à 0,1 minute ($n = 10$).

Note 3: tous les cinq échantillons, il y a lieu d'injecter et d'utiliser l'échantillon de référence [5] pour calculer un nouveau coefficient de réponse R (voir 9.1.1).

- 8.4.4. *Les résultats de l'analyse chromatographique de l'échantillon d'essai (E) sont obtenus sous la forme d'un chromatogramme où le pic de CMP_A est identifié par son temps de rétention d'environ 26 minutes*

L'intégrateur (6.11.6) calcule automatiquement la hauteur de pic H du pic de CMP_A . La ligne de base doit être vérifiée pour chaque chromatogramme. L'analyse ou l'intégration doit être répétée si la ligne de base est incorrectement située.

Note: si le pic de CMP_A est suffisamment séparé des autres pics, il convient d'utiliser la ligne de base de vallée à vallée. Dans le cas contraire, appliquer des perpendiculaires de transfert vers une ligne de base commune dont le point de départ doit être voisin du pic de CMP_A (et donc à un moment différent de $t = 0$ min!). Utiliser le même type d'intégration pour l'étalon et les échantillons et vérifier, en cas d'utilisation d'une ligne de base commune, qu'elle est cohérente pour les échantillons et l'étalon.

Afin de détecter les anomalies éventuelles dues soit à un mauvais fonctionnement de l'appareillage ou de la colonne, soit à l'origine et à la nature de l'échantillon analysé, il est nécessaire d'observer l'aspect de chaque chromatogramme avant toute interprétation quantitative. En cas de doute, répéter l'analyse.

8.5. **Étalonnage**

- 8.5.1. *Appliquer aux échantillons étalons (points 5.4.1 et 5.4.2) le mode opératoire exact décrit aux points 8.2 à 8.4.4. Utiliser des solutions fraîchement préparées car le CMP se dégrade en milieu d'acide trichloracétique à 8 %, à température ambiante. À 4 °C la solution reste stable pendant 24 heures. Dans le cas de longues séries d'analyses, il est opportun d'utiliser un plateau d'échantillon refroidi dans l'injecteur automatique.*

Note: le point 8.4.2 peut être omis si le % B aux conditions initiales est connu à partir d'analyses antérieures.

Le chromatogramme de l'échantillon de référence [5] doit être conforme à la figure 1. Sur cette figure, le pic du CMP_A est précédé par deux petits pics. Il est indispensable d'obtenir une séparation comparable.

- 8.5.2. *Avant de procéder à toute détermination chromatographique des échantillons, injecter 100 µl de l'échantillon étalon sans lactosérum présure [0] (5.4.1).*

Le chromatogramme ne doit pas présenter de pic au temps de rétention du pic de CMP_A .

- 8.5.3. *Déterminer les coefficients de réponse R en injectant le même volume de filtrat (8.5.1) que celui utilisé pour les échantillons.*

9. EXPRESSION DES RÉSULTATS

9.1. **Mode de calcul et formules**

- 9.1.1. *Calcul du coefficient de réponse R:*

$$\text{pic de } CMP_A: R = W/H$$

où:

R = le coefficient de réponse du pic de CMP_A

H = la hauteur du pic de CMP_A

W = la quantité de lactosérum dans l'échantillon étalon [5].

9.2. Calcul du pourcentage de lactosérum présure en poudre dans l'échantillon

$$W(E) = R \times H(E)$$

où:

$W(E)$ = le pourcentage (m/m) de lactosérum présure dans l'échantillon (E)

R = le coefficient de réponse du pic de CMP_A (9.1.1)

$H(E)$ = la hauteur du pic de CMP_A de l'échantillon (E)

Si $W(E)$ est supérieur à 1 % et si la différence entre le temps de rétention et celui de l'échantillon étalon [5] est inférieure à 0,2 minute, la présence de lactosérum présure sec est démontrée.

9.3. Précision de la procédure

9.3.1. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou dans un court intervalle de temps par le même analyste utilisant le même appareillage sur le même matériel d'essai ne doit pas dépasser 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproductibilité

Non déterminée.

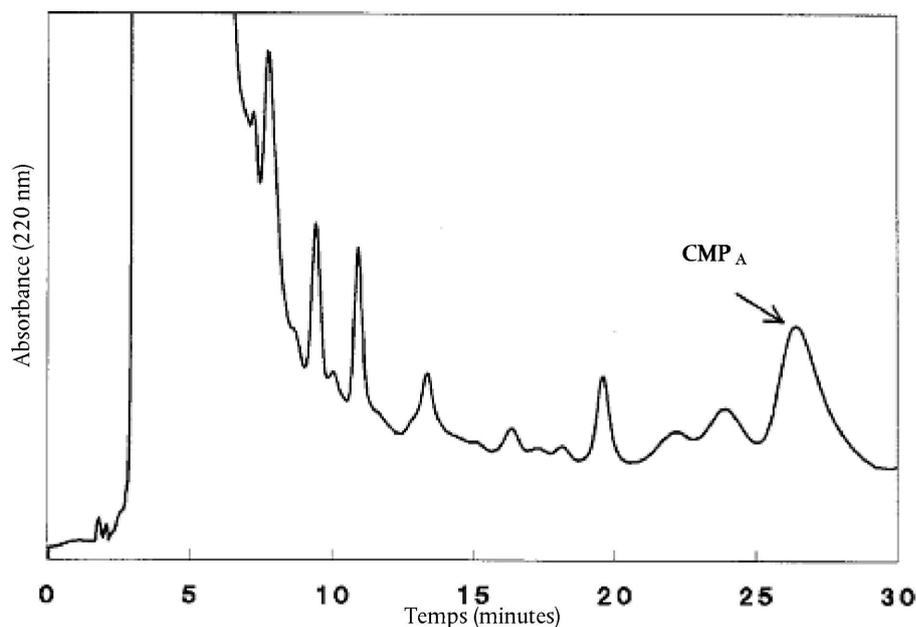
9.3.3. Linéarité

Jusqu'à 16 % de lactosérum présure, on obtient une relation linéaire avec un coefficient de corrélation > 0,99.

9.4. Interprétation

La limite de 1 % tient compte d'une marge d'erreur due à la reproductibilité.

Figure 1
Étalon Ni-4.6



(*) Norme FIL internationale 135B/1991. Lait et produits laitiers. Caractéristiques de fidélité des méthodes d'analyse. Schéma d'une méthode d'étude en collaboration.»

3) Les annexes suivantes sont ajoutées:

«ANNEXE VI

Méthodes d'analyse du beurre en stockage privé

Paramètre	Méthode
Matières grasses ⁽¹⁾	ISO 17189 ou ISO 3727 partie 3
Eau	ISO 3727 partie 1
Matières sèches non grasses (à l'exclusion du sel)	ISO 3727 partie 2
Sel	ISO 15648

(1) La méthode à appliquer est agréée par l'organisme payeur.

ANNEXE VII

Méthodes d'analyse du lait écrémé en poudre en stockage privé

Paramètre	Méthode
Matières grasses	ISO 1736
Protéines	ISO 8968 partie 1
Eau	ISO 5537

ANNEXE VIII

Méthodes d'analyse des fromages en stockage privé

1. La méthode d'analyse figurant à l'appendice est appliquée pour garantir l'absence de caséine de lait de vache dans les fromages produits exclusivement à partir du lait de brebis, du lait de chèvre ou du lait de bufflonne ou à partir d'un mélange de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne.

La caséine de lait de vache est considérée comme présente si la teneur de l'échantillon analysé en caséine de lait de vache est supérieure ou égale à la teneur de l'échantillon de référence contenant 1 % de lait de vache, prévu à l'appendice.

2. Les méthodes pour la détection de la caséine de lait de vache dans les fromages visés au paragraphe 1 peuvent être utilisées dans les conditions suivantes:
 - a) la limite de détection maximale est de 0,5 %;
 - b) il n'y a pas de résultats faux positifs; et
 - c) la caséine de lait de vache est détectable avec la sensibilité requise, même après de longues périodes de maturation, comme cela peut se produire dans les conditions habituelles de l'exploitation commerciale.

Les méthodes de l'appendice s'appliquent si une seule des exigences susmentionnées n'est pas satisfaite.

Appendice

MÉTHODE POUR LA DÉTECTION DE CASÉINATES ET DE LAIT DE VACHE DANS LES FROMAGES À BASE DE LAIT DE BREBIS, DE LAIT DE CHÈVRE OU DE LAIT DE BUFFLONNE, OU DE MÉLANGES DE LAIT DE BREBIS, DE CHÈVRE ET DE BUFFLONNE

1. OBJET

Détection de caséinates et de lait de vache dans les fromages à base de lait de brebis, de lait de chèvre, de lait de bufflonne ou de mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne, au moyen de la focalisation isoélectrique des caséines γ après action de la plasmine.

2. CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode convient pour la détection sensible et spécifique de caséinates et de lait de vache traités ou non thermiquement dans les fromages frais et affinés à base de lait de brebis, de lait de chèvre, de lait de bufflonne ou de mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne. Elle ne convient pas pour la détection de l'adultération du lait et du fromage au moyen de concentrés de protéines de lactosérum de vache traités thermiquement.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

3.1. Isolement des caséines du fromage et des échantillons de référence

3.2. Dissolution des caséines isolées et protéolyse par la plasmine (EC.3.4.21.7)

3.3. Focalisation isoélectrique des caséines soumises à l'action de la plasmine en présence d'urée et coloration des protéines

3.4. Interprétation des profils de caséine γ_3 et γ_2 colorés (identification du lait de vache) par comparaison du profil obtenu pour l'échantillon avec celui obtenu sur le même gel pour les échantillons de référence contenant 0 et 1 % de lait de vache

4. RÉACTIFS

Sauf indication contraire, les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique. L'eau doit être bidistillée ou d'une pureté équivalente.

Note: les informations ci-après s'appliquent aux gels de polyacrylamide contenant de l'urée et préparés en laboratoire, de dimensions $265 \times 125 \times 0,25$ mm. En présence d'autres dimensions et d'autres types de gels, il peut être nécessaire d'adapter les conditions de séparation.

Focalisation isoélectrique

4.1. Réactifs destinés à la production des gels de polyacrylamide contenant de l'urée

4.1.1. Solution mère de gel

Dissoudre:

4,85 g d'acrylamide

0,15 g de N, N'-méthylène-bis-acrylamide (BIS)

48,05 g d'urée

15,00 g de glycérol (87 % m/m),

dans de l'eau, compléter jusqu'à 100 ml et conserver au froid dans une bouteille de verre brun.

Note: les quantités indiquées d'acrylamide neurotoxique peuvent être remplacées par une solution d'acrylamide et bis-acrylamide prémélangés disponible dans le commerce. Dans le cas où cette solution a une concentration de 30 % m/v d'acrylamide et 0,8 % m/v de bis-acrylamide, les quantités indiquées dans la préparation susmentionnée sont remplacées par un volume de 16,2 ml de cette solution. La solution mère ne peut être conservée que dix jours au maximum. Si sa conductivité est supérieure à $5 \mu\text{S}$, il faut déioniser en mélangeant avec 2 g d'Amberlite MB-3 pendant 30 min, ensuite filtrer à travers une membrane de $0,45 \mu\text{m}$.

4.1.2. *Solution de gel*

Préparer une solution de gel en mélangeant des additifs et des ampholytes (*) avec la solution mère de gel (4.1.1):

9,0 ml de solution mère de gel

24 mg de β -alanine

500 μ l d'ampholyte pH 3,5-9,5

250 μ l d'ampholyte pH 5-7

250 μ l d'ampholyte pH 6-8

Mélanger la solution de gel et la dégazer dans un bain à ultrasons ou sous vide pendant 2 à 3 minutes.

Note: la solution doit être préparée juste avant d'être coulée (6.2).

4.1.3. *Catalyseurs*

4.1.3.1. N, N, N' N'-tétraméthyléthylènediamine (Temed)

4.1.3.2. Solution de persulfate d'ammonium (PER) à 40 % m/v:

Dissoudre 800 mg de PER dans de l'eau et compléter jusqu'à 2 ml.

Note: utiliser toujours une solution de PER fraîchement préparée.

4.2. **Liquide de contact**

Kérosène ou paraffine liquide

4.3. **Solution anodique**

Ajouter de l'eau à 5,77 g d'acide phosphorique (85 % m/m) jusqu'à obtention d'un volume de 100 ml.

4.4. **Solution cathodique**

Dissoudre 2,00 g d'hydroxyde de sodium dans de l'eau jusqu'à obtention d'un volume de 100 ml.

Préparation de l'échantillon

4.5. **Réactifs destinés à l'isolement des protéines**

4.5.1. *Solution diluée d'acide acétique (25 ml d'acide acétique glacial complété à 100 ml avec de l'eau)*

4.5.2. *Dichlorométhane*

4.5.3. *Acétone*

4.6. **Solution tampon de dissolution des protéines**

Dissoudre:

5,75 g de glycérol (87 % m/m)

24,03 g d'urée

250 mg de dithiothréitol,

dans de l'eau jusqu'à obtention d'un volume de 50 ml.

Note: stockée au froid, la solution se conserve une semaine au maximum.

4.7. Réactifs destinés à la protéolyse due à la plasmine

4.7.1. Tampon de carbonate d'ammonium

Ajuster jusqu'à un pH de 8 une solution d'hydrogénocarbonate d'ammonium à 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml d'eau) contenant 0,05 mol/l d'acide éthylènediaminotétracétique (EDTA, 1,46 g/100 ml) à l'aide d'une solution de carbonate d'ammonium à 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml d'eau) contenant 0,05 mol/l d'EDTA.

4.7.2. Plasmine bovine (EC. 3.4.21.7), dont l'activité est au minimum de 5 U/ml

4.7.3. Solution d'acide ϵ -aminocaproïque destinée à l'inhibition de l'enzyme

Dissoudre 2,624 g d'acide ϵ -aminocaproïque (acide 6-amino-n-hexanoïque) dans 100 ml d'éthanol à 40 % (v/v).

4.8. Échantillons de référence

4.8.1. Des échantillons de référence certifiés d'un mélange de lait écrémé de brebis et de chèvre emprésuré contenant 0 et 1 % de lait de vache peuvent être obtenus auprès de l'Institut des matériaux et des mesures de référence de la Commission à B-2440 Geel-Belgique

4.8.2. Préparation des échantillons de référence intérimaires de laboratoire de lait de bufflonne emprésuré contenant 0 et 1 % de lait de vache

Le lait cru de bufflonne ou de vache est écrémé par centrifugation à 37 °C (2 500 g, 20 minutes). Refroidir le tube et son contenu rapidement à 6-8 °C, puis éliminer complètement la couche de matières grasses rassemblée en surface. Pour la préparation d'un étalon de 1 %, ajouter 5,00 ml de lait de vache écrémé à 495 ml de lait de bufflonne écrémé dans un bécher de 1 l et ajuster le pH à 6,4 en ajoutant de l'acide lactique dilué à 10 % m/v. Ajuster la température à 35 °C et ajouter 100 μ l de présure de veau (activité 1: 10 000, environ 3 000 U/ml), mélanger pendant 1 minute, puis couvrir le bécher d'une feuille d'aluminium et laisser reposer à 35 °C pendant une heure pour laisser le caillé se former. Après formation du caillé, le lait emprésuré est entièrement lyophilisé sans homogénéisation préalable ni égouttage du lactosérum. Le lait lyophilisé est finement broyé en une poudre homogène. Pour la préparation de l'échantillon de référence de 0 %, suivre la même procédure avec du lait écrémé pur de bufflonne. Stocker les échantillons de référence à - 20 °C.

Note: il est recommandé de vérifier la pureté du lait de bufflonne par focalisation isoélectrique des caséines soumises à l'action de la plasmine avant la préparation des échantillons de référence.

Réactifs destinés à la coloration des protéines

4.9. Fixateur

Dissoudre 150 g d'acide trichloracétique dans de l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume de 1 000 ml.

4.10. Solution de décoloration

Mélanger 500 ml de méthanol et 200 ml d'acide acétique glacial avec de l'eau distillée et amener à 2 000 ml.

Note: renouveler quotidiennement la solution de décoloration; elle peut être préparée par mélange à volume égal d'une solution mère de méthanol à 50 % (v/v) et d'une solution mère d'acide acétique glacial à 20 % (v/v).

4.11. Solutions de coloration

4.11.1. Solution de coloration (solution mère 1)

Dissoudre 3,0 g de bleu brillant G 250 de Coomassie (C.I. 42655) dans 1 000 ml de méthanol à 90 % (v/v) au moyen d'un agitateur magnétique (environ 45 min), passer la solution à travers deux filtres plissés à une vitesse moyenne.

4.11.2. Solution de coloration (solution mère 2)

Dissoudre 5,0 g de sulfate de cuivre pentahydraté dans 1 000 ml d'acide acétique à 20 % (v/v).

4.11.3. Solution de coloration (prête à l'emploi)

Mélanger 125 ml de chaque solution mère (4.11.1, 4.11.2) immédiatement avant la coloration.

Note: la solution de coloration prête à l'emploi doit être utilisée le jour de sa préparation.

5. INSTRUMENTS

- 5.1. **Plaques de verre (265 × 125 × 4 mm); rouleau en caoutchouc d'une largeur de 15 cm; table à niveau réglable**
- 5.2. **Feuille de support du gel (265 × 125 mm)**
- 5.3. **Seconde feuille (280 × 125 mm). Coller sur les deux longueurs de cette feuille une bande de ruban adhésif de 280 × 6 × 0,25 mm (figure 1)**
- 5.4. **Cuve d'électrofocalisation à plaque de refroidissement (par exemple 265 × 125 mm) et générateur de tension approprié ($\geq 2,5$ kV) ou appareil automatique d'électrophorèse**
- 5.5. **Cryostat à circulation, maintenu à la température de $12 \pm 0,5$ °C**
- 5.6. **Centrifugeuse réglable à 3 000 g**
- 5.7. **Bandes de papier pour électrodes (≥ 265 mm de long)**
- 5.8. **Flacons compte-gouttes en matière plastique pour les solutions anodique et cathodique**
- 5.9. **Applicateurs d'échantillon 10 × 5 mm (viscose ou papier-filtre à faible absorption des protéines)**
- 5.10. **Cuves de coloration et de décoloration en acier inoxydable ou en verre (par exemple, cuves d'une dimension de 280 × 150 mm)**
- 5.12. **Homogénéisateur réglable (tige de 10 mm de diamètre), vitesse de rotation de 8 000 à 20 000 tours par minute**
- 5.13. **Agitateur magnétique**
- 5.14. **Bain ultrasonique**
- 5.15. **Appareil de soudure des feuilles**
- 5.16. **Pipettes graduées en microlitres (25 μ l)**
- 5.17. **Centrifugeuse sous vide ou appareil de lyophilisation**
- 5.18. **Bain-marie réglable à 35 et 40 ± 1 °C à dispositif d'agitation**
- 5.19. **Densitomètre (lecture à une longueur d'onde de $\lambda = 634$ nm)**

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. Préparation des échantillons

6.1.1 *Isolement des caséines*

Introduire l'équivalent de 5 g de matière sèche de fromage ou d'échantillon de référence dans un tube de centrifugation de 100 ml, ajouter 60 ml d'eau distillée et homogénéiser à l'aide de l'homogénéisateur (8 000 à 10 000 tours/min.). Ajuster à un pH de 4,6 à l'aide d'une solution d'acide acétique dilué (4.5.1) et centrifuger (5 minutes, 3 000 g). Éliminer les matières grasses et la phase sérique; homogénéiser le culot de centrifugation à 20 000 tours/min dans 40 ml d'eau distillée ajustée à un pH de 4,5 à l'aide de la solution d'acide acétique dilué (4.5.1), ajouter 20 ml de dichlorométhane (4.5.2), homogénéiser de nouveau et centrifuger (5 minutes, 3 000 g). Récupérer la couche de caséine se trouvant entre la phase aqueuse et la phase organique (figure 2) à l'aide d'une spatule et éliminer les deux phases. Homogénéiser de nouveau la caséine dans 40 ml d'eau distillée (voir ci-dessus) et 20 ml de dichlorométhane (4.5.2) et centrifuger. Répéter cette opération jusqu'à ce que la coloration des phases d'extraction devienne négligeable (deux ou trois fois). Homogénéiser le résidu de protéines avec 50 ml d'acétone (4.5.3) et filtrer la solution sur un filtre plissé à vitesse moyenne. Laver le résidu deux fois avec 25 ml d'acétone sur le filtre et laisser sécher à l'air ou sous un courant d'azote; réduire ensuite en fines particules dans un mortier.

Note: les extraits protéiques séchés doivent être conservés à -20 °C.

6.1.2 *Transformation des caséines β en caséines γ par action de la plasmine*

Mettre en suspension 25 mg de caséines isolées (6.1.1) dans 0,5 ml de tampon de carbonate d'ammonium (4.7.1) et homogénéiser pendant 20 min en utilisant, par exemple, le traitement ultrasonique. Chauffer à 40 °C puis ajouter 10 μ l de plasmine (4.7.2), mélanger et laisser incubé une heure à 40 °C sous agitation continue. Pour inhiber l'enzyme, ajouter 20 μ l de solution d'acide ϵ -aminocaproïque (4.7.3), puis ajouter 200 mg d'urée solide et 2 mg de dithiothréitol.

Note: pour obtenir une meilleure symétrie des bandes de caséine focalisées, il est recommandé de lyophiliser la solution après avoir ajouté l'acide ϵ -aminocaproïque et dissous les lyophilisats obtenus dans 0,5 ml de solution tampon (4.6).

6.2. Préparation des gels de polyacrylamide contenant de l'urée

Appliquer au rouleau, sur une plaque de verre (5.1) la feuille de support du gel (5.2) à l'aide de quelques gouttes d'eau; éponger l'eau excédentaire avec une serviette de papier. De la même manière, appliquer au rouleau la seconde feuille (5.3), pourvue de ruban adhésif (écarteurs de 0,25 mm), sur une autre plaque de verre. Cette seconde plaque est posée horizontalement sur une table à niveau réglable.

Ajouter 10 µl de Temed (4.1.3.1) à la solution de gel préparée et désaérée (4.1.2), remuer et ajouter 10 µl de solution de PER (4.1.3.2), mélanger soigneusement et déverser le mélange immédiatement et uniformément au centre de la seconde feuille. Placer un bord de la plaque de support du gel (côté feuille vers le bas) sur la plaque de la seconde feuille et l'abaisser lentement jusqu'à formation entre les feuilles d'un film de gel qui s'étale régulièrement sans créer de bulles (figure 3). À l'aide d'une fine spatule, abaisser soigneusement et complètement la plaque de support du gel et y poser, pour faire pression, trois autres plaques de verre. Après polymérisation complète (environ 60 min), récupérer en même temps le gel polymérisé sur la feuille de support du gel ainsi que sur l'autre feuille en écartant les deux plaques de verre. Nettoyer soigneusement le dos de la feuille de support des restes de gel et de l'urée. Souder entre eux les bords du "sandwich de gel" dans le sens de la longueur, on obtient ainsi un tube que l'on peut conserver au réfrigérateur (six semaines au maximum).

Note: la seconde feuille avec les écarteurs peut être réutilisée. Le gel de polyacrylamide peut être découpé en des dimensions plus petites, ce qui est préconisé en présence d'un faible nombre d'échantillons ou d'un dispositif d'électrophorèse automatique (deux gels, dimensions 4,5 × 5 cm).

6.3. Focalisation isoélectrique

Régler le cryostat à 12 °C. Essuyer le dos de la feuille de support du gel à l'aide de kérosène et verser ensuite quelques gouttes de kérosène (4.2) au centre du bloc de refroidissement. Appliquer le "sandwich de gel" en éliminant les bulles d'air, côté support vers le bas. Essuyer l'excédent de kérosène et retirer la seconde feuille. Imbiber des solutions anodique et cathodique (4.3 et 4.4) les bandes pour électrodes; les couper à la longueur du gel et les mettre en place (distance des électrodes: 9,5 cm).

Procéder à la focalisation dans les conditions suivantes:

6.3.1. Dimension du gel 265 × 125 × 0,25 mm

Étapes	Temps (min.)	Tension (V)	Courant (mA)	Puissance (W)	Volt-heures (Vh)
1. Préfocalisation	30	maximum 2 500	maximum 15	constante 4	env. 300
2. Focalisation des échantillons ⁽¹⁾	60	maximum 2 500	maximum 15	constante 4	env. 1 000
3. Focalisation finale	60	maximum 2 500	maximum 5	maximum 20	env. 3 000
	40	maximum 2 500	maximum 6	maximum 20	env. 3 000
	30	maximum 2 500	maximum 7	maximum 25	env. 3 000

⁽¹⁾ Application des échantillons: après la préfocalisation (étape 1), déposer à l'aide d'une pipette 18 µl des solutions échantillons et étalons sur les applicateurs d'échantillons (10 × 5 mm), les placer sur le gel en les écartant de 1 mm les unes des autres et de 5 mm longitudinalement par rapport à l'anode et appuyer légèrement. Réaliser la focalisation dans les conditions ci-dessus en retirant soigneusement les applicateurs d'échantillons après les 60 minutes de focalisation des échantillons.

Note: si l'épaisseur ou la largeur des gels change, les valeurs du courant et de la puissance doivent être adaptées (par exemple, doubler les valeurs du courant et de la puissance en cas d'utilisation d'un gel de format 265 × 125 × 0,5 mm).

- 6.3.2. *Exemple de programmation d'un appareil automatique d'électrophorèse (2 gels de 5,0 × 4,5 cm): placer les électrodes sans bande directement sur le gel*

Étapes	Tension	Courant	Puissance	Température	Volt-heures
1. Préfocalisation	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Focalisation des échantillons	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Focalisation	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Focalisation	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Placer l'applicateur d'échantillons à l'étape 2 à 0 Vh.

Ôter l'applicateur d'échantillons à l'étape 2 à 30 Vh.

6.4. **Coloration des protéines**

6.4.1. *Fixation des protéines*

Après avoir coupé le courant, retirer immédiatement les bandes et placer le gel dans une cuve de coloration/décoloration remplie de 200 ml de fixateur (4.9); laisser reposer 15 min en agitant continuellement.

6.4.2. *Lavage et coloration de la plaque de gel*

Décarter soigneusement le fixateur et procéder à deux lavages de 30 secondes de la plaque de gel avec 100 ml de solution de décoloration (4.10). Décarter la solution de décoloration, remplir la cuve avec 250 ml de solution de coloration (4.11.3) et procéder à la coloration pendant 45 min en agitant légèrement.

6.4.3. *Décoloration de la plaque de gel*

Décarter la solution de coloration et procéder à deux lavages de la plaque de gel avec 100 ml de solution de décoloration (4.10), agiter ensuite pendant 15 min avec 200 ml de solution de décoloration et répéter l'étape de décoloration au moins deux à trois fois jusqu'à ce que le fond devienne clair et perde sa coloration. Laver ensuite la plaque de gel avec de l'eau distillée (deux fois 2 minutes) et sécher à l'air (2 à 3 heures) ou à l'aide d'un sèche-cheveux (de 10 à 15 minutes).

Note 1: effectuer les opérations de fixation, de lavage, de coloration et de décoloration à 20 °C. Ne pas utiliser de température élevée.

Note 2: si la préférence est donnée à une coloration à l'argent plus sensible (par exemple, Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code n° 17-1150-01), diluer à 5 mg/ml les échantillons de caséine traités à la plasmine.

7. ÉVALUATION

L'interprétation des résultats se fait en comparant le profil des protéines de l'échantillon à examiner avec ceux des échantillons de référence sur le même gel. Le lait de vache est détecté dans les fromages à base de lait de brebis, de lait de chèvre et de lait de bufflonne et dans les mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne par la mise en évidence des caséines γ_2 et γ_3 dont les points isoélectriques se situent entre les pH 6,5 et 7,5 (figures 4a, b, figure 5). La limite de détection est inférieure à 0,5 %.

7.1. **Interprétation visuelle**

Pour une interprétation visuelle de la quantité de lait de vache, il est recommandé d'adapter les concentrations des échantillons et des échantillons de référence afin d'obtenir le même degré d'intensité des caséines γ_2 et γ_3 de lait de brebis, de chèvre et/ou de bufflonne (voir " γ_2 E,G,B" et " γ_3 E, G, B" sur les figures 4a, b et 5) Ensuite, la quantité de lait de vache (inférieure, égale ou supérieure à 1 %) dans l'échantillon à examiner peut être jugée directement par comparaison de l'intensité des caséines γ_3 et γ_2 du lait de vache (voir " γ_3 C" et " γ_2 C" dans les figures 4a, b et 5) avec celles des échantillons de référence à 0 et 1 % (brebis, chèvre) ou des échantillons intermédiaires de laboratoire (bufflonne).

7.2. Estimation densitométrique

Si possible, appliquer la densitométrie (5.19) pour la détermination du rapport de la surface de pic entre les caséines γ_2 et γ_3 du lait de vache et celles du lait de brebis, du lait de chèvre et/ou du lait de bufflonne (figure 5). Comparer cette valeur avec le rapport de la surface de pic des caséines γ_2 et γ_3 de l'échantillon de référence à 1 % (lait de brebis, lait de chèvre) ou de l'échantillon de référence intérimaire de laboratoire (lait de bufflonne) analysés sur le même gel.

Note: cette méthode fonctionne de façon satisfaisante s'il existe un signal nettement positif pour les deux caséines γ_2 et γ_3 de lait de vache dans l'échantillon de référence à 1 % mais non dans l'échantillon de référence à 0 %. Dans le cas contraire, optimiser la procédure en suivant soigneusement les instructions de la méthode.

Un échantillon est jugé positif si les deux caséines γ_2 et γ_3 du lait de vache ou les rapports de surface de pic correspondants sont égaux ou supérieurs aux chiffres concernant l'échantillon de référence à 1 %.

8. RÉFÉRENCES

Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I, Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).

Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).

Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum* 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).

Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).

Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

Figure 1

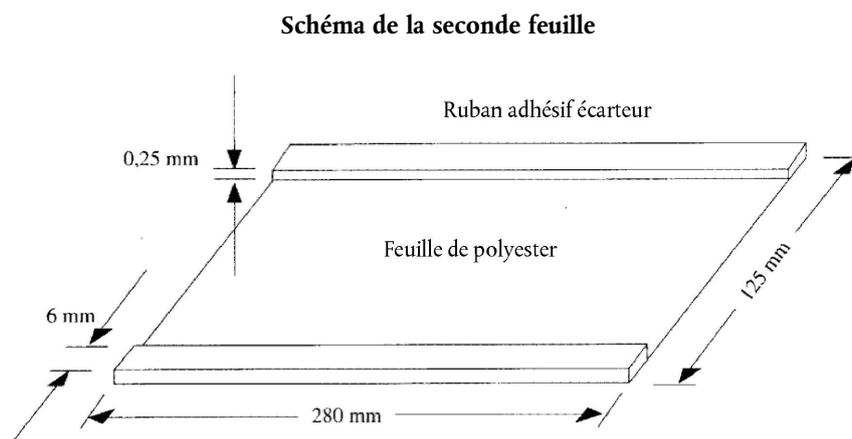


Figure 2

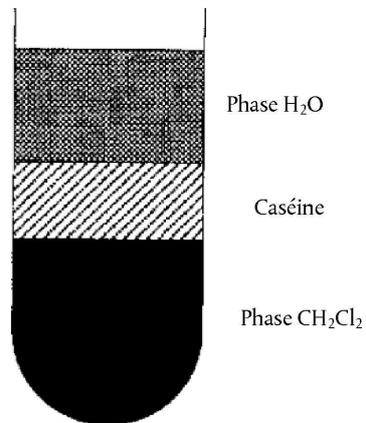
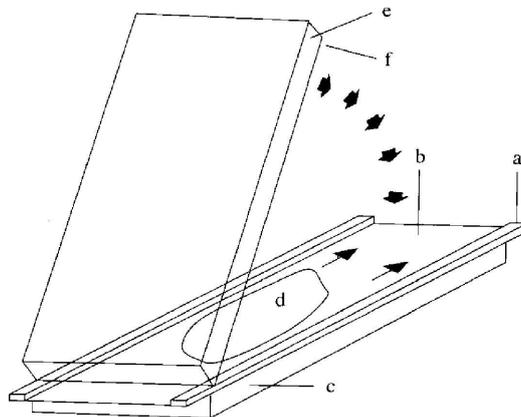
Couche de caséine en flottaison entre les phases aqueuse et organique après centrifugation

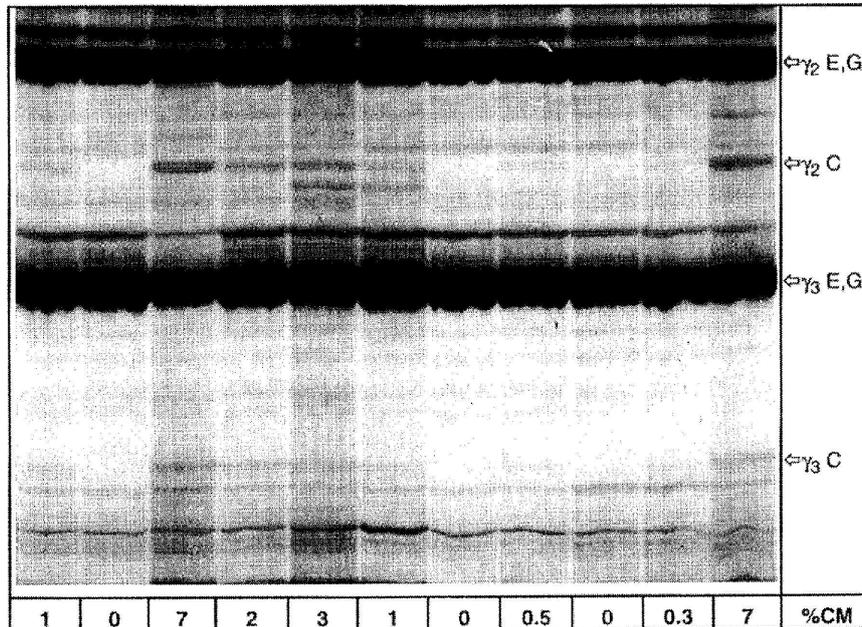
Figure 3

Technique de battement pour la coulée de gels de polyacrylamide ultraminesces

a = ruban adhésif écarteur (0,25 mm); b = seconde feuille (5.3); c, e = plaques de verre (5.1); d = solution de gel (4.1.2); f = feuille de support du gel (5.2)

Figure 4 a

Focalisation isoélectrique des caséines de fromage de lait de brebis et de lait de chèvre contenant différentes quantités de lait de vache, soumises à l'action de la plasmine

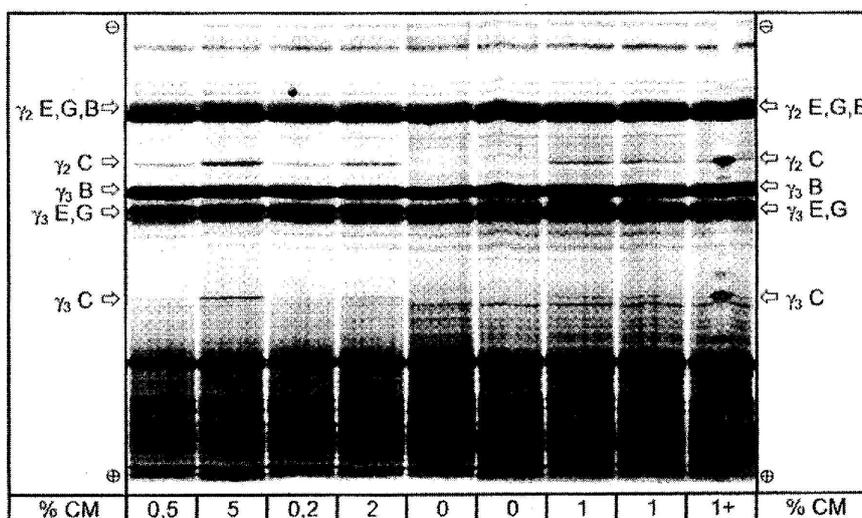


% CM = pourcentage de lait de vache, C = vache, E = brebis, G = chèvre.

La moitié supérieure du gel I.E.F. est indiquée.

Figure 4 b

Focalisation isoélectrique des caséines de fromages produits à partir de mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne contenant différentes quantités de lait de vache, soumises à l'action de la plasmine

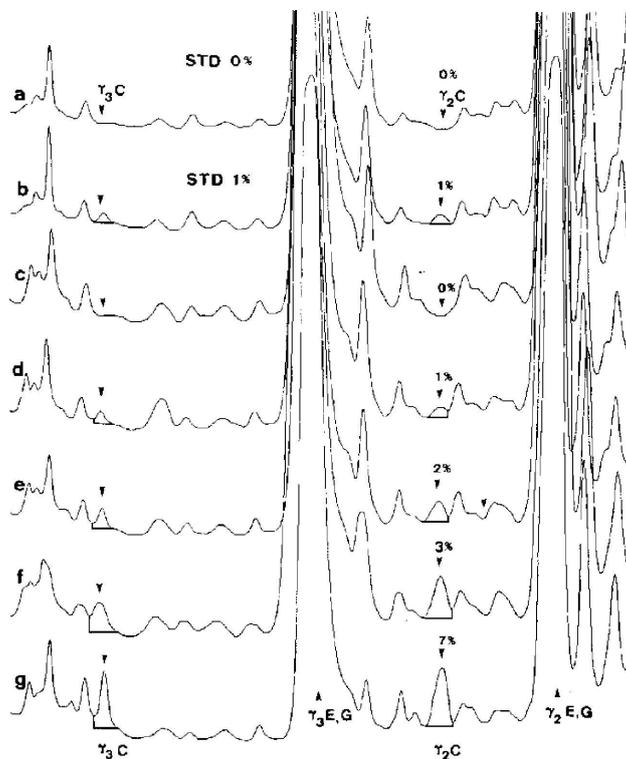


% CM = pourcentage de lait de vache; 1 + = échantillon contenant 1 % de lait de vache et dopé de caséine pure de lait de vache au milieu du trajet. C = vache, E = brebis, G = chèvre, B = bufflonne.

La distance totale de séparation du gel I.E.F. est indiquée.

Figure 5

Superposition de densitogrammes des échantillons de référence (STD) et d'échantillons de fromages à base d'un mélange de lait de brebis et de chèvre après focalisation isoélectrique



a, b = échantillons de référence contenant 0 et 1 % de lait de vache; c-g = échantillons de fromage contenant 0, 1, 2, 3 et 7 % de lait de vache; C = vache, E = brebis, G = chèvre.

La moitié supérieure du gel a été lue à une longueur d'onde $\lambda = 634$ nm.

ANNEXE IX

Évaluation des analyses**1. Assurance de la qualité**

Les analyses sont effectuées par des laboratoires désignés conformément à l'article 12 du règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil (**) ou désignés par les autorités compétentes de l'État membre.

2. Échantillonnage et contestation des résultats d'analyses

1. L'échantillonnage est effectué conformément à la réglementation applicable au produit concerné. Si l'échantillonnage ne fait l'objet d'aucune disposition particulière, il convient d'appliquer les dispositions de la norme ISO 707, Lait et produits laitiers — Lignes directrices relatives aux méthodes d'échantillonnage.
2. Les rapports de laboratoire sur les résultats de l'analyse contiennent des éléments suffisants pour permettre une évaluation des résultats conformément à l'appendice.
3. Des échantillons doubles sont prélevés aux fins des analyses prévues par la réglementation de l'Union.
4. En cas de litige concernant les résultats, l'organisme payeur refait l'analyse nécessaire sur le produit en cause, et les coûts sont supportés par la partie perdante.

L'analyse susmentionnée est effectuée à condition que des échantillons doubles du produit soient disponibles sous scellés et aient été stockés dans des conditions appropriées auprès de l'autorité compétente. Le fabricant envoie une demande à l'organisme payeur afin qu'il effectue l'analyse dans les 7 jours ouvrables qui suivent la communication des résultats de la première analyse. La nouvelle analyse est effectuée par l'organisme payeur dans les 21 jours ouvrables après réception de la demande.

5. Le résultat ainsi obtenu est définitif.
 6. Si, dans les cinq jours ouvrables qui suivent la prise d'échantillons, le fabricant apporte la preuve que la procédure d'échantillonnage n'a pas été effectuée correctement, l'échantillonnage est, si possible, répété. Dans le cas où un nouvel échantillonnage n'est pas possible, le lot est accepté.
-

Appendice

Évaluation de la conformité d'un lot avec la limite réglementaire**1. Principe**

Dans les cas où la réglementation relative à l'intervention publique et au stockage privé prévoit des procédures d'échantillonnage détaillées, il convient de suivre ces procédures. Dans tous les autres cas, on utilise un échantillon d'au moins trois unités, prélevées de manière aléatoire, du lot soumis à vérification. Un échantillon composite peut être préparé. Le résultat obtenu est comparé aux limites réglementaires par le calcul d'un intervalle de confiance de 95 % correspondant à deux fois l'écart-type, ce dernier étant établi différemment selon que 1) la méthode est validée dans le cas d'une collaboration internationale avec des valeurs définies pour σ_r et σ_R , ou que 2), en cas de validation interne, une valeur de reproductibilité interne a été calculée. Cet intervalle de confiance est dès lors égal à l'incertitude de mesure du résultat.

2. La méthode est validée dans le cadre d'une collaboration internationale

Dans ce cas de figure, l'écart-type de répétabilité σ_r et l'écart-type de reproductibilité σ_R ont été définis et le laboratoire peut prouver sa conformité avec les caractéristiques de performances de la méthode validée.

Calculer la moyenne arithmétique \bar{x} des mesures répétées n fois.

Calculer l'incertitude étendue ($k = 2$) de \bar{x} comme

$$U = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n} \sigma_r^2}$$

Si le résultat final x de la mesure est calculé au moyen d'une formule du type, $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$, ou $x = y_1/y_2$, il convient de suivre les procédures habituelles de combinaison des écarts-types appliquées en pareils cas.

Le lot est jugé non conforme à la limite réglementaire supérieure UL si

$$\bar{x} - U > UL.$$

Il est jugé conforme à UL dans tous les autres cas.

Le lot est jugé non conforme à la limite réglementaire inférieure LL si

$$\bar{x} + U < LL.$$

Il est jugé conforme à LL dans tous les autres cas.

3. Validation interne avec calcul de l'écart-type de reproductibilité interne

En cas d'utilisation de méthodes non prévues au présent règlement et si aucune mesure de précision n'a été définie, la validation est faite en interne. Dans les formules de calcul de l'incertitude étendue U , il convient d'utiliser un écart-type de répétabilité interne s_{ir} et un écart-type de reproductibilité interne s_{IR} au lieu respectivement de σ_r et σ_R .

Les règles à suivre pour déterminer la conformité avec la limite réglementaire sont énoncées au point 1. Si toutefois le lot est jugé non conforme à la limite réglementaire, les mesures doivent être répétées avec la méthode spécifiée au présent règlement et le résultat évalué conformément au point 1.

(*) Les produits Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) et Resolyte® pH 5-7 et pH 6-8 (BDH, Merck) se révèlent particulièrement efficaces pour obtenir la résolution de la γ -caséine.

(**) Règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux (JO L 165 du 30.4.2004, p. 1).»

RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2018/151 DE LA COMMISSION**du 30 janvier 2018****portant modalités d'application de la directive (UE) 2016/1148 du Parlement européen et du Conseil précisant les éléments à prendre en considération par les fournisseurs de service numérique pour gérer les risques qui menacent la sécurité des réseaux et des systèmes d'information ainsi que les paramètres permettant de déterminer si un incident a un impact significatif**

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu la directive (UE) 2016/1148 du Parlement européen et du Conseil du 6 juillet 2016 concernant des mesures destinées à assurer un niveau élevé commun de sécurité des réseaux et des systèmes d'information dans l'Union ⁽¹⁾, et notamment son article 16, paragraphe 8,

considérant ce qui suit:

- (1) Conformément à la directive (UE) 2016/1148, les fournisseurs de service numérique restent libres de prendre les mesures techniques et organisationnelles qu'ils jugent appropriées et proportionnées pour gérer les risques qui menacent la sécurité de leurs réseaux et systèmes d'information, pour autant que ces mesures garantissent un niveau de sécurité approprié et tiennent compte des éléments prévus dans ladite directive.
- (2) Lors de la définition des mesures techniques et organisationnelles appropriées et proportionnées, le fournisseur de service numérique devrait aborder la sécurité de l'information de manière systématique, selon une approche fondée sur les risques.
- (3) Afin d'assurer la sécurité des systèmes et des installations, les fournisseurs de service numérique devraient appliquer des procédures d'évaluation et d'analyse. Ces activités devraient concerner la gestion systématique des réseaux et des systèmes d'information, la sécurité physique et environnementale, la sécurité de l'approvisionnement et le contrôle de l'accès.
- (4) Lorsqu'ils effectuent une analyse des risques dans le cadre de la gestion systématique des réseaux et des systèmes d'information, les fournisseurs de service numérique devraient être encouragés à repérer les risques spécifiques et à quantifier leur importance, par exemple en établissant quelles sont les menaces pour les actifs essentiels et comment elles pourraient affecter les activités, et en déterminant les meilleurs moyens d'atténuer ces risques en fonction des capacités existantes et des ressources nécessaires.
- (5) Les stratégies en matière de ressources humaines pourraient avoir trait à la gestion des compétences, y compris aux aspects liés à la sensibilisation et au développement des compétences dans le domaine de la sécurité. Lorsqu'ils décident d'un ensemble approprié de politiques relatives à la sécurité de fonctionnement, les fournisseurs de service numérique devraient être encouragés à tenir compte des aspects de gestion du changement, de gestion de la vulnérabilité, de formalisation des pratiques opérationnelles et administratives et de cartographie du système.
- (6) Les politiques sur l'architecture de la sécurité pourraient prévoir en particulier la séparation des réseaux et des systèmes ainsi que des mesures de sécurité spécifiques aux opérations critiques telles que les activités d'administration. La séparation des réseaux et des systèmes pourrait permettre à un fournisseur de service numérique de distinguer les éléments tels que les flux de données et les ressources informatiques qui appartiennent à un client, un groupe de clients, le fournisseur de service numérique ou des tiers.
- (7) Les mesures prises en ce qui concerne la sécurité physique et environnementale devraient protéger la sécurité des réseaux et des systèmes d'information des organisations contre les dommages causés par des incidents tels que vol, incendie, inondation ou autres conditions météorologiques, pannes de télécommunications ou de courant.
- (8) La sécurité de l'approvisionnement en électricité, en combustible ou en agents de refroidissement pourrait englober la chaîne d'approvisionnement qui comprend, en particulier, la sécurité des tiers contractants et sous-traitants et leur gestion. La traçabilité des produits indispensables a trait à la capacité du fournisseur de service numérique d'identifier et d'enregistrer les sources de ces produits.
- (9) Les utilisateurs de services numériques devraient englober les personnes physiques ou morales qui sont des clients ou des abonnés d'un marché en ligne ou d'un service informatique en nuage, ou qui sont les visiteurs d'un moteur de recherche en ligne souhaitant effectuer des recherches par mots clés.

⁽¹⁾ JO L 194 du 19.7.2016, p. 1.

- (10) Lorsqu'il s'agit de déterminer l'importance de l'impact d'un incident, les cas figurant dans le présent règlement devraient être considérés comme une liste non exhaustive des incidents significatifs. Des enseignements devraient être tirés de la mise en œuvre du présent règlement et des travaux menés par le groupe de coopération en ce qui concerne la collecte d'informations sur les bonnes pratiques en matière de risques et d'incidents et les discussions sur les modalités de signalement des incidents conformément aux points (i) et (m) de l'article 11, paragraphe 3, de la directive (UE) 2016/1148. Le résultat pourrait en être des lignes directrices globales sur des seuils quantitatifs pour les paramètres de notification, qui peuvent déclencher l'obligation de notification pour les fournisseurs de service numérique au titre de l'article 16, paragraphe 3, de la directive (UE) 2016/1148. Le cas échéant, la Commission pourrait également envisager de revoir les seuils actuellement prévus par le présent règlement.
- (11) Afin de permettre aux autorités compétentes d'être informées des nouveaux risques potentiels, les fournisseurs de service numérique devraient être encouragés à signaler volontairement tout incident dont ils ignoraient précédemment les caractéristiques, tels les nouveaux exploits, vecteurs d'attaque ou auteurs de menaces, vulnérabilités et risques.
- (12) Le présent règlement est applicable le jour suivant l'expiration du délai fixé pour la transposition de la directive (UE) 2016/1148.
- (13) Les mesures prévues par le présent règlement sont conformes à l'avis du comité de la sécurité des réseaux et des systèmes d'information visé à l'article 22 de la directive (UE) 2016/1148,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Objet

Le présent règlement précise les éléments à prendre en compte par les fournisseurs de service numérique lorsqu'ils définissent et prennent des mesures visant à assurer un niveau de sécurité des réseaux et des systèmes d'information qu'ils utilisent pour proposer les services visés à l'annexe III de la directive (UE) 2016/1148. Il précise également les paramètres à prendre en compte pour déterminer si un incident a un impact significatif sur la fourniture de ces services.

Article 2

Éléments de sécurité

1. La sécurité des systèmes et des installations visés à l'article 16, paragraphe 1, point a), de la directive (UE) 2016/1148 est la sécurité des réseaux et des systèmes d'information et de leur environnement physique et comprend les éléments suivants:
- a) la gestion systématique des réseaux et des systèmes d'information, c'est-à-dire une cartographie des systèmes d'information et la définition d'un ensemble de politiques appropriées sur la gestion de la sécurité de l'information, y compris l'analyse des risques, les ressources humaines, la sécurité des opérations, l'architecture de la sécurité, les données sécurisées et la gestion du cycle de vie du système et, le cas échéant, le cryptage et sa gestion;
 - b) la sécurité physique et environnementale, c'est-à-dire la disponibilité d'un ensemble de mesures destinées à protéger la sécurité du réseau et des systèmes d'information des fournisseurs de service numérique contre les dommages par le recours à une approche globale des risques englobant par exemple les défaillances du système, l'erreur humaine, les actes malveillants ou les phénomènes naturels;
 - c) la sécurité de l'approvisionnement, c'est-à-dire la mise en place et le maintien de politiques appropriées afin d'assurer l'accessibilité et, le cas échéant, la traçabilité des produits indispensables à la fourniture des services;
 - d) le contrôle de l'accès aux réseaux et systèmes d'information, c'est-à-dire la disponibilité d'une série de mesures visant à garantir que l'accès physique et logique aux réseaux et aux systèmes d'information, y compris la sécurité administrative de ceux-ci, est autorisé et limité en fonction d'exigences commerciales et de sécurité;
2. En ce qui concerne la gestion des incidents visée à l'article 16, paragraphe 1, point b), de la directive (UE) 2016/1148, les mesures prises par le fournisseur de service numérique comprennent:
- a) des processus et procédures de détection maintenus et contrôlés afin d'assurer en temps voulu la bonne connaissance des événements anormaux;
 - b) des processus et politiques sur le signalement des incidents et sur les faiblesses et vulnérabilités décelées dans son système d'information;

- c) une réponse conforme aux procédures établies et la communication des résultats des mesures prises;
- d) une évaluation de la gravité de l'incident, documentant les connaissances issues de l'analyse de l'incident et la collecte d'informations pertinentes pouvant servir de preuves et soutenir un processus d'amélioration continue.
3. La gestion de la continuité des activités, visée à l'article 16, paragraphe 1, point c), de la directive (UE) 2016/1148 est la capacité d'une organisation à maintenir ou, le cas échéant, rétablir la prestation de services à des niveaux acceptables et préalablement définis après un incident disruptif. Elle comprend les éléments suivants:
- a) la mise en place et l'utilisation de plans d'urgence, sur la base d'une analyse des répercussions sur l'activité, pour assurer la continuité des services fournis par les fournisseurs de service numérique, qui doivent être évalués et testés régulièrement, par exemple au moyen d'exercices;
- b) des dispositifs de rétablissement après sinistre qui doivent être évalués et testés régulièrement, par exemple au moyen d'exercices.
4. Le suivi, l'audit et le contrôle visés à l'article 16, paragraphe 1, point d), de la directive (UE) 2016/1148 incluent la création et le maintien de politiques dans les domaines suivants:
- a) la réalisation d'une séquence planifiée d'observations ou de mesures afin de vérifier si les réseaux et les systèmes d'information fonctionnent comme prévu;
- b) l'inspection et la vérification afin de vérifier si une norme ou un ensemble de lignes directrices est suivi, si les rapports sont exacts, et si les objectifs d'efficacité et d'efficience sont atteints;
- c) un processus destiné à révéler les failles dans les mécanismes de sécurité d'un réseau et d'un système informatique, qui protègent les données et maintiennent la fonctionnalité de la manière prévue. Ce processus inclut des procédés techniques et du personnel participant à l'exploitation.
5. Les normes internationales visées à l'article 16, paragraphe 1, point e), de la directive (UE) 2016/1148 sont les normes adoptées par un organisme international de normalisation tel que visé à l'article 2, paragraphe 1, point a), du règlement (UE) n° 1025/2012 du Parlement européen et du Conseil ⁽¹⁾. Conformément à l'article 19 de la directive (UE) 2016/1148, des normes européennes ou internationalement reconnues et des spécifications pertinentes pour la sécurité des réseaux et des systèmes d'information, y compris des normes nationales existantes, peuvent également être utilisées.
6. Les fournisseurs de service numérique veillent à mettre la documentation adéquate à la disposition de l'autorité compétente afin que cette dernière puisse vérifier le respect des éléments de sécurité énumérés aux paragraphes 1, 2, 3, 4 et 5.

Article 3

Paramètres à prendre en compte pour déterminer si l'impact d'un incident est significatif

1. En ce qui concerne le nombre d'utilisateurs touchés par un incident, en particulier ceux qui recourent au service pour la fourniture de leurs propres services, visé à l'article 16, paragraphe 4, point a), de la directive (UE) 2016/1148, le fournisseur de service numérique est en mesure de procéder à une estimation de l'une des deux manières suivantes:
- a) le nombre de personnes physiques et morales affectées avec lesquelles un contrat de prestation de service a été conclu; ou
- b) le nombre d'utilisateurs affectés ayant utilisé le service sur la base, notamment, de précédentes données relatives au trafic.
2. La durée de l'incident visée à l'article 16, paragraphe 4, point b), est la période qui s'écoule entre la perturbation de la bonne prestation du service en termes de disponibilité, d'authenticité, d'intégrité ou de confidentialité jusqu'au moment de son rétablissement.
3. En ce qui concerne la portée géographique eu égard à la zone touchée par l'incident visée à l'article 16, paragraphe 4, point c), de la directive (UE) 2016/1148, le fournisseur de service numérique est en mesure de déterminer si l'incident affecte la fourniture de ses services dans des États membres donnés.
4. La gravité de la perturbation du fonctionnement du service visée à l'article 16, paragraphe 4, point d), de la directive (UE) 2016/1148 est mesurée en fonction d'une ou plusieurs des caractéristiques suivantes affectées par un incident: la disponibilité, l'authenticité, l'intégrité ou la confidentialité des données ou des services connexes.

⁽¹⁾ Règlement (UE) n° 1025/2012 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2012 relatif à la normalisation européenne, modifiant les directives 89/686/CEE et 93/15/CEE du Conseil ainsi que les directives 94/9/CE, 94/25/CE, 95/16/CE, 97/23/CE, 98/34/CE, 2004/22/CE, 2007/23/CE, 2009/23/CE et 2009/105/CE du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la décision 87/95/CEE du Conseil et la décision n° 1673/2006/CE du Parlement européen et du Conseil (JO L 316 du 14.11.2012, p. 12).

5. En ce qui concerne l'ampleur de l'impact sur les fonctions économiques et sociétales visée à l'article 16, paragraphe 4, point e), de la directive (UE) 2016/1148, le fournisseur de service numérique est en mesure de déterminer, sur la base d'indications telles que la nature de ses relations contractuelles avec le client ou, le cas échéant, le nombre potentiel d'utilisateurs touchés, si l'incident a causé d'importants préjudices matériels ou moraux aux utilisateurs, notamment en ce qui concerne la santé, la sécurité ou les dommages causés aux biens.
6. Aux fins des paragraphes 1, 2, 3, 4 et 5, le fournisseur de service numérique ne doit pas être tenu de recueillir des informations supplémentaires auxquelles il n'a pas accès.

Article 4

Impact significatif d'un incident

1. Un incident est considéré comme ayant un impact significatif si au moins l'une des situations suivantes s'est présentée:
- a) le service fourni par un fournisseur de service numérique a été indisponible pendant plus de 5 000 000 heures-utilisateur, une heure-utilisateur correspondant au nombre d'utilisateurs affectés dans l'Union pendant une durée de soixante minutes;
 - b) l'incident a entraîné une perte de l'intégrité, de l'authenticité ou de la confidentialité des données stockées, transmises ou transformées ou des services connexes offerts ou accessibles par l'intermédiaire d'un réseau et d'un système informatique du fournisseur de service numérique, qui a touché plus de 100 000 utilisateurs dans l'Union;
 - c) l'incident a engendré un risque pour la sécurité ou la sûreté publiques ou a entraîné un décès;
 - d) l'incident a causé un préjudice matériel à au moins un utilisateur dans l'Union dès lors que le préjudice causé à cet utilisateur dépasse 1 000 000 EUR.
2. Compte tenu des meilleures pratiques recueillies par le groupe de coopération dans l'exercice des tâches qui lui sont confiées par l'article 11, paragraphe 3, de la directive (UE) 2016/1148 et des discussions visées à l'article 11, paragraphe 3, point m), de ladite directive, la Commission peut revoir les seuils fixés au paragraphe 1.

Article 5

Entrée en vigueur

1. Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.
2. Il est applicable à compter du 10 mai 2018.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 30 janvier 2018.

Par la Commission
Le président
Jean-Claude JUNCKER

DÉCISIONS

DÉCISION (UE) 2018/152 DU CONSEIL

du 29 janvier 2018

portant nomination d'un suppléant du Comité des régions, proposé par la République fédérale d'Allemagne

LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne, et notamment son article 305,

vu la proposition du gouvernement allemand,

considérant ce qui suit:

- (1) Les 26 janvier, 5 février et 23 juin 2015, le Conseil a adopté les décisions (UE) 2015/116 ⁽¹⁾, (UE) 2015/190 ⁽²⁾ et (UE) 2015/994 ⁽³⁾ portant nomination des membres et suppléants du Comité des régions pour la période allant du 26 janvier 2015 au 25 janvier 2020.
- (2) Un siège de suppléant du Comité des régions est devenu vacant à la suite de la fin du mandat de M^{me} Anke SPOORENDONK.

A ADOPTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

Est nommé membre suppléant du Comité des régions pour la durée du mandat restant à courir, à savoir jusqu'au 25 janvier 2020:

— M^{me} Sabine SÜTTERLIN-WAACK, *Ministerin für Justiz, Europa, Verbraucherschutz und Gleichstellung des Landes Schleswig-Holstein.*

Article 2

La présente décision entre en vigueur le jour de son adoption.

Fait à Bruxelles, le 29 janvier 2018.

Par le Conseil

Le président

R. PORODZANOV

⁽¹⁾ Décision (UE) 2015/116 du Conseil du 26 janvier 2015 portant nomination des membres et suppléants du Comité des régions pour la période allant du 26 janvier 2015 au 25 janvier 2020 (JO L 20 du 27.1.2015, p. 42).

⁽²⁾ Décision (UE) 2015/190 du Conseil du 5 février 2015 portant nomination des membres et suppléants du Comité des régions pour la période du 26 janvier 2015 au 25 janvier 2020 (JO L 31 du 7.2.2015, p. 25).

⁽³⁾ Décision (UE) 2015/994 du Conseil du 23 juin 2015 portant nomination des membres et suppléants du Comité des régions pour la période du 26 janvier 2015 au 25 janvier 2020 (JO L 159 du 25.6.2015, p. 70).

RECTIFICATIFS

Rectificatif au règlement (UE) 2017/1084 de la Commission du 14 juin 2017 modifiant le règlement (UE) n° 651/2014 en ce qui concerne les aides aux infrastructures portuaires et aéroportuaires, les seuils de notification applicables aux aides en faveur de la culture et de la conservation du patrimoine et aux aides en faveur des infrastructures sportives et des infrastructures récréatives multifonctionnelles, ainsi que les régimes d'aides au fonctionnement à finalité régionale en faveur des régions ultrapériphériques, et modifiant le règlement (UE) n° 702/2014 en ce qui concerne le calcul des coûts admissibles

(«Journal officiel de l'Union européenne» L 156 du 20 juin 2017)

Page 10, article 1^{er}, point 11, dans la partie introductive du paragraphe 4 de l'article 15 remplacé:

au lieu de: «Dans les régions ultrapériphériques, les régimes d'aides au fonctionnement servent à compenser les surcoûts de fonctionnement qui sont supportés dans ces régions et qui sont la conséquence directe d'un ou de plusieurs des handicaps permanents mentionnés à l'article 349 du traité, lorsque les bénéficiaires exercent leur activité économique dans une région ultrapériphérique, et pour autant que le montant annuel de l'aide par bénéficiaire octroyé au titre de tous les régimes d'aides au fonctionnement mis en œuvre dans le respect du présent règlement n'excède aucun des pourcentages suivants:»

lire: «Dans les régions ultrapériphériques, les régimes d'aides au fonctionnement servent à compenser les surcoûts de fonctionnement qui sont supportés dans ces régions et qui sont la conséquence directe d'un ou de plusieurs des handicaps permanents mentionnés à l'article 349 du traité, lorsque les bénéficiaires exercent leur activité économique dans une région ultrapériphérique, et pour autant que le montant annuel de l'aide par bénéficiaire octroyé au titre de tous les régimes d'aides au fonctionnement mis en œuvre dans le respect du présent règlement n'excède pas un des pourcentages suivants:»

ISSN 1977-0693 (édition électronique)
ISSN 1725-2563 (édition papier)



Office des publications de l'Union européenne
2985 Luxembourg
LUXEMBOURG

FR